

Über den Abbau von Chalkonen und Isoflavonen in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Degradation of Chalcones and Isoflavones in Plant Cell Suspension Cultures

Jochen Berlin * +, Peter Kiss ** +, Dieter Müller-Enoch ***, Dieter Gierse * und Wolfgang Barz *

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

Boris Janistyn

Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Freiburg/Br.

(Z. Naturforsch. 29 c, 374–383 [1974]; eingegangen am 1. April 1974)

Chalcones, Isoflavones, Catabolism, Plant Cell Cultures

Cell suspension culture of *Phaseolus aureus*, *Glycine max* and *Pisum sativum* have been used to determine the extent of chalcone and isoflavone catabolism.

The A-rings of chalcones and isoflavones with both resorcinol and phloroglucinol pattern of substitution have unequivocally been shown to be degraded as measured by carbon dioxide production. The earlier described catabolic pathway of chalcones with the B-ring liberated as a substituted benzoic acid has been verified using another chalcone.

With the use of various ¹⁴C-labelled isoflavones it could be demonstrated that essentially all carbon atoms are introduced into catabolic reactions.

Incorporation of 4',7-dihydroxyisoflavone (daidzein) into insoluble polymeric material has been shown to proceed via the 3',4',7-trihydroxyisoflavone. 3'-Hydroxylation and subsequent polymerisation of the *ortho*-dihydroxy compound can completely be inhibited by using anaerobic conditions which favour glucoside formation instead. 4'-O-Methylgroups in isoflavones prevent the phenolase catalyzed 3'-hydroxylation and thus the incorporation of isoflavones into polymeric structures. 6,7-Dihydroxy substituted isoflavones when fed to cell cultures are not polymerized by phenolase but are rather converted to glycosides.

Flavonoide und Isoflavonoide sind nach zahlreichen Befunden der letzten Jahre als metabolisch aktive Pflanzeninhaltsstoffe anzusehen^{1, 2}. Für die Bearbeitung der katabolen Stoffwechselwege von Flavonoiden haben sich in unseren früheren Arbeiten pflanzliche Zellsuspensionskulturen der flavonoid-führenden Pflanzen als geeignete experimentelle Systeme erwiesen^{3, 4}. Für Flavonole³, Aurone⁶ und das 2',4,4',6'-Tetrahydroxychalcon⁵ (**1**, Abb. 1) konnte dabei gezeigt werden, daß der B-Ring jeweils zu entsprechend substituierten Benzoesäuren abgebaut wird, die ihrerseits weiterem Abbau unterliegen^{7, 8}. Die Zellsuspensionskulturen erlauben bei eindeutiger Abwesenheit von Mikroorganismen den einfachen Nachweis, welche Verbindungen bzw. welche Strukturelemente einer Verbindung abgebaut

werden können. Zusätzlich können in den Zellkulturen durch bemerkenswert hohe Substrataufnahme höhere Konzentrationen an Metaboliten als in intakten Pflanzen erwartet werden; die Möglichkeit zur anaeroben Versuchsführung gestattet schließlich die Hemmung sauerstoffabhängiger Reaktionsstufen.

Ab Beispiel mehrerer spezifisch ¹⁴C-markierter Chalcone und Isoflavone werden einige der eingangs genannten Aspekte des Polyphenolstoffwechsels in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen untersucht, wobei besonders der Nachweis des Abbaus von Resorcin- bzw. Phloroglucinringen und der bereits früher erörterte Einbau von Polyphenolen in alkoholunlösliche Polymerisate⁴ im Vordergrund des Interesses stehen.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Barz, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität, D-4400 Münster/Westf., Hindenburgplatz 55.

* Neue Anschrift wie unter Sonderdruckanforderung genannt.

** Neue Anschrift: Max-Planck-Institut für Immunbiologie, D-7800 Freiburg/Br.

*** Neue Anschrift: Universität Ulm, Abteilung für Biochemie, Oberer Eselsberg.

+ Die Ergebnisse entstammen teilweise der Dissertation von J. Berlin und der Diplomarbeit von P. Kiss, Freiburg/Br., jeweils 1972.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

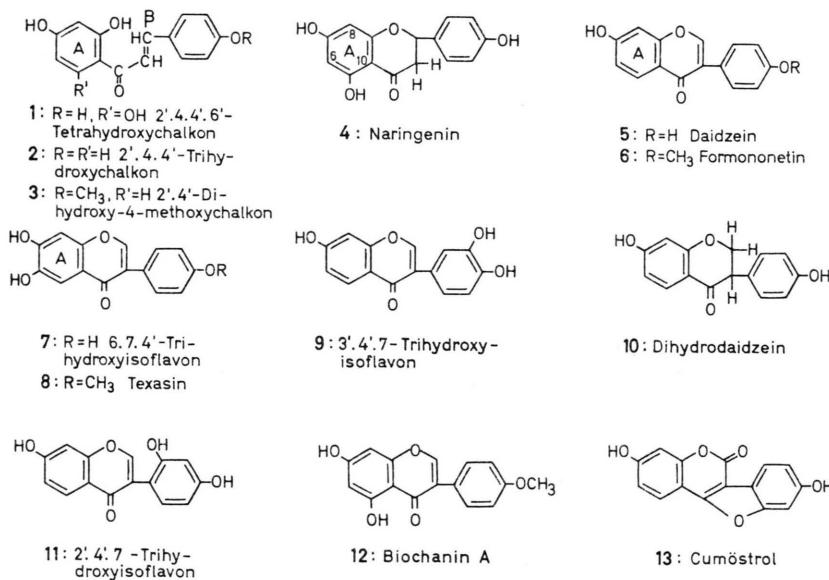


Abb. 1. Strukturformeln der im Text genannten Verbindungen.

Ergebnisse

Synthese der markierten Verbindungen

Zusätzlich zu den aus früheren Arbeiten noch vorhandenen Substanzen (vgl. exp. Teil) mußten folgende Verbindungen neu hergestellt werden.

1. (Ring A-U-¹⁴C]-2'.4.4'-trihydroxychalkon (2) wurde durch alkalische Kondensation⁹ von *p*-Hydroxybenzaldehyd mit [Ring-¹⁴C]-Resacetophenon gewonnen, wobei letztere Verbindung aus [U-¹⁴C]-Resorcin und Eisessigsäureanhydrid nach Wong *et al.*¹⁰ synthetisiert wurde.
 2. [Ring-A-U-¹⁴C]-Formononetin (6) erhielt man durch Friedel-Crafts-Reaktion von *p*-Methoxybenzylcyanid und [U-¹⁴C]-Resorcin und setzte das entstandene Desoxybenzoin mit *ortho*-Ameisensäureäthylester um¹¹.

- [Ring-A-U-¹⁴C]-Daidzein (**5**) wurde durch Demethylierung mit Jodwasserstoffsäure aus dem entsprechend markierten Formononetin gemäß früherer Angaben ¹¹ hergestellt und gereinigt.
- [4-¹⁴C]-Dihydrodaidzein (**10**) wurde durch katalytische Hydrierung ¹² aus [4-¹⁴C]-Daidzein ¹¹ gewonnen und entsprechend unseren früheren Angaben gereinigt ¹³.
- [³H]-Isoflavone wurden entweder durch Wilzbach-Markierung ¹³ (z. B. **9**) oder durch Platin-katalysierten Protonenaustausch mit Trifluoressigsäure/¹HO³H in abgeschmolzenen Glasampullen bei Temperaturen zwischen 90 – 145 °C (**5, 6, 8, 12**) hergestellt ^{14, 15}. Zur Erhöhung des Protonenaustausches wurde die zu tritierende Substanz in Trifluoressigsäureanhydrid gelöst und sodann das Anhydrid mit der berechneten

Tab. I. Reaktionsbedingungen, Ausbeuten und spezifische Radioaktivitäten bei der Tritierung von Isoflavonen mit $^3\text{HO}^3\text{H}$ in Trifluoressigsäureanhydrid (TFEA) und Dimethylformamid (DMFA).

| Substanz | Ein-waage [mg] | Lösungsmittel [ml] | | $^1\text{H}\text{O}^3\text{H}$ [mCi] | Inkuba-tionsdauer [h] | Temperatur [°C] | Ausbeute [mg] | Spezifische Aktivität [mCi/mmol] |
|------------------------------|-------------------|-----------------------|------|---|--------------------------|--------------------|------------------|--|
| Formononetin | 30 | TFEA | 0.55 | 40 | 24 | 90–100 | 25,6 | 3,0 |
| Formononetin | 10 | TFEA | 0,67 | 200 | 24 | 135–140 | 6,9 | 51,2 |
| Daidzein | 3 | TFEA | 0,5 | 200 | 24 | 90–100 | 0,2 | 0,15 |
| Formononetin und Daidzein | 3 | | | | | | 2,64 | 46,5 |
| | 10 | TFEA | 0,60 | 200 | 24 | 135–140 | 1,17 | 0,17 |
| Daidzein | 30 | DMFA | 0,40 | 125 | | 120–140 | 22,5 | 4,0 |
| Texasin | 20 | DMFA | 0,40 | 125 | 24 | 120–140 | 3,0 | 15,0 |

Menge $^4\text{HO}^3\text{H}$ (1 Ci/ml bzw. 5 Ci/ml) hydrolysiert¹⁶. Für die im B-Ring methoxylierten Isoflavone **6** und **10** wurden dabei sehr hohe spezifische Aktivitäten erreicht (Tab. I), während Daidzein (**5**) nur mäßig markiert wurde. Dies wird auch durch eine gemeinsame Umsetzung von **5** und **6** besonders deutlich (Tab. I). Eine wesentliche Steigerung in der Markierung von Daidzein wurde schließlich durch Verwendung von Dimethylformamid als Lösungsmittel mit 10% tritiertem Wasser erreicht¹⁷.

Chalkonabbau

Suspensionskulturen von *Pisum sativum* bauen das 2'.4.4'.6'-Tetrahydroxychalcon (**1**) über *p*-Cumarsäure und *p*-Hydroxybenzoësäure ab⁵. Da Verbindungen mit Phloroglucinstruktur im pflanzlichen¹⁸ wie auch im mikrobiologischen System^{19, 20} bevorzugt abgebaut werden, haben wir nun unter Verwendung von $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}2'.4.4'\text{-Trihydroxychalcon}$ (**2**) gezeigt, daß auch ein Chalkon mit Resorcinstruktur im A-Ring dem gleichen Abbau unterliegt. Zwei Kulturen von *Pisum sativum*⁵ erhielten jeweils $2,5 \mu\text{Ci}$ $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}2'.4.4'\text{-Trihydroxychalcon}$ (**2**) (10^{-4} M) unter strikt aseptischen Bedingungen. Nach 24 Stunden wurde eine Kultur auf Phenolcarbonsäuren aufgearbeitet, wobei eine papierchromatographische Analyse (Laufmittel L₁) Hinweise auf *p*-Cumarsäure und *p*-Hydroxybenzoësäure ergab. Mit dem Extrakt der zweiten Zellkultur wurde nach Zusatz von jeweils 20 mg Trägermaterial eine Isotopenverdünnungsanalyse (mehrfache Papierchromatographie, Kristallisation, Sublimation) auf diese beiden Säuren ausgeführt, deren Ergebnisse in Tab. II dargestellt sind.

Tab. II. Gesamtradioaktivität und Einbauraten in *p*-Cumarsäure und *p*-Hydroxybenzoësäure nach Gabe von $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}2'.4.4'\text{-Trihydroxychalcon}$ an Zellsuspensionskulturen von *Pisum sativum* L.

| | |
|--|-------------------|
| $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}2'.4.4'\text{-Trihydroxychalcon}$ | |
| angeboten | |
| [I/min] | $5,78 \cdot 10^6$ |
| Inkubationsdauer [h] | 48 |
| <i>p</i> -Cumarsäure [I/min] | 11500 |
| Einbaurate in <i>p</i> -Cumarsäure [%] | 0,2 |
| <i>p</i> -Hydroxybenzoësäure [I/min] | 47000 |
| Einbaurate in <i>p</i> -Hydroxybenzoësäure [%] | 0,83 |

Nachdem für **1** und **2** in bezug auf den B-Ring und die C₃-Kette identische Abbauwege angenommen werden können, haben wir die Frage geprüft,

ob die Geschwindigkeit des Abbaus des Resorcinchalkons (**2**) mit der des Phloroglucinchalkons (**1**) vergleichbar ist. Dazu erschienen Zellsuspensionskulturen der Sojabohne am besten geeignet, da sie nach unseren bisherigen Erfahrungen Aromaten besonders gut abbauen und auch die zur Lösung der gestellten Frage erforderliche Decarboxylierung von *p*-Hydroxybenzoësäure sehr intensiv ausführen^{3, 7, 8}. In Parallelansätzen wurden jeweils 2 Kulturen mit den in der β -Position markierten Chalkonen **1** und **2** in Form ihrer β -D-Glukoside versetzt ($5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) und über insgesamt 70 Stunden die Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ verfolgt. Während die Aufnahme von **1** und **2** durch die Zellkulturen der Sojabohne vergleichbar war, ist aus den Kurvenzügen in Abb. 2 ersichtlich, daß zwar beide Substrate gut abgebaut werden, daß aber das Tetrahydroxychalcon **1** über den gesamten Versuchszeitraum fast doppelt so rasch katabolisiert wird, wie das Trihydroxychalcon **2**.

Wird dagegen das $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}4\text{-Methoxy-}2'.4'\text{-dihydroxychalcon}$ (**3**) den Zellkulturen der Sojabohne appliziert, so kann an Hand der minimalen $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung (Abb. 2) nur auf einen geringen Abbau geschlossen werden. Die gegebenenfalls analog zu **1** oder **2** entstehende *p*-Methoxybenzoësäure wird von Zellkulturen der Sojabohne auch nur in geringem Maß decarboxyliert⁸. Andererseits wird die Methylgruppe in der 4-Stellung von **3** zu einem recht hohen Prozentsatz abgespalten, der jedoch nicht an die für *p*-Methoxybenzoësäuren charakteristischen Werte⁸ heranreicht.

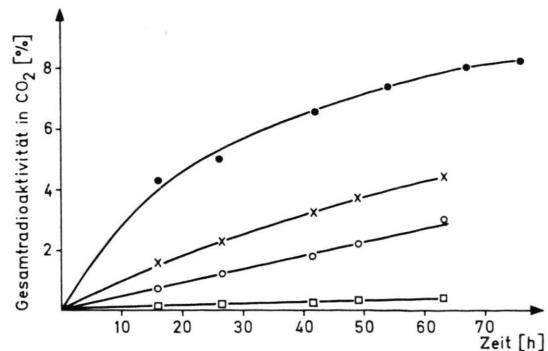


Abb. 2. Prozentuale Gesamtradioaktivität in $^{14}\text{CO}_2$ nach Applikation von $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}1$ (●—●), $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}2$ (×—×), $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}3$ (□—□) und $[\text{Methyl-}^{14}\text{C}]\text{-}3$ (○—○), an Zellsuspensionskulturen der Sojabohne.

Die für das Gebiet des Aromatenstoffwechsels besonders interessante Frage nach der Spaltung und dem Abbau von Phloroglucin- und Resorcinringen

haben wir durch die Verwendung der [Ring A-¹⁴C]-markierten Substrate **2** und **4** bearbeitet. Nach den Angaben von Abb. 3 werden die beiden genannten Ringsysteme von Zellkulturen der Sojabohne bzw. der Mungbohne mit 10–12% der applizierten Gesamtradioaktivität in Form von ¹⁴CO₂ sehr intensiv und nahezu vergleichbar abgebaut. Wir haben damit für zwei in Naturstoffen weitverbreiteten Strukturtypen einen pflanzlichen Abbau eindeutig nachgewiesen. Mit der Spaltung der Chalkone zu *p*-Cumarsäure bzw. dem Abbau von Naringenin geht offensichtlich eine weitere Spaltung der A-Ringe einher, d. h. sie bleiben nicht wie im mikrobiologischen System als weitgehend stabile Produkte erhalten. Das wahre Ausmaß des Abbaus der Resorcin- bzw. Phloroglucinstrukturen ist dabei sicher noch größer als es aus den CO₂-Werten der Abb. 3 ersichtlich ist.

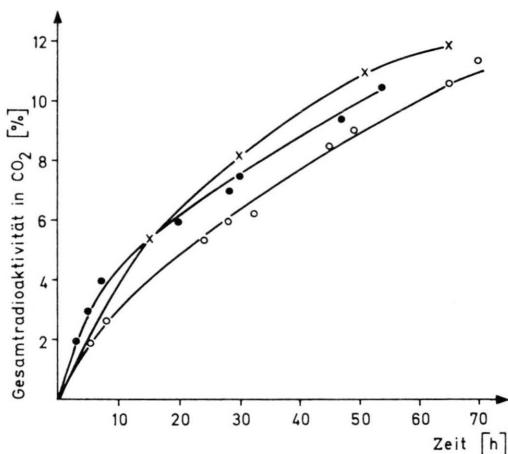


Abb. 3. Prozentuale Gesamtradioaktivität in ¹⁴CO₂ nach Applikation von [6.8.10-¹⁴C₃]-Naringenin (x—x) an Zellkulturen der Mungbohne und von [Ring A-U-¹⁴C]-2'.4'.4'-Trihydroxychalkon an Zellkulturen der Mungbohne (·—·) und der Sojabohne (o—o).

Auf Grund der durch Fraktionierung der Nährösungen und der Zellextrakte nach unserem Standardverfahren¹¹ festgestellten starken Radioaktivitätsverteilung ergibt sich, daß aus den beiden Ringen offensichtlich ein größerer Anteil an Kohlenstoff im Primärstoffwechsel zirkuliert. Besonders ausgeprägt (ca. 40%) ist aber ebenfalls bei beiden Substraten der Einbau in äthanolunlösliche Strukturen; polymere, bzw. oligomere Verbindungen dürften ebenfalls zu der gemessenen Radioaktivitätsverteilung beigetragen haben.

Isoflavonmetabolismus

Mit zahlreichen Phenolen haben wir in Pflanzen und pflanzlichen Zellsuspensionskulturen einen Einbau in äthanol- und säureunlösliche polymere Verbindungen beobachtet^{3, 4, 8, 11}. Im Falle von 1.2- bzw. 1.4-Dihydroxyaromaten kann diese Polymerisation durch die unmittelbare Einwirkung von Phenoloxidases gut erklärt werden^{21, 22}. Bei Verbindungen vom Typ des Isoflavons Daidzein (**5**) haben wir jedoch bereits früher ein von **5** abgeleitetes, höher hydroxyliertes Derivat als Substrat für die Polymerisation vermutet⁴, wobei auch die weitere Hydroxylierung durch eine Phenoloxidase hervorgerufen werden kann²²; damit wären diese Reaktionen abhängig vom Luftsauerstoff.

Zunächst haben wir durch [Ring-A-¹⁴C]-Daidzeinapplikation an Zellkulturen der Mungbohne unter aeroben und anaeroben Bedingungen die Sauerstoffabhängigkeit der Polymerenbildung bestimmt. Unter anaeroben Bedingungen sollte eine zusätzliche Daidzeinhydroxylierung und anschließende Polymerenbildung unterbleiben. In Parallelansätzen wurden die Zellkulturen einmal unter Stickstoff-Atmosphäre, zum anderen unter Luft mit [Ring-A-U-¹⁴C]-Daidzein für eine bzw. drei Stunden inkubiert. Als Kontrollexperimente wurden Mungbohnenzellkulturen, die für die angegebenen Zeiträume anaerob gehalten worden waren, anschließend bei normaler Belüftung ebenso lang mit Substrat inkubiert. Die Verteilung der Radioaktivität auf die Nährösung, den Äthanolextrakt der Zellen und den unlöslichen Zellrückstand unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen ist in Abb. 4 angegeben. Während die Aufnahme von Daidzein in den Parallelansätzen gleich hoch ist, ist der Einbau von Daidzein in die Polymeren unter anaeroben Bedingungen nahezu vollständig gehemmt, d. h., die erwähnte Umwandlung von **5** ist sauerstoffabhängig. Die Aufarbeitung der Zellextrakte der Versuche ergab, daß unter anaeroben Bedingungen ein wesentlich höherer Prozentsatz des Substrates (ca. 5–10-fach) als unter aeroben Versuchsbedingungen in ein Daidzein-O-glukosid (vergleiche Müller²³) überführt worden war. Abbau und Polymerenbildung des Daidzeins sind also sauerstoffabhängig.

Wenn Phenoloxidases die Polymerenbildung hervorrufen, dann müßte zuvor eine Zweithydroxylierung im Daidzein *ortho* zu einer vorhandenen Hydroxylgruppe erfolgen²¹. Nach publizierten Er-

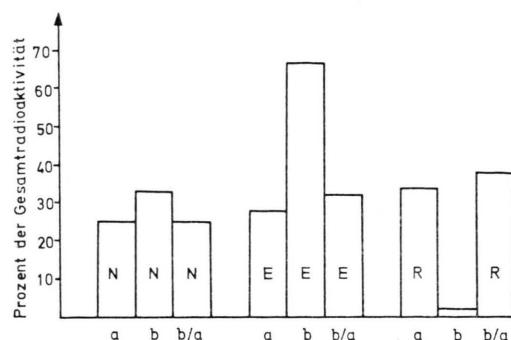


Abb. 4. Prozentuale Verteilung von [Ring A-U-14C]-Daidzein auf die Nährlösung (N), den Äthanolextrakt der Zellen (E) und den unlöslichen Zellrückstand (R) nach 1-stündiger Gabe an Zellsuspensionskulturen der Mungbohne unter aeroben (a) und anaeroben (b) Bedingungen; in den mit b/a bezeichneten Versuchen wurden zunächst für eine Stunde anaerob gehaltene Zellen anschließend aerob mit Substrat inkubiert. Bei 3-stündiger Versuchsführung wurden folgende Prozentwerte gemessen:

$$\begin{array}{lll}
 \text{a:} & \text{N}=30,5, & \text{E}=28,5, & \text{R}=33; \\
 \text{b:} & \text{N}=17,7, & \text{E}=83,2, & \text{R}=0,5; \\
 \text{b/a:} & \text{N}=18,2, & \text{E}=24,6, & \text{R}=49,3.
 \end{array}$$

gebnissen mit Zimtsäuren²⁴, Flavonoiden²⁵ und Isoflavonen^{26, 27} kämen als Produkte einer Daidzeinhydroxylierung entweder das 3',4',7-Trihydroxyisoflavan (9) oder das 6,7,4'-Trihydroxyisoflavan (7) in Frage.

Wir haben nun durch zellfreie Versuche die Zwischenstufe zu bestimmen versucht. Nach den Angaben von Vaughan und Butt²⁴ wurden phenolfreie Enzympräparationen der Mungbohne, in denen als Leitreaktion eine sehr gute Hydroxylierung von *p*-Cumarsäure zu Kaffeesäure unter gleichen Bedingungen beobachtet wurde, mit [4-14C]-Daidzein bei 30 °C und pH 7,5 unter Luft inkubiert. Nach papierchromatographischer Analyse des Reaktionsansatzes in den Laufmitteln L₂ und L₃ wurde ein neues Produkt mit einem nur halb so großen *R_F*-Wert wie der des Substrats beobachtet. Die chromatographischen Eigenschaften sprachen mehr für 9 als für 7. Das aus einem größeren Enzymansatz (400 µg [4-14C]-Daid-

zein) erhaltenen Reaktionsprodukt wurde sodann mit 7 mg Trägermaterial von 9 versetzt und nach Permethylierung bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt (Tab. III). Wurde umgekehrt das Reaktionsprodukt der Enzymreaktion mit Trägermaterial von 7 versetzt, ließ sich bereits durch eine Kristallisation mehr als 90% der Radioaktivität abtrennen. Da schließlich die aus [4-14C]-Daidzein erhaltene radioaktive Verbindung in allen getesteten Laufmitteln mit Vergleichsflecken von 9, nicht aber von 7 übereinstimmte, ergibt sich, daß die Phenoloxidase aus *Phaseolus aureus* Daidzein in 3',4',7-Trihydroxyisoflavan umgewandelt. Das Isoflavan Formononetin (6) ist dagegen unter gleichen Reaktionsbedingungen kein Substrat für die Phenoloxidasesreaktion aus den Mungbohnenzellen. Bei 9, das u. W. bisher nur aus Kernholz isoliert wurde²⁸, handelt es sich um eine chemisch nicht allzu stabile Verbindung, da sie bereits bei chromatographischer Manipulation zu Verfärbung und Polymerenbildung (Auftreten größerer Radioaktivitätsgipfel am Start der Chromatogramme) neigt. Es ist daher nicht verwunderlich, daß alle unsere bisherigen Versuche erfolglos blieben, die Bildung von 9 nach Daidzeinapplikation an die Zellkulturen der Mungbohne durch Verdünnungsanalysen nachzuweisen.

Das aus Daidzein enzymatisch gebildete 3',4',7-Trihydroxyisoflavan läßt erwarten, daß für die beobachtete starke Festlegung von Substrat im unlöslichen Zellrückstand die 3',4'-*ortho*-Dihydroxylgruppierung Voraussetzung ist. Zur Überprüfung dieser Annahme haben wir verschiedene Isoflavone mit unterschiedlichem Substitutionsmuster im A-, bzw. B-Ring mit [U-³H]-Markierung synthetisiert und auf ihren Einbau in die polymeren Strukturen⁴ untersucht. Die Ergebnisse in Tab. IV zeigen, daß Verbindungen, die im B-Ring eine 3',4'-*ortho*-Dihydroxylgruppierung besitzen (9) oder zu bilden vermögen (5, 10 11), stark in den Rückstand eingebaut

Tab. III. Reinigung von enzymatisch gebildetem 3',4',7-Trihydroxyisoflavan bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität durch Papier-(PC) und Dünnschichtchromatographie (DS).

| Substanz | Chromatographie-art und Laufmittel | Substanzmenge [mg] | Gesamtaktivität [cpm] | Spezifische Radioaktivität [cpm/mg] |
|---|------------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 3',4',7-Trihydroxyisoflavan (Permethylierung) | PC/L2 | 7 | 71 000 | 10 000 |
| 3',4',7-Trihydroxyisoflavan | DS/L4 | 5,4 | 48 000 | 8 900 |
| 3',4',7-Trihydroxyisoflavan | DS/L5 | 4,1 | 36 000 | 8 700 |
| 3',4',7-Trihydroxyisoflavan | DS/L6 | 3,7 | 32 000 | 8 650 |
| 3',4',7-Trihydroxyisoflavan | PC/L3 | 3,2 | 28 600 | 8 650 |

Tab. IV. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach 24-stündiger Applikation von [³H]-Isoflavonen an Zellsuspensionskulturen der Mungbohne.

| Substanz | Nähr- lösung | Fraktionen | | | unlöslicher Zellrückstand |
|--|-----------------|-----------------------------------|---|---|------------------------------|
| | | Äthanol- extrakt der Zellen | Ätherlösliche Zellbestand- teile/Aglyka | Wasserlösliche Zellbestand- teile/Glykoside | |
| [³ H]-Daidzein (5) | 13 | 17 | 8 | 8 | 54 |
| [³ H]-3',4',7-Trihydroxyisoflavan (9) | 25 | 10 | 4 | 6 | 55 |
| [³ H]-2',4',7-Trihydroxyisoflavan (11) | 13 | 21 | 7 | 15 | 56 |
| [³ H]-Dihydrodaidzein (10) | 30 | 23 | 8 | 12 | 41 |
| [³ H]-Formononetin (6) | 17 | 59 | 21 | 32 | 10 |
| [³ H]-Texasin (8) | 42 | 32 | 9 | 21 | 16 |

werden. Ist dagegen die 4'-Hydroxylgruppe methyliert (6), dann wird das Substrat selbst bei Vorliegen einer *ortho*-Dihydroxylstruktur im A-Ring (8) nicht in die Polymeren eingebaut. Die bei Formononetin (6) und Texasin (8) im Zellrückstand vorhandene geringe Radioaktivität kann – im Gegensatz zu 5, 9, 10 und 11 – noch durch Säurehydrolyse zum größten Teil herausgelöst werden. Wenn die applizierten Isoflavone keine Substrate für eine Phenolase darstellen, dann findet man neben dem immer zu geringen Prozentsätzen auftretenden Abbau, größere Mengen freier Aglyka und besonders vorherrschend die Monoglukoside von 6 und 8.

Unsere erste Beobachtung eines Isoflavonabbaus in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen hatte ergeben⁴, daß die Carbonylgruppe von Daidzein (5) in Zellkulturen von *Phaseolus aureus* zu geringen, aber zweifelsfrei meßbaren Prozentsätzen in CO₂ überführt worden war. Um zusätzlich O-Demethylierungsreaktionen und besonders die Spaltung der

A-Ringe mit Resorcin- und Phloroglucinstruktur nachzuweisen, haben wir verschiedene spezifisch markierte Isoflavone hergestellt und in den Zellsuspensionskulturen der Mungbohne und der Sojabohne auf ihren Abbau geprüft. Als Maß für den Abbau wird dabei besonders die ¹⁴CO₂-Produktion betrachtet, die in den Zellkulturen der Sojabohne deutlich höher liegen als bei denen der Mungbohne. Die Ergebnisse in Tab. V zeigen, daß bei den Isoflavonen ebenso wie bei den Chalkonen (vgl. Abb. 3) der Resorcin- und wohl auch der Phloroglucinring einem Abbau unterliegen kann. Bemerkenswert ist der 4–6-mal stärkere Abbau von Dihydrodaidzein im Vergleich zu (5). Die O-Demethylierung von Formononetin ist zwar deutlich, aber weniger ausgeprägt als die von *para*-methoxy-Benzoesäuren⁸. Im Gegensatz zu den Versuchen mit 5 und 10 treten bei Formononetin größere Mengen des 7-O-Glukosids auf, wobei gleichzeitig der Einbau in den unlöslichen Zellrückstand wesentlich niedriger lag. Insgesamt er-

Tab. V. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Applikation von [¹⁴C]-Isoflavonen an Zellsuspensionskulturen der Mungbohne und der Sojabohne.

| Substanz | Versuchs- dauer [h] | Nähr- lösung | CO ₂ | Äthanol- extrakt der Zellen | unlöslicher Zellrückstand |
|--|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>Mungbohnen-Zellkulturen</i> | | | | | |
| [4- ¹⁴ C]-Daidzein | 24 | 20 | 1 | 30 | 50 |
| [Ring A-U- ¹⁴ C]-Daidzein | 72 | 8,3 | 0,8 | 31,5 | 45,8 |
| [Methyl- ¹⁴ C]-Formononetin | 65 | 17 | 1,7 | 59 | 12 |
| [4- ¹⁴ C]-Formononetin | 48 | 15 | 0,3 | 61 | 12 |
| [U- ¹⁴ C]-Biochanin A | 72 | 28,5 | 2,6 | 51 | 13,3 |
| [4- ¹⁴ C]-Dihydrodaidzein | 24 | 7,4 | 4,3 | 26,5 | 51 |
| <i>Sojabohnen-Zellkulturen</i> | | | | | |
| [4- ¹⁴ C]-Daidzein | 72 | | 1,2 | | |
| [4- ¹⁴ C]-Formononetin | 72 | 42 | 4,6 | 21,5 | 15 |
| [Methyl- ¹⁴ C]-Formononetin | 72 | 36,4 | 7,3 | 31,9 | 3,4 |
| [Ring A-U- ¹⁴ C]-Formononetin | 24 | 40 | 0,8 | 24 | 20 |
| [U- ¹⁴ C]-Biochanin A | 72 | 23,5 | 12 | 24,1 | 31,5 |
| [4- ¹⁴ C]-Dihydrodaidzein | 72 | 21,4 | 8,8 | 16,3 | 42 |

lauben die Ergebnisse in Tab. V den Schluß, daß sämtliche untersuchten Isoflavone einem vollständigen Abbau unterliegen können, da alle markierten Kohlenstoffatome in CO_2 überführt wurden.

Während der zahlreichen Fütterungsversuche mit markierten Isoflavonen wurden die Zellextrakte stets auf mögliche Katabolite untersucht. Im Gegensatz zu unseren Arbeiten mit Flavonolen³, Benzoesäuren⁸, Auronen⁶ und Chalkonen⁵ (siehe auch Abschnitt „Chalkonabbau“, vorne) haben wir Metabolite bisher nur in geringen Spuren nachweisen können, die Strukturaufklärungen nicht erlaubten. Obwohl an Hand der hier vorgelegten Daten an einem vollständigen Isoflavonabbau nicht gezweifelt werden kann, werden nach den geschilderten Ergebnissen die Abbauwege wohl nur durch *in-vitro*-Arbeiten aufzuklären sein.

Diskussion

Mit den vorgelegten Ergebnissen über einen Abbau der A-Ringe mit Phloroglucin- und Resorcinsstruktur bei Chalkonen/Flavanonen (**1**, **2**, **4**) und Isoflavonen (**5**, **6** **12**) haben wir für zwei in Naturstoffen weit verbreitete Strukturtypen einen pflanzlichen Abbau unter verlässlichen, d. h. aseptischen Bedingungen, zeigen können. Nach dem mehrfach nachgewiesenen pflanzlichen Abbau von 1,2-Dihydroxy-^{7, 29, 30} und 1,4-Dihydroxyaromaten³¹ kann nun aufgrund der Ergebnisse mit 1,3-Dihydroxyverbindungen festgestellt werden, daß Pflanzen offensichtlich die hauptsächlich vorkommenden phenolischen Ringstrukturen in katabole Stoffwechselwege zu überführen vermögen. Gleiches gilt auch für den bereits früher von uns gezeigten Abbau der A-Ringe in Flavonolen³.

Vollständiger Abbau bis zu CO_2 , Bildung von Glykosiden und Überführung in polymere Strukturen sind die für einen in der Pflanzenzelle beobachteten Umsatz der Inhaltsstoffe verantwortlichen Hauptreaktionen. Die unterschiedliche Behandlung von beispielsweise Daidzein (**5**) und Formononetin (**6**) zeigen sehr deutlich, daß einmal die chemische Struktur (Möglichkeit zur Umsetzung mit Phenolasen) zum anderen die gegebene physiologische Situation (anaerob/aerob; Enzymausstattung) über das Ausmaß der jeweils eingeschlagenen Reaktionsrichtung entscheiden. Das Phänomen des pflanzlichen Phenolabbaus ist daher vorwiegend quantitativ zu sehen.

Ein Vorteil pflanzlicher Zellsuspensionskulturen beruht auf der Möglichkeit, in ein durch mehrere, gleichzeitig ablaufende Reaktionen charakterisiertes komplexes Geschehen durch Änderung der Außenbedingungen (Anaerobiose) in übersichtlicher Weise kurzfristig eingreifen zu können. Dieses bereits früher erfolgreich für die Aufklärung von Biosyntheseschritten bei Cumarienen angewandte Verfahren³² führt bei Daidzein durch Ausschaltung der sauerstoffabhängigen Phenoloxidases offensichtlich zu einer, Glukosidierungsreaktionen begünstigenden, erhöhten innerzellulären Konzentration. Ausschaltung von Phenoloxidases und relative Erhöhung der glukosidisch gebundenen Substratmenge kann in gleicher Weise durch 4'-O-Methylierung wie bei Formononetin (**6**) und Texasin (**8**) erreicht werden. Damit wird erneut bestätigt, daß eine Hydroxylierung neben einer Methoxylgruppe nicht ablaufen kann. Die Ergebnisse über die unterschiedliche Polymerisation eines 3',4'-Dihydroxyisoflavons (**9**) und eines 6,7-Dihydroxyisoflavons (**8**) (Tab. IV) zeigen sehr eindeutig, daß **9** kein Substrat für eine Phenoloxidase darstellt und daher wohl auch an der Biosynthese der Hydroxylfunktion in Position 6 von Isoflavonen kein Enzym vom Phenolasetyp beteiligt ist. Die ausgeprägte Neigung von **9** zur Polymerisation erklärt hinreichend unsere bisherigen negativen Ergebnisse, durch Verdünnungsanalysen den Nachweis für das Vorkommen in den Zellkulturen zu führen. Die erwähnten Eigenschaften von **9** erklären wohl auch die Tatsache, daß das 3',4',7-Trihydroxyisoflavon bisher nur aus enzymatisch weitestgehend inaktivem Kernholz von *Machaerium villosum* isoliert werden konnte²⁸.

Bemerkenswert für den Isoflavonoidstoffwechsel ist der beachtliche Unterschied zwischen Daidzein (**5**) und Dihydrodaidzein (**10**). Während beide Substrate in vergleichbarem Ausmaß durch Phenoloxidases zu polymeren Strukturen umgewandelt werden (Tab. IV und V), wird **10** gemessen an der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion um mindestens den Faktor 6–8 schneller abgebaut. Dieser bevorzugte Abbau von **10** im Vergleich zu **5** ist im Hinblick auf die Beteiligung dieser beiden Verbindungen an der Cumöstrol-Biosynthese (**13**) von Wichtigkeit^{7, 13}. Für die Interpretation der früher ausgeführten Konkurrenzexperimente mußte angenommen werden, daß beide Substrate nur zu jeweils gleichem Prozentsatz durch katabole Wege aus Biosynthesewegen abgezogen werden. Der hier beobachtete Katabolismus von

Isoflavonen wird auch aus den von Crombie *et al.*³³ erhaltenen Ergebnissen bei Biosyntheseuntersuchungen von Rotenoiden sichtbar. Die mit einigen Isoflavonen und Isoflavanonen erhaltenen Einbauwerte können als das Ergebnis kataboler Reaktionen mit anschließender Verteilung der Markierung angesehen werden.

Die in bezug auf den B-Ring und die C₃-Kette identischen Abbauwege für die Chalkone **1** und **2** bestätigen und erweitern frühere Befunde bei intakten Pflanzen¹⁸ und zeigen gleichzeitig noch einmal, daß Phloroglucinstrukturen im Vergleich zu Resorcinverbindungen bevorzugt abgebaut werden. Die A-Ringe werden beim Chalkonabbau wohl zu solchen Verbindungen gespalten bzw. abgebaut, die eine gute Verteilung im Primärstoffwechsel erlauben und leicht veratmet werden können; wir schließen dies aus der gemessenen, starken Radioaktivitätsverteilung über alle Fraktionen¹¹ und der Tatsache, daß phenolische Spaltprodukte, auch in Spuren, bisher in den Zellkulturen nicht gefunden wurden. Untersuchungen über den Abbau der A-Ringe von Chalkonen/Flavanonen können daher wohl nur in zellfreien Systemen mit Aussicht auf Erfolg ausgeführt werden. Gleiches gilt auch für die Isoflavone, da von ihnen trotz eines teilweise bemerkenswert hohen Abbaus (Tab. V) Katabolite nur in geringen Spuren nachgewiesen werden konnten. Am besten eignen sich wohl noch Dihydrodaidzein (**10**) und Biochanin A (**12**) für weitere Untersuchungen über den Isoflavonkatabolismus.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 46) und dem Fonds der Chemischen Industrie. Dem Radiochemical Centre, Amersham, Dr. J. A. Spanner, danken wir für wertvolle Hinweise bezüglich der Tritiummarkierung von Isoflavonen.

Prof. Dr. H. Hahlbrock und F. Kreuzaler danken wir für eine Probe von [Ring A-¹⁴C]-markiertem Naringenin.

Experimenteller Teil

Radioaktive Substanzen

Aus früheren Arbeiten standen folgende Substrate zur Verfügung: [β -¹⁴C]-2'.4.4'.6'-Tetrahydroxychalcon-2'- β -D-glucosid (**1**)³⁵, [β -¹⁴C]-2'.4.4'.7-Trihydroxychalcon (**2**)⁹, [β -¹⁴C]-2'.4'-Dihydroxy-4-methoxychalcon (**3**)⁹, [Methyl-¹⁴C]-2'.4'-Dihydroxy-4-

methoxychalcon (**3**)⁹, [4-¹⁴C]-Daidzein (**5**)¹¹, [4-¹⁴C]-Formononetin (**6**)¹¹, [Methyl-¹⁴C]-Formononetin¹¹, [³H]-2'.4'.7-Trihydroxyisoflavan (**11**)¹³, [³H]-Dihydrodaidzein (**10**)¹³.

[6.8.10-¹⁴C₃]-Naringenin (**4**) wurde von Kreuzaler und Hahlbrock³⁵ zur Verfügung gestellt.

[Ring A-U-¹⁴C]-2'.4.4'.7-Trihydroxychalcon (**2**) wurde nach bekannten Methoden³⁴ aus *p*-Hydroxybenzaldehyd und [Ring-U-¹⁴C]-Resacetophenon hergestellt und wie früher beschrieben³⁴ gereinigt (spez. Aktivität 0,08 mCi/mmol). [Ring A-U-¹⁴C]-Formononetin (**6**). *p*-Methoxybenzylcyanid (220 mg), wasserfreies ZnCl₂ (400 mg) und [¹⁴C]-Resorcin (90 mg; Farbwerke Hoechst) wurden entsprechend früheren Angaben¹¹ kondensiert. Das erhaltene Desoxybenzoin (60 mg) wurde in 1,5 ml abs. Pyridin und 0,4 ml abs. Piperidin mit 1 ml *ortho*-Ameisensäureäthylester 22 h auf 115 °C erhitzt. Die Isolierung (22 mg) und Reinigung des Formononetins erfolgte wie früher beschrieben¹¹, spez. Aktivität 0,84 · 10⁹ cpm/mmol.

[Ring A-U-¹⁴C]-Daidzein (**5**) erhielt man durch HJ-Demethylierung von [Ring A-U-¹⁴C]-Formononetin nach früheren Angaben¹¹. Spez. Aktivität 0,81 · 10⁹ cpm/mmol.

[³H]-Isoflavone. Gemäß bekannter Methoden¹⁴⁻¹⁶ wurden die in Tab. I aufgeführten Isoflavone in den genannten Mengen in einem Pyrexglasrohr (6 × 300 mm) in 0,4–0,7 ml Trifluoressigsäureanhydrid gelöst. Platin-(IV)-oxidhydrat wurde in Trifluoressigsäure unter H₂ reduziert und anschließend der Katalysator mehrfach mit Trifluoressigsäureanhydrid gewaschen; ca. 100 mg Katalysator wurden in das Glasrohr in die Isoflavonlösung eingetragen und diese mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe einer für die Hydrolyse des Anhydrids ausreichenden Menge an ¹HO³H wurden die Ampullen unter Vakuum (0,1 Torr) abgeschmolzen. Die Pyrexrörchen schüttelte man 24 Stunden bei 90–140 °C in einem Paraffinölbath. Nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff wurden die Ampullen geöffnet und das Lösungsmittel durch Umfrieren in einer Vakuumapparatur entfernt. Der feste Rückstand wurde in 10 ml Methanol gelöst, der Katalysator durch Zentrifugation entfernt und die Isoflavone zur Entfernung von labilen ³H insgesamt viermal aus methanolischer Lösung zur Trockne gebracht. Die Isoflavone wurden sodann durch mehrfache Kieseldünnenschichtchromatographie in den Laufmitteln L₅, L₆, L₇ und L₈ bis zur konstanten spez. Radioaktivität gereinigt.

[³H]-3'.4'.7-Trihydroxyisoflavan (**9**) (30 mg) wurde entsprechend unseren früheren Angaben¹³ in einer Wilzbach-Apparatur während 4 Wochen tritiert.

Die papierchromatographische Reinigung (L_2 , L_3 , L_8) ergab ein Produkt mit einer spez. Aktivität von $1,5 \text{ mCi}/\text{mmol}$.

[4- ^{14}C]-Dihydrodaidzein (**10**). 3,25 mg [4- ^{14}C]-Daidzein wurden in 0,8 ml NaOH (0,1 N) gelöst und nach Zugabe von 10 ml Wasser in Gegenwart von 2 mg Pd-Tierkohle-Katalysator bei Raumtemperatur unter starkem Röhren mit H_2 -Gas hydriert. Nach Entfernung des Katalysators wurde schwach angesäuert, mit Äther ($3 \times 20 \text{ ml}$) extrahiert und der Rückstand der ätherischen Lösung durch Papierchromatographie (L_3 , L_9 , L_2) gereinigt. Ausbeute 2,2 mg, spez. Aktivität $1,2 \cdot 10^8 \text{ cpm}/\text{mmol}$.

[U- ^{14}C]-Biochanin A (**12**) wurde erhalten aus Extrakten von *Cicer arietinum*, die 5 Tage $^{14}\text{CO}_2$ assimiliert hatten³. Die Reinigung erfolgte nach früheren Angaben⁹. Spez. Aktivität $5,5 \cdot 10^8 \text{ cpm}/\text{mmol}$.

Nichtmarkierte Substrate

3',4',7-Trihydroxyisoflavan (**9**)^{36,37}, 6,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavan (Texasin, **8**)^{38,39} und 6,7,4'-Trihydroxyisoflavan (**7**)²⁷ wurden nach bekannten Synthesen hergestellt.

Zellsuspensionskulturen

Die Anzucht und Haltung der Zellsuspensionskulturen von *Phaseolus aureus* Roxb., *Glycine max* und *Pisum sativum* sind bereits beschrieben worden^{4,5,8,40}. Die Kulturen wurden jeweils gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase benutzt.

Gabe radioaktiver Substrate an Zellkulturen

Sämtliche Arbeiten wurden unter streng aseptischen Bedingungen ausgeführt. Die Substrate wurden entweder sofort in Nährmedium gelöst oder vorher in wenig Äthylenglykolmonomethyläther gelöst und dann mit Nährmedium versetzt. Stabile Verbindungen wurden durch Autoklavieren, andere durch Filtration sterilisiert. Die Substrate wurden, wenn nicht anders angegeben, in $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, bzw. 10^{-4} M Lösung eingesetzt. Die Fraktionierung von Zell-Material erfolgte nach beschriebenen Verfahren^{8,11}. Die Prüfung der Zellkulturen auf Sterilität erfolgte nach⁷.

Anaerobe Inkubation von Zellkulturen

Reinststickstoff perlte durch 2 Waschflaschen mit einer 25-prozentigen Lösung von Pyrogallol in 30-prozentiger KOH, bevor er in die Zellsuspensionskulturen geleitet wurde. Die Kulturen wurden 30 min lang mit diesem sauerstofffreien, durch Watte-

filter sterilisierten Stickstoff unter Schütteln (125 rpm) durchströmt und dann das Substrat zugesetzt. Während der Versuche (1 bzw. 3 Stunden) wurde weiterhin N_2 durch die Kulturen geleitet. Die Kontrollkulturen wurden gleich lang anaerob gehalten und wieder, nach Substratzugabe, normal belüftet.

Chromatographiesysteme

Folgende Lösungsmittelsysteme wurden verwendet: L_1 : Pyridin/Eisessig/Wasser = 1/2/27; L_2 : Benzol/Eisessig/Wasser = 125/72/3; L_3 : 15-prozentige Essigsäure; L_4 : Benzol/Äthylacetat/Methanol/Petroläther = 6/4/1/7; L_5 : Toluol/Ameisensäureäthylester/Ameisensäure = 5/4/1; L_6 : Chloroform/Isopropanol = 10/1; L_7 : Benzol/Äthylacetat/Methanol/Petroläther = 6/4/1/1; L_8 : *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 4/1/1; L_9 : 30-prozentiges Methanol.

Radioaktivitätsmessungen

Die Messung löslicher Produkte erfolgte nach früheren Angaben¹¹. Unlösliche Substanzen wurden im Mikromatautomaten (Fa. Berthold/Friesike, Karlsruhe) verbrannt⁴¹ und dann die Proben wie genannt¹¹ ausgezählt.

Enzymatische Hydroxylierung von Daidzein

1 Teil Frischgewicht der Zellkulturen wurden mit 0,5 Teilen Quarzsand und 0,5 Teilen Kalium-Phosphatpuffer (0,17 M, pH 7,5) im Mörser zerrieben und bei $20\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1,76 mg Ascorbinsäure/ml versetzt und zur Entfernung phenolischer Verbindungen mit Dowex-1 (äquilibriert mit Extraktionspuffer) unter Röhren behandelt (6 g/100 g Frischgewicht). Nach 30-minütigem Röhren wird über Glaswolle filtriert und im Filtrat eine Ammonsulfatfällung (80% Sättigung) durchgeführt. Das abzentrifugierte Protein wird in Kaliumphosphatpuffer (0,3 M, pH 7,5) gelöst, wobei $1/10$ des Volumens vor der Ammonsulfatfällung eingesetzt wurden. Der Enzymansatz enthielt: Proteinlösung (0,2 ml), Ascorbinsäurelösung (5 μl mit 3,7 mg/0,15 ml aqua dest.), EDTA-Lösung (5 μl mit 7,8 mg/0,15 ml aqua dest.), Ammonsulfat-Lösung (20 μl mit 417 mg/0,6 ml aqua dest.), Substrat (10^{-4} M). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 75 min. Protein wurde nach der Biuretmethode bestimmt. Unter den geschilderten Bedingungen wurde *p*-Cumarsäure zu ca. 25% in Kaffeesäure umgewandelt, während mit Daidzein ein Umsatz von ca. 15% gemessen wurde.

¹ A. W. Galston, Perspectives in Phytochemistry, p. 193 (J. B. Harborne u. T. Swain, ed.), Academic Press, London-New York 1969.

² W. Barz u. W. Hösel, The Flavonoids (T. J. Mabry, J. B. Harborne, ed.), Chapman and Hall, Ltd., im Druck.

- ³ W. Hösel, P. D. Shaw u. W. Barz, *Z. Naturforsch.* **27b**, 946 [1972].
⁴ J. Berlin u. W. Barz, *Planta (Berl.)* **98**, 300 [1971].
⁵ B. Janistyn, W. Barz u. R. Pohl, *Z. Naturforsch.* **26b**, 973 [1971].
⁶ W. Barz, F. Mohr u. E. Teufel, *Phytochemistry*, im Druck.
⁷ J. Berlin, W. Barz, H. Harms u. K. Haider, *FEBS-Letters* **16**, 141 [1971].
⁸ H. Harms, K. Haider, J. Berlin, P. Kiss u. W. Barz, *Planta (Berl.)* **105**, 342 [1972].
⁹ W. Barz u. H. Grisebach, *Z. Naturforsch.* **22b**, 627 [1967].
¹⁰ E. Wong, P. J. Mortimer u. T. A. Geissmann, *Phytochemistry* **4**, 89 [1965].
¹¹ W. Barz, Ch. Adamek u. J. Berlin, *Phytochemistry* **9**, 1735 [1970].
¹² H. Grisebach u. H. Zilg, *Z. Naturforsch.* **23b**, 494 [1968].
¹³ J. Berlin, P. M. Dewick, W. Barz u. H. Grisebach, *Phytochemistry* **11**, 1689 [1972].
¹⁴ W. G. Brown u. J. L. Garnett, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 5272 [1958].
¹⁵ J. L. Garnett u. R. J. Hodges, *Chem. Comm.* **1967**, 1220.
¹⁶ M. L. Timmons, C. G. Pitt u. M. E. Wall, *Tetrahedron Letters* **1969**, 3129.
¹⁷ Dr. J. A. Spanner, Radiochemical Centre Amersham, England, persönliche Mitteilung.
¹⁸ L. Patschke, D. Hess u. H. Grisebach, *Z. Naturforsch.* **19b**, 1114 [1964].
¹⁹ A. K. Chatterjee u. L. N. Gibbins, *J. Bacteriol.* **100**, 594 [1969].
²⁰ T. Minamikawa, N. P. Jayasankar, B. A. Bohm, J. E. P. Taylor u. G. H. N. Towers, *Biochem. J.* **116**, 889 [1970].
²¹ K. Weinges, W. Bähr, W. Ebert, K. Göritz u. H.-D. Marx, *Fort. Chem. org. Naturstoffe* **27**, 158 [1969].
²² V. S. Butt, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 123 [1972].
²³ C. O. Müller, *Planta (Berl.)* **87**, 26 [1969].
²⁴ P. F. T. Vaughan u. V. S. Butt, *Biochem. J.* **113**, 109 [1969].
²⁵ P. F. T. Vaughan, V. S. Butt, H. Grisebach u. L. Schill, *Phytochemistry* **8**, 1371 [1969].
²⁶ A. Friedländer u. B. Sklarz, *Experientia* **27**, 762 [1971].
²⁷ P. Gyorgy, K. Murata u. H. Ikehota, *Nature* **203**, 870 [1964].
²⁸ A. B. Oliveira, O. R. Gottlieb u. W. D. Ollis, *An. Acad. Brasil. Cienc.* **40**, 147 [1968]; *C. A.* **70**, 44797 [1969].
²⁹ B. E. Ellis, *FEBS-Letters* **18**, 228 [1971].
³⁰ B. E. Ellis, *Planta (Berl.)* **111**, 113 [1973].
³¹ M. H. Zenk, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 123 [1972].
³² B. Fritig, Dissertation, Universität Straßburg 1968.
³³ L. Crombie, P. M. Dewick u. D. A. Whiting, *J. Chem. Soc., Perkin I* **1973**, 1285.
³⁴ L. Patschke, W. Barz u. H. Grisebach, *Z. Naturforsch.* **21b**, 201 [1966].
³⁵ F. Kreuzaler u. K. Hahlbrock, *FEBS-Letters* **28**, 69 [1972].
³⁶ M. L. Dhar, N. Narasimhachari u. T. R. Seshadri, *J. Sci. Ind. Research* **14 B**, 73 [1955]; *C. A.* **50**, 1793 [1956].
³⁷ K. Fukui, *Nippon Kagaku Zasshi* **84**, 189 [1963]; *C. A.* **59**, 1392 b [1963].
³⁸ S. F. Dyke, W. D. Ollis, M. Sainsbury u. J. S. P. Schwarz, *Tetrahedron* **20**, 1331 [1964].
³⁹ W. Böhringer, Dissertation, Universität München 1966.
⁴⁰ K. Hahlbrock, E. Kuhlen u. T. Lindl, *Planta (Berl.)* **99**, 311 [1971].
⁴¹ G. N. Gupta, *Anal. Chem.* **38**, 1356 [1966].