

Metabolismus von Chloridazon und Antipyrin in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Metabolism of Chloridazon and Antipyrin in Plant Cell Suspension Cultures

E. Keller, J. Eberspächer und F. Lingens

Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, D-7000 Stuttgart 70

Z. Naturforsch. 34 c, 914–922 (1979); eingegangen am 25. Mai 1979

Herrn Professor Dr. F. Mechelke zum 60. Geburtstag gewidmet

Cell Suspension Cultures, Chloridazon, Antipyrin, Herbicides, Metabolism of Aromatic Compounds, Hydroxylation

Metabolism of chloridazon, the active ingredient of the herbicide Pyramin, was studied in cell suspension cultures of *Beta vulgaris* (sugar beet), *Papaver bracteatum* (poppy), *Phaseolus aureus* (mung bean), *Glycine max* (soya bean), *Nicotiana tabacum* (tobacco), and *Petroselinum hortense* (parsley). Metabolism of the analgetical and antipyretical drug antipyrin (phenazon) was also investigated.

In *Beta vulgaris* and in *Papaver bracteatum* small amounts of both compounds are hydroxylated, the main quantity remaining unmetabolized. In *Beta vulgaris* chloridazon is converted to *p*-hydroxy-chloridazon, whereas antipyrin yields three different compounds, namely *p*-hydroxyantipyrin, hydroxymethylantipyrin and a further hydroxyantipyrin, which was identified as *o*- or *m*-hydroxy-antipyrin. Cell suspension cultures of *Papaver bracteatum* hydroxylate chloridazon to *p*- and *m*-hydroxychloridazon, respectively, and antipyrin to *p*-hydroxyantipyrin and hydroxymethylantipyrin respectively. The metabolites, with exception of *o*- or *m*-hydroxyantipyrin, were identified by spectroscopic methods. The structure of the latter metabolite was established by comparing *RF*-values of the metabolite and the compound synthetically available.

Metabolism in sugar beet and poppy cultures is similar to metabolism in mammals rather than in bacteria. Cell suspensions of chloridazon-insensitive sugar beet and of chloridazon-sensitive poppy are severely inhibited in growth by chloridazon, whereas antipyrin, even when applied in high concentrations, does not induce growth inhibition. In soya bean, mung bean, tobacco, and parsley neither chloridazon nor antipyrin were found to be metabolized.

Einleitung

Pyramin® wird seit Jahren in der Landwirtschaft als rübenselektives Unkrautvernichtungsmittel in großem Umfang angewendet. Bei richtiger Dosierung werden Rübenpflanzen durch das Herbizid Pyramin nicht geschädigt. Als Ursachen für die Unempfindlichkeit von *Beta vulgaris* werden zum einen die geringe Aufnahme der herbiziden Wirksubstanz Chloridazon (früher Pyrazon genannt) und zum anderen ein verhältnismäßig rascher Metabolismus von Chloridazon in der Rübe diskutiert. Die bisherigen Untersuchungen über den Abbau von Chloridazon wurden an insterilen Rüben ausgeführt [1–3]. Dabei wurde als Abbauprodukt der nicht mehr herbizid wirksame heterocyclische Teil des Chloridazonmoleküls gefunden. Deshalb wurde die Ansicht vertreten, daß die Rüben die Wirksubstanz des Pyramins bis zu dieser, Chloridazonheterocyclus genannten, herbizid-inaktiven Verbindung abbauen können. Dieses Abbauprodukt ist aber identisch mit

dem Endprodukt des eingehend untersuchten mikrobiellen Chloridazonabbaus [4–8].

Versuche mit steril aufgezogenen Rüben zeigten, daß der Chloridazonheterocyclus nur noch in Spuren in ganzen Rübenpflanzen vorhanden ist; dafür könnten auch Bakterien verantwortlich sein, da an oberflächensterilisierten Rübenblättern in 15% der Fälle Chloridazon-abbauende Bakterien nachgewiesen wurden [9].

Um bakterielles Wirken vollkommen auszuschließen, wurden Versuche über den Metabolismus von Chloridazon mit Zellkulturen von der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) unternommen. Zum Vergleich mit der Chloridazon-unempfindlichen Zuckerrübe wurden entsprechende Untersuchungen auch mit Zellkulturen des Chloridazon-empfindlichen Mohns (*Papaver bracteatum*) und mit Zellkulturen von Sojabohne (*Glycine max*), Mungbohne (*Phaseolus aureus*), Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Petersilie (*Petroselinum hortense*) angestellt.

Chloridazon-abbauende Bakterien können als Substrat auch Antipyrin, ein früher häufig angewendeter Analgeticum und Antipyreticum, verwenden und auf

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Lingens.

0341-0382 / 79 / 1100-0914 \$ 01.00/0



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.

gleiche Weise abbauen [10]. Deshalb wurden alle oben aufgeführten Zellkulturen daraufhin untersucht, ob sie auch Antipyrin zu metabolisieren vermögen.

Material und Methoden

Abkürzungen

Chloridazon, 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2 H)-pyridazinon; *m*-Hydroxychloridazon, 5-Amino-4-chlor-2-(3-hydroxyphenyl)-3(2 H)-pyridazinon; *p*-Hydroxychloridazon, 5-Amino-4-chlor-2-(4-hydroxyphenyl)-3(2 H)-pyridazinon; Antipyrin (Phenazon), 2,3-Dimethyl-1-phenyl-pyrazolon(5); *o*-Hydroxyantipyrin, 2,3-Dimethyl-1-(2-hydroxyphenyl)-pyrazolon(5); *m*-Hydroxyantipyrin, 2,3-Dimethyl-1-(3-hydroxyphenyl)-pyrazolon(5); *p*-Hydroxyantipyrin, 2,3-Dimethyl-1-(4-hydroxyphenyl)-pyrazolon(5); Hydroxymethylantipyrin, 3-Hydroxymethyl-2-methyl-1-phenyl-pyrazolon(5).

Geräte

UV-Spektren wurden mit einem Zeiss-Spektrographen DMR 21 aufgenommen. IR-Spektren wurden mit einem Leitz-Spektrographen in KBr mit einer Mikroeinrichtung gemessen. Massenspektren wurden mit einem Varian MAT 311 aufgenommen, NMR-Spektren mit einem 90-MHz-Gerät von Bruker. Die HPLC-Einrichtung stammte von der Firma Knauer. Dünnschichtchromatogramme wurden quantitativ mit einem Dünnschichtscanner von Zeiss ausgewertet.

Chemikalien

Chloridazon stammte von der BASF, Antipyrin von Riedel de Haen. Als Caseinhydrolysat wurde Bacto Casamino Acids von Difco Laboratories, Detroit, Michigan, verwendet. Sephadex LH 20 wurde von Pharmacia, alle übrigen Chemikalien, einschließlich der Kieselgelfertigplatten, wurden von Merck bezogen.

Dünnschichtchromatographie

1. Laufmittelsysteme: LM I Benzol/Ethanol/Aceton = 9/2/1; LM II Benzol/Dioxan/Eisessig = 90/25/2; LM III i-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser = 4/1/1; LM IV Aceton/Dioxan/konz. Ammoniak = 45/45/10; LM V Benzol/Essigester/Eisessig = 60/48/8; LM VI Chloroform/Methanol = 9/1.

2. Sprühreagenzien: Auf phenolische OH-Gruppen wurde mit Folin-Ciocalteus Reagenz [11] und auf Glykoside mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz [11] geprüft.

Saline

5 g NaCl; 0,12 g MgSO₄ × 7H₂O; 1000 ml deion. H₂O.

Pflanzenzellkulturen

Folgende Zellkulturen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt: Zellkultur der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) von Prof. Zenk, Bochum, Zellkultur des Mohns (*Papaver bracteatum*) von Prof. Czygan, Würzburg, Zellkulturen von Sojabohne (*Glycine max*), Mungbohne (*Phaseolus aureus*), Petersilie (*Petroselinum hortense*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) von Prof. Barz, Münster.

Medien

Zuckerrüben: Medium nach Gamborg *et al.* [12], dem zusätzlich 2 g/l Caseinhydrolysat zugesetzt wurde. Mohn: Medium nach Abou-Mandour [13].

Sojabohne und Petersilie: Medium nach Gamborg *et al.* [12].

Tabak: Medium nach Gamborg *et al.* [12], bei dem die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäurekonzentration verdoppelt wurde und dem zusätzlich 1 mg/l 3-Indolyl-essigsäure, 500 µg/l 2-Naphthyl-essigsäure und 4 ml einer Stammlösung (5 mg auf 100 ml) Kinetin zugesetzt wurden.

Mungbohne: Medium nach Gamborg [14].

Sämtliche Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Züchtungsbedingungen

In Flüssigkultur wurden die Zellen alle 8 bis 14 Tage in neues Medium transferiert (Inoculum: 1 – 2 g Naßgewicht); gezüchtet wurde in 200- oder 250-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 50 oder 100 ml Medium bei 25 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 Upm (Rundschüttler) in Dunkelheit.

Wenn der Metabolismus der betreffenden Substanzen untersucht wurde, so betrug die Inkubationsdauer 3 bis 6 Wochen.

Applikation der zu untersuchenden Verbindungen

Chloridazon wurde entweder vor dem Autoklavieren dem Medium zugegeben oder in Dimethylsulfoxid

(DMSO) gelöst dem Medium steril zupipettiert, wobei die Endkonzentration an DMSO im Medium höchstens 0,5% betrug.

Antipyrin wurde entweder in Wasser oder DMSO gelöst dem Medium steril zupipettiert.

Aufarbeitung der Ansätze nach Beendigung der Inkubationen

Nach Beendigung der Inkubationen wurden die Pflanzenzellen vom Medium bei 5000 Upm abzentrifugiert bzw. abfiltriert.

1. Aufarbeitung der Zellen

Die Zellen wurden mit ca. 100 ml Saline gewaschen. Das Naßgewicht wurde nach einer Stunde Lufttrocknung bestimmt. Danach wurden die Zellen je nach Menge in 10 bis 50 ml Ethanol suspendiert, eine Minute mit Ultraschall behandelt und eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Der Rückstand wurde je nach der vorher abfiltrierten Zellmenge in 1 bis 5 ml Ethanol aufgenommen. Die so bereiteten Zellextrakte wurden dünnenschichtchromatographisch untersucht.

2. Aufarbeitung der Medien

Die abfiltrierten Medien wurden einrotiert (Badtemp. ca. 50 °C); der Rückstand wurde dreimal mit je 10 ml Methanol kurz aufgekocht, und nach dem Erkalten wurde von dem unlöslichen Rückstand abfiltriert. Die vereinigten Extrakte wurden erneut einrotiert und in dem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch aufgenommen, in dem anschließend chromatographiert wurde.

a) Säulenchromatographie

Medien von Rübenzellkulturen, die mit Chloridazon inkubiert worden waren, wurden einer Vorreinigung durch Chromatographie an Sephadex LH 20 (Säule: 3 × 100 cm, Laufmittel: Wasser/Ethanol = 1/1; Fraktionen à 11 ml) unterzogen. Die Fraktionen 70–80 enthielten p-Hydroxychloridazon, das allerdings noch mit Chloridazon verunreinigt war. Die Fraktionen wurden vereinigt, einrotiert und in dem Lösungsmittel aufgenommen, mit dem die nächsten chromatographischen Reinigungsschritte unternommen wurden.

b) Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die wie oben beschrieben aufgearbeiteten Medien wurden in 4–6 ml Lösungsmittel gelöst und mit

einer 2-ml-Probenschleife auf die HPLC-Säule gebracht. Der erste HPLC-Reinigungsschritt war immer eine Trennung an LiChrosorb RP 8 bzw. LiChroprep RP 8 (Edelstahlsäule 8 × 250 mm) mit unterschiedlichen Laufmitteln bzw. Laufmittelgradienten, die bei den jeweiligen Trennungen angegeben werden. Das Eluat wurde mit einem UV-Detektor (254 nm) bzw. RI-Detektor gemessen und mit einem Kompenstationsschreiber aufgezeichnet.

Ergebnisse

1. Inkubationen mit Chloridazon

a) *Beta vulgaris*

Zellkulturen der Zuckerrübe wurden mit Chloridazon in verschiedenen Konzentrationen (16 bis 800 mg/l) unterschiedlich lang (zwischen 2 und 5 Wochen) inkubiert. Variiert wurde auch die Vorinkubationszeit, d.h. die Zeit zwischen dem Beimpfen und der Zugabe des Chloridazons zum Inkubationsansatz (zwischen 0 und 10 Tagen). Im Laufe der Inkubation wurde durch Dünnschichtchromatographie in LM I ($R_F = 0,44$) im Medium ein Metabolit nachgewiesen, dessen Erscheinen wenig von den Vorinkubationszeiten, aber stark von den eingesetzten Chloridazonkonzentrationen abhing. Die beste Umsetzung zeigte sich bei einer Konzentration von 200 mg/l Chloridazon. Die Kinetik der Bildung des Metaboliten zeigt Abb. 1.

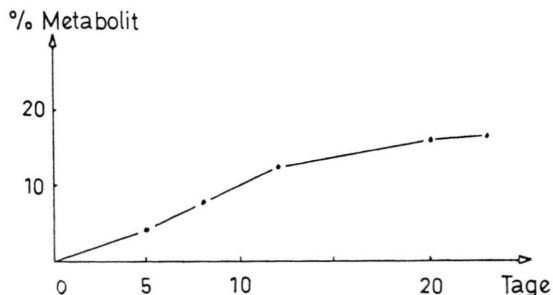


Abb. 1. Bildungsgeschwindigkeit des Metaboliten. Versuchsbedingungen: 100 ml Medium, 2 g Inoculum, 20 mg Chloridazon, vor dem Sterilisieren dem Medium zugegeben. In bestimmten Intervallen wurde eine kleine Menge des Mediums steril abpipettiert und abzentrifugiert; 20 µl davon wurden auf Kieselgel-Platte aufgetragen und in LM I entwickelt. Das Chromatogramm wurde mit dem Dünnschichtscanner aufgezeichnet und die Fläche des Peaks mittels einer Eichkurve ausgewertet.

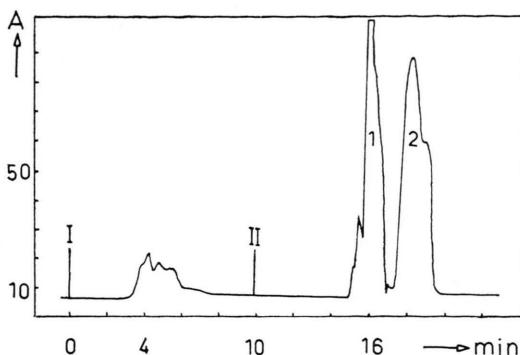


Abb. 2. Elutionsdiagramm zur Reinigung von *p*-Hydroxychloridazon aus *Beta vulgaris*-Medium nach Vorreinigung an Sephadex LH 20. I=Start mit $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=9/1$; II=Elution mit $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=1/1$. Aufgabevolumen: 2 ml; Elutionsgeschwindigkeit: 2 ml/min; Druck: 30 bar; Säule: Edelstahl 8×250 mm; Füllmaterial: LiChrosorb RP 8 (10 μm).

Reinigung des Metaboliten

Das Medium wird zunächst an Sephadex LH 20 vorgereinigt. Dann folgt eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie an Li Chrosorb RP 8 (10 μm). Abb. 2 zeigt das Elutionsdiagramm. Fraktion 1 enthält den gesuchten Metaboliten, Fraktion 2 verbliebenes Chloridazon aus der Vorreinigung. Die gesuchte Verbindung wird aus Wasser umkristallisiert.

Charakterisierung des Metaboliten

Reaktion mit Folin-Ciocalteus-Reagenz auf phenolische OH-Gruppen: positiv.

UV-Spektrum:

Wasser pH 7 $\lambda_{1\text{max}}=285 \text{ nm}$

$\lambda_{2\text{max}}=224 \text{ nm}$;

Wasser pH 13 $\lambda_{1\text{max}}=288 \text{ nm}$

$\lambda_{2\text{max}}=224 \text{ nm}$.

Massenspektrum (MS):

$m/e=237$ (100%, M^+), 121 (32%, $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+$), 93 (80%, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}^+$), 65 (21%, C_5H_5^+).

Infrarotspektrum (IR):

charakteristische Banden bei 1640, 1610, 1580, 1510, 1415 und 1200 cm^{-1} .

NMR-Spektrum:

2 Dubletts (beide $J=8 \text{ Hz}$) bei $\delta=6,8$ und 7,25 ppm jeweils mit den für para-disubstituierte Benzole charakteristischen „inneren Banden“ (jeweils 2 H), Singlett bei $\delta=7,7 \text{ ppm}$ (1 H).

$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{Cl O}_2$ Molekulargewicht:

Ber. 237,030

Gef. 237,029 (massenspektrometrisch).

Der Metabolit wird aufgrund der spektroskopischen Daten als *p*-Hydroxychloridazon identifiziert.

Wachstumshemmung

Zellsuspensionskulturen von *Beta vulgaris* wurden mit unterschiedlichen Mengen Chloridazon inkubiert; nach Versuchsende wurde das Zellgewicht (Naßgewicht) bestimmt. Die Abhängigkeit des Zellgewichts von der Chloridazonkonzentration ist aus Abb. 3 ersichtlich.

Zellenaufarbeitung

Es wurde untersucht, ob und in welchen Mengen die Zellen Chloridazon enthalten. Der hoch ankonzentrierte Zellextrakt wurde dünnenschichtchromatographisch untersucht. Mit der angewandten Methode konnte in geringem Maße Chloridazon (ca. 1% der eingesetzten Menge) nachgewiesen werden.

b) *Papaver bracteatum*

Die Parameter Vorinkubationszeit, Inkubationszeit und Chloridazonkonzentration wurden in denselben Maßen wie bei den Inkubationen mit *Beta vulgaris* beschrieben variiert.

Unter den gleichen Bedingungen und in demselben Maße wie bei *Beta vulgaris* tritt der Metabolit *p*-Hydroxychloridazon auf. Bei der Aufarbeitung und Ankonzentrierung des Mediums konnte eine weitere Folin-positive Verbindung mit $R_F=0,52$ in LM I festgestellt werden.

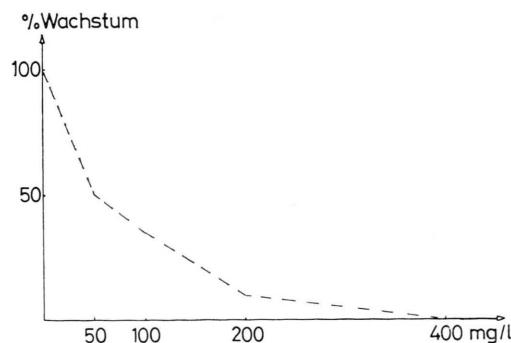


Abb. 3. Relatives Zellwachstum von *Beta vulgaris* in Abhängigkeit von der Chloridazonkonzentration. Inoculum: 2 g; Inkubationsdauer: 14 Tage.

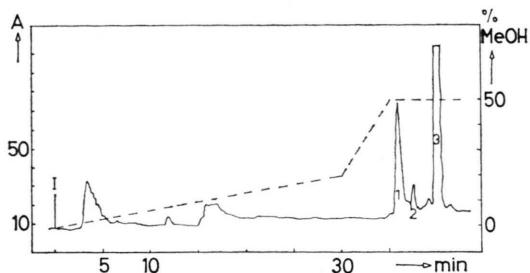


Abb. 4. Elutionsdiagramm des *Papaver*-Mediums nach Inkubation mit Chloridazon. I=Start. Aufgabevolumen 2 ml; Elutionsgeschwindigkeit: 3 ml/min; Druck: 50 bar; Säule: Edelstahl 8×250 mm; Füllmaterial: LiChroprep RP 8 (5–20 μ m). - - - Wasser/Methanol-Gradient: 0-50% Methanol.

Reinigung des Metaboliten

Das Medium wird mittels HPLC aufgearbeitet. Abb. 4 zeigt das Elutionsprofil. Fraktion 1 enthält das schon charakterisierte *p*-Hydroxychloridazon, Fraktion 2 den weiteren Metaboliten und Fraktion 3 das nicht umgesetzte Chloridazon. Fraktion 1 und 2 werden mit dem angegebenen Gradienten rechromatographiert.

Charakterisierung des Metaboliten

Reaktion mit Folin-Reagenz auf phenolische OH-Gruppen: positiv.

UV:

Wasser pH 7 $\lambda_{1\text{max}} = 283 \text{ nm}$, $\lambda_{2\text{max}} = 224 \text{ nm}$
Wasser pH 13 $\lambda_{2\text{max}} = 285 \text{ nm}$,

MS: $m/e = 237$ (100%, M^+), 121 (9,2%, $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2^+$), 93 (68%, $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}^+$), 65 (25%, C_5H_5^+).

IR: charakteristische Banden bei 1640, 1580, 1470, 1415, 1240, 1210, 880 und 818 cm^{-1} .

$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{ClO}_2$ Molekulargewicht:

Ber. 237,030,

Gef. 237,029 (massenspektrometrisch).

Durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit synthetischem *m*-Hydroxychloridazon wird der Metabolit als in *m*-Stellung hydroxyliertes Chloridazon identifiziert.

Wachstumshemmung

Die Hemmung des Wachstums der Mohnzellen in Abhängigkeit von der Chloridazonkonzentration zeigt Abb. 5.

Zellextrakt

Im Mohn-Zellextrakt konnten nur sehr geringe Chloridazonmengen dünnenschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

c) *Glycine max* (Sojabohne) *Phaseolus aureus* (Mungbohne), *Nicotiana tabacum* (Tabak) und *Petroselinum hortense* (Petersilie)

Vorinkubationszeit, Inkubationszeit und Chloridazonkonzentration wurden wie bei der Zuckerrübe beschrieben variiert. Bei sämtlichen Inkubationen konnte dünnenschichtchromatographisch (LM I–VI) keine Metabolisierung festgestellt werden. Selbst in

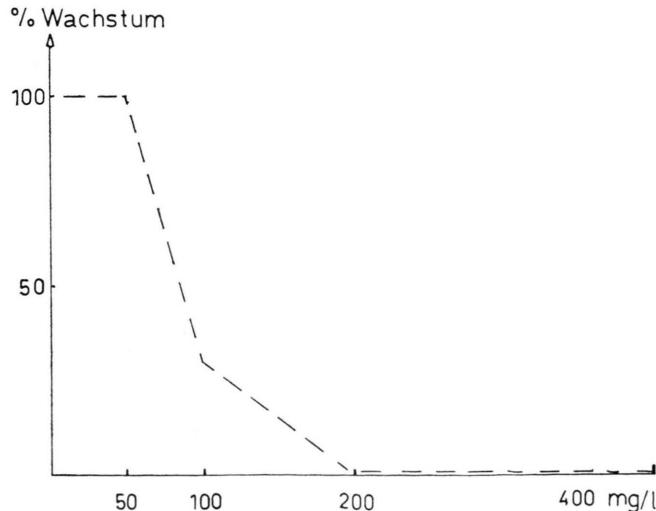


Abb. 5. Relatives Zellwachstum von *Papaver bracteatum* in Abhängigkeit von der Chloridazonkonzentration. Inoculum: 2 g; Inkubationsdauer: 18 Tage.

einem stark ankonzentrierten Medienextrakt konnten weder die bei *Beta vulgaris* und *Papaver bracteatum* charakterisierten Verbindungen noch andere Metaboliten identifiziert werden.

Deshalb wurde versucht, eine eventuelle Abnahme der eingesetzten Chloridazonmenge quantitativ mit Hilfe eines Dünnenschichtscanners zu bestimmen. Dazu wurden die Inkubationsmedien mit so viel Chloridazon versetzt, wie gerade noch gut dünnenschichtchromatographisch auszuwerten ist (16 mg/l Chloridazon). Alle 4–5 Tage wurde steril ein Milliliter Medium entnommen, von den mit abpipettierten Zellen abzentrifugiert, 20 µl wurden auf eine Dünnenschichtplatte aufgetragen und nach dem Entwickeln in LM I mit einem Dünnenschichtscanner ausgewertet. Bei diesen Versuchen konnte keine Abnahme der eingesetzten Chloridazonmenge festgestellt werden.

2. Inkubationen mit Antipyrin

a) *Beta vulgaris*

Suspensionskulturen der Zuckerrübe wurden mit Antipyrin inkubiert. Die Konzentration und die beiden anderen Variablen lagen im selben Bereich wie bei den Versuchen mit Chloridazon. Auf der Dünnenschichtplatte wurden 3 Metaboliten entdeckt; diese traten am intensivsten bei Antipyrinkonzentrationen zwischen 100 und 200 mg/l auf.

Reinigung der Metaboliten

Das Medium wird durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie über eine RP 8-Säule mit einem

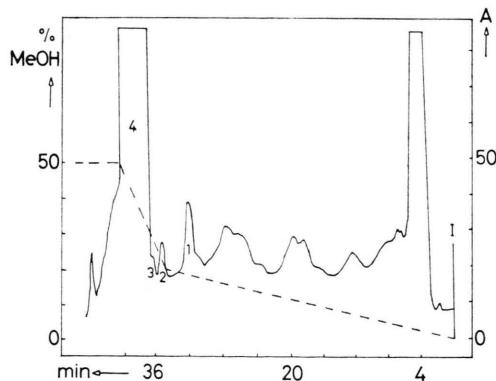


Abb. 6. Elutionsdiagramm des *Beta vulgaris*-Mediums nach Inkubation mit Antipyrin. I=Start. Aufgabevolumen 2 ml; Elutionsgeschwindigkeit: 3 ml/min; Druck: 50 bar; Säule: Edelstahl 8×250 mm; Füllmaterial: LiChroprep RP 8 (5–20 µm). - - - Wasser/Methanol-Gradient: 0-50% Methanol.

Stufengradienten aus Wasser/Methanol aufgearbeitet. Abb. 6 zeigt das Elutionsprofil. Fraktionen 1, 2 und 3 enthalten die gesuchten Metaboliten, Fraktion 4 das eingesetzte, aber nicht umgesetzte Antipyrin. Fraktionen 1, 2 und 3 wurden gesammelt und über dieselbe Säule rechromatographiert.

Charakterisierung der Metaboliten

Metabolit 1 (Fraktion 1).

*R*_F-Wert: 0,32 (LM I).

Reaktion mit Folin-Reagenz: negativ.

UV:

Wasser pH 7: $\lambda_{1\max} = 261$ nm, $\lambda_{2\max} = 241$ nm,
Wasser pH 13: Schulter bei 260 nm.

MS: $m/e = 204$ (100%, M^+), 173 (6,25%, $M - CH_2OH$), 158 (6,25%, $M - CH_3 - CH_2OH$), 112 (32,5%, $M - C_6H_5 - CH_3$), 105 (26%, $C_6H_5N_2^+$), 93 (56%, $M - CH_3 C_6H_5 - (H_2O + H)$), 77 (47%, $C_6H_5^+$).

NMR: Singlett bei $\delta = 3,17$ ppm (3 H). Dublett bei $\delta = 4,58$ ppm ($J = 0,8$ Hz) (2 H). Tripplett bei $\delta = 5,53$ ppm ($J = 0,6$ Hz) (1 H). Aromatenprotonen bei $\delta = 7,41$ ppm (5 H).

$C_{11}H_{12}N_2O_2$ Molekulargewicht:

Ber. 204,0899

Gef. 204,089 (massenspektrometrisch).

Der M^+ -Peak weist auf ein hydroxyliertes Antipyrin. Es handelt sich nicht um ein Phenol, die Folin-Reaktion ist negativ. Die Abspaltung einer $CH_2 - OH$ -Gruppe im Massenspektrum und die vergleichende Analyse des NMR-Spektrums mit dem des Antipyrins beweist die Identität mit Hydroxymethylantipyrin.

Metabolit 2 (Fraktion 2).

*R*_F-Wert 0,28 (LM I)

Reaktion mit Folin positiv.

UV:

Wasser pH 7 $\lambda_{1\max} = 252$ nm;
 $\lambda_{2\max} = 227$ nm;

Schulter bei 241 nm.

Wasser pH 13 $\lambda_{1\max} = 248$ nm;
Schulter bei 290 nm.

MS: $m/e = 204$ (100%, M^+), 189 (7,4%, $M - CH_3$), 175 (11%, $M - CHO$), 121 ((20% $HO - C_6H_4 - N_2^+$), 96 (33%, $M - C_6H_4OH - CH_3$), 93 (15%, $C_6H_4OH^+$).

NMR: Dublett bei $\delta = 2,23$ ppm ($J = 0,8$ Hz) (3 H). Singlett bei $\delta = 3,09$ ppm (3 H), Triplet bei $\delta = 5,37$ ppm ($J = 0,8$ Hz) (1 H). 2 Dubletts (beide $J = 9$ Hz) bei 6,57 ppm und 6,92 ppm jeweils mit den für *para*-disubstituierte Benzole charakteristischen „inneren Banden“ (je 2 H).

$C_{11}H_{12}N_2O_2$ Molekulargewicht:

Ber. 204,0899

Gef. 204,089 (massenspektrometrisch).

Metabolit 2 wird aufgrund der spektroskopischen Daten als *p*-Hydroxyantipyrin charakterisiert.

Metabolit 3 (Fraktion 3)

Die Verbindung besitzt in LM I einen R_F -Wert von 0,47; sie zeigt eine positive Folin-Reaktion.

Sie ließ sich wegen der geringen Menge, mit der sie im Medium auftritt, nicht vollkommen reinigen. Dünnschichtchromatographische Vergleiche erbrachten in 4 verschiedenen Laufmittelsystemen gleiche R_F -Werte wie eines der beiden synthetisch erhaltenen, aber nicht eindeutig zugeordneten *o*- oder *m*-Hydroxyantipyrine (in LM I, $R_F = 0,47$; in LM III, $R_F = 0,8$; in LM V, $R_F = 0,2$ und in LM VI, $R_F = 0,8$).

Wachstumshemmung

Die Zellen werden erst bei hohen Antipyrinkonzentrationen (> 400 mg/l) in ihrem Wachstum leicht gehemmt.

Zellextrakt

In den Zellextrakten von *Beta vulgaris* kann Antipyrin dünnschichtchromatographisch eindeutig und in weit größerer Menge als Chloridazon in mit Chloridazon inkubierten Zellen identifiziert werden.

b) *Papaver bracteatum*

Suspensionskulturen des Mohns wurden wie bei *Beta vulgaris* beschrieben mit Antipyrin inkubiert. Im Medium wurden die bei der Zuckerrübe auftretenden Metaboliten Hydroxymethylantipyrin und *p*-Hydroxyantipyrin nachgewiesen. *m*-Hydroxyantipyrin wurde nicht gefunden.

Wachstumshemmung

Die Papaver-Zellen werden wie die Zuckerrübe erst bei hohen Antipyrinkonzentrationen (> 400 mg/l) in ihrem Wachstum leicht gehemmt.

Zellextrakt

In den Zellextrakten des Mohns läßt sich Antipyrin eindeutig nachweisen (siehe *Beta vulgaris*).

c) *Glycine max*, *Phaseolus aureus*, *Nicotiana tabacum* und *Petroselinum hortense*

Bei sämtlichen Zellkulturen wurde dünnschichtchromatographisch (LM I – VI) keine Metabolisierung des Antipyrins festgestellt. Im Laufe der Inkubation wurde keine Abnahme der Antipyrinkonzentration beobachtet.

Diskussion

In mehreren Arbeiten wurde schon über katabolen und anabolen Stoffwechsel in verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen berichtet. Allgemeine Abbauwege von exogen applizierten organischen Verbindungen sind Glykosidierungen, Hydroxylierungen und Einbau in polymere Strukturen. Nicotinsäure wird in Nicotinsäure-N- α -arabinosid und Trigonellin (N-Methylnicotinsäure) umgewandelt, während ein geringer Teil zu Pyridin decarboxyliert wird, welches dann den üblichen Pyridinstoffwechsel durchläuft [15]. Der Adeninteil des NAD⁺ wird über Hypoxanthin und Xanthin in Allantoin und Allantoinäure umgewandelt [16]. Verschiedene Benzoesäuren ergeben ausschließlich die Glucoside der jeweiligen Benzoesäure [17], und Anthranilsäure ergibt Anthranilsäure-N-glucosid, welches anschließend vorwiegend in Tryptophan umgewandelt wird [18].

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß eine Zellkultur, die aus Rübenwurzeln isoliert worden war, nicht in der Lage ist, Chloridazon zum Chloridazonheterocyclus abzubauen. Vielmehr bleibt in der Zellkultur der Chloridazon-unempfindlichen Rübe ebenso wie in der des Chloridazon-empfindlichen Mohns der weitaus größte Teil der eingesetzten Chloridazonmenge unverändert liegen. Bei beiden läuft aber nach diesen Untersuchungen in geringem Umfang eine Reaktion ab, wie sie bisher auch bei einigen Säugetierorganismen (Kaninchen, Ratte) beobachtet worden ist [19]. In den Medien beider Zellkulturen läßt sich *p*-Hydroxychloridazon nachweisen, das sich mit aus Kaninchenharn isoliertem *p*-Hydroxychloridazon, welches uns zur Verfügung stand, als identisch erwies.

Aus dem Papaver-Medium konnte ein weiteres hydroxyliertes Chloridazon nachgewiesen werden,

das mit synthetischem *m*-Hydroxychloridazon identisch war.

Da Pflanzen und pflanzliche Zellkulturen exogen applizierte, vor allem hydrophobe Verbindungen auch „inaktivieren“ können, indem sie die Substanz aufnehmen und in der Vakuole ablagern, wurde von den Zellen ein Zellextrakt bereitet. Es ließ sich dabei feststellen, daß auf Zellkulturenbene sowohl *Beta vulgaris* als auch *Papaver bracteatum* kaum Chloridazon aufnehmen. Mit der angewendeten Methode konnte nicht geklärt werden, ob Chloridazon in den geringen Mengen, die sich im Zellextrakt nachweisen ließen, aufgenommen worden war oder ob es durch Adsorption, die durch das Waschen mit Saline nicht aufgehoben werden konnte, an der Zellwand festgehalten wurde. In hier nicht beschriebenen Versuchen wurde festgestellt, daß auch die beiden ersten Zwischenprodukte des mikrobiellen Chloridazonabbaus [5, 6] nicht metabolisiert werden.

Mit Antipyrin wurden analoge Versuche wie mit Chloridazon durchgeführt. Diese Verbindung wird von Chloridazon-abbauenden Bakterien auf gleiche Weise abgebaut wie Chloridazon [10]. Auch hier bleibt wie bei den Versuchen mit Chloridazon der größte Teil des eingesetzten Antipyrins unverändert im Medium liegen, und beide Zellkulturen hydroxylieren in geringem Umfang das Antipyrinmolekül in *para*-Stellung. Zusätzlich bilden sowohl *Beta vulgaris* als auch *Papaver bracteatum* einen weiteren gemeinsamen Metaboliten, der nicht am aromatischen Phenylring, sondern in der „Seitenkette“ des heterocyclischen Molekülteils hydroxyliert worden war. Diese beiden Metaboliten – *p*-Hydroxyantipyrin und 3-Hydroxymethylantipyrin – konnten gereinigt und ihre Struktur mit spektroskopischen Methoden festgestellt werden.

Die Hydroxylierung in *para*-Position konnte auch durch Vergleich mit synthetisierten *ortho*- und *meta*-Isomeren „per exclusionem“ gesichert werden.

Im Medium von *Beta vulgaris* ließ sich dünnenschichtchromatographisch ein weiterer Metabolit nachweisen, der aber in so geringen Mengen auftrat, daß eine genaue spektroskopische Untersuchung nicht möglich war. Dieser Metabolit wies in 4 verschiedenen Laufmittelsystemen denselben *R*_F-Wert wie entweder *o*- oder *m*-Hydroxyantipyrin auf. Eine sichere Zuordnung ließ sich nicht treffen, da bei der Synthese der Vergleichssubstanzen ein Gemisch von *o*- und *m*-Isomeren entsteht, die zwar chromatogra-

phisch zu trennen sind, mit spektroskopischen Methoden aber nicht eindeutig in *o*- und *m*-Hydroxyantipyrin zuzuordnen sind.

Über am Phenylring hydroxylierte Antipyrine liegen bisher in der Literatur noch keine Daten vor, während im heterocyclischen Teil hydroxylierte Antipyrine schon beschrieben sind. Aus dem Urin von Säugetieren wurden nach Antipyringabe als Hauptprodukt (30–40% des verabreichten Antipyrins) 4-Hydroxyantipyrin, das mit Glucuronsäure konjugiert ist [20, 21], und in geringen Mengen 3-Hydroxymethylantipyrin gefunden [22, 23].

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß in *Beta vulgaris* und *Papaver bracteatum* der Metabolismus nicht wie in Bakterien vonstatten geht, sondern eher eine Analogie zum Säugetierorganismus gesehen werden muß.

Chloridazon- und Antipyringlykoside konnten weder im Medium noch in den Zellextrakten nachgewiesen werden.

In den Medien und Zellextrakten von Sojabohne, Mungbohne, Tabak und Petersilie konnten mit den hier angewendeten Methoden weder Umwandlungsprodukte von Chloridazon noch von Antipyrin festgestellt werden. Im Medium ließ sich auch keine Abnahme der Chloridazon- bzw. Antipyrinkonzentration beobachten.

Die Zuckerrübe und der Mohn metabolisieren Chloridazon und Antipyrin offensichtlich nur in geringem Umfang durch eine unspezifische und wahrscheinlich multifunktionelle Hydroxylase. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist zumindest auf der Ebene der Zellkulturen geklärt, daß die Zuckerrübe Chloridazon nicht in dem Umfang zu metabolisieren vermag, wie bisher vermutet worden ist.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. P. Fischer, Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung, Universität Stuttgart, für die Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren der Antipyrin-Metaboliten.

Der Fonds der Chemischen Industrie unterstützte in dankenswerter Weise unsere Arbeiten. Besonders danken wir Herrn Professor Dr. W. Barz für viele Ratschläge.

- [1] A. Fischer, *Weed Res.* **2**, 177–184 (1962).
- [2] N. Drescher und S. Otto, *Z. Pflanzenkrankheiten Pfl.-Schutz* **76**, 27–33 (1969).
- [3] R. Frank und C. M. Switzer, *Weed Sci.* **17**, 323–326 (1969).
- [4] C. Fröhner, O. Oltmanns und F. Lingens, *Arch. Mikrobiol.* **74**, 82–89 (1970).
- [5] E. de Frenne, J. Eberspächer und F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* **33**, 357–363 (1973).
- [6] S. Haug, J. Eberspächer und F. Lingens, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **54**, 760–763 (1973).
- [7] R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer und F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **358**, 797–805 (1977).
- [8] K. Sauber, C. Fröhner, G. Rosenberg, J. Eberspächer und F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* **79**, 89–97 (1977).
- [9] A. Traub, Dissertation Universität Hohenheim, (1976).
- [10] K. Sauber, R. Müller, E. Keller, J. Eberspächer und F. Lingens, *Z. Naturforsch.* **32c**, 557–562 (1977).
- [11] Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, E. Merck Darmstadt Nr. 21 und 141 (1970).
- [12] O. L. Gamborg, R. A. Miller und K. Ojima, *Exp. Cell. Res.* **50**, 151–158 (1968).
- [13] A. A. Abou-Mandour, *Z. Pflanzenphysiol.* **85**, 273–277 (1977).
- [14] O. L. Gamborg, *Canad. J. Biochem.* **44**, 791–799 (1966).
- [15] K.-W. Leienbach und W. Barz, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **357**, 1069–1080 (1976).
- [16] H. Neuhahn, K.-W. Leienbach und W. Barz, *Phytochemistry* **18**, 61–64 (1979).
- [17] W. Barz, R. Schlepphorst, P. Wilhelm, K. Kratzl und E. Tengler, *Z. Naturforsch.* **33c**, 363–367 (1978).
- [18] J. Köster, M. Ohm und W. Barz, *Z. Naturforsch.* **36B**, 368–372 (1978).
- [19] K. H. Meinecke, H. Frohberg, E. Schulze und H. Zeller, Qualitative Versuche über die Ausscheidung und den Stoffwechsel von 1-Phenyl-4-amino-5-chlorpyridazin-6 beim Kaninchen und bei der Ratte. — Vorträge anlässlich der wissenschaftlichen Aussprache über chemische Unkrautbekämpfung in Zuckerrüben mit Pyramin®. Ludwigshafen am Rhein. Januar 1964, 104–107.
- [20] J. Halberkann und F. Fretwurst, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **285**, 97–127 (1950).
- [21] B. B. Brodie und J. Axelrod, *J. Pharmacol. Expt. Therap.* **98**, 97–104 (1950).
- [22] H. Yoshimura, H. Shimeno und H. Tsukamoto, *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1511–1516 (1968).
- [23] H. Yoshimura, H. Shimeno und H. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 41–45 (1971).