Stoffwechsel aromatischer Pflanzeninhaltsstoffe I
**Über den Umsatz von Isoflavonen und Cumöstanen in
Cicer arietinum L. und *Phaseolus aureus* Roxb.**

WOLFGANG BARZ

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

(Z. Naturforschg. **24 b**, 234—239 [1969]; eingegangen am 26. Juli 1968)

The turnover of the isoflavones, formononetin and biochanin A, in *Cicer arietinum* L. and of the isoflavone, daidzein, and the coumestan, coumestrol, in *Phaseolus aureus* Roxb. has been determined by pulse labelling. The biological half-life of formononetin, daidzein and coumestrol has been found to be approximately 50 hours, while the turnover of biochanin A appeared to be very slow. The excretion of all four plant products through the roots into the medium has been measured. Approximately 3 percent of the total turnover of isoflavones in the plants can be accounted for by excretion into the medium.

The results are discussed in view of the concept that secondary plant products may well be subject to further metabolism.

Für die überaus große Zahl von Pflanzeninhaltsstoffen (z. B. Alkaloiden, Terpenen, Saponinen, Flavonoiden, Benzoesäuren) kann zur Zeit kein einheitliches System aufgestellt werden, das über die Bedeutung dieser Inhaltsstoffe für die Pflanze und über die Beziehungen zwischen den Stoffwechselwegen der Inhaltsstoffe selbst und dem pflanzlichen Grundstoffwechsel Auskunft gibt. Zwar konnten in den letzten Jahren umfangreiche Kenntnisse über die Biosynthese von Pflanzeninhaltsstoffen erarbeitet werden, jedoch scheint die allgemeine Vorstellung noch derart zu sein, daß es sich bei den genannten Verbindungsklassen um Stoffwechselendprodukte handelt. Für aromatische Pflanzeninhaltsstoffe wurde z. B. von SCHWARZE¹ ein weiterer Umsatz oder Abbau verneint. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Beispiele gefunden, bei denen „sekundäre“ Pflanzeninhaltsstoffe weiterem Umsatz wie auch Abbaureaktionen unterliegen können. Durch die Verwendung radioaktiv markierter Substrate ließ sich für Nicotin im Tabak², Catechine in der Tee-pflanze³, Chlorogensäure in Kartoffeln und Xanthium-Blättern⁴, Marrubiin in *Marrubium vulgare*⁵, Morphin in *Papaver somniferum*⁶, Naringenin in *Cicer arietinum*⁷ und Steroide in *Haplopappus heterophyllus*⁸ eindeutig weiterer Umsatz vermeintlicher

Stoffwechselendprodukte nachweisen. Art und Mechanismus der aufgefundenen Reaktionswege sind weitgehend unbekannt, obwohl teilweise zwischen anabolischen⁴ und katabolischen^{2, 3, 5, 6} Stoffwechselwegen unterschieden werden kann.

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen an den Isoflavonen Formononetin (1) und Biochanin (2) aus der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) sowie dem Isoflavon Daidzein (3) und dem Cumöstan Cumöstrol (4) aus der Mungbohne *Phaseolus aureus* Roxb., bei denen festgestellt werden sollte, ob die genannten Verbindungen metabolisch inaktive Stoffwechselendprodukte darstellen oder ihrerseits weiterem Stoffwechsel unterliegen.

1 Formononetin: R' = H, R = CH₃

2 Biochanin A: R' = OH, R = CH₃

3 Daidzein: R' = H, R = H

4 Cumöstrol

5 Soyagol

Abb. 1. Isoflavone und Cumöstane aus *Cicer arietinum* L. und *Phaseolus aureus* Roxb.

¹ P. SCHWARZE, Handbuch d. Pflanzenphysiologie, **Bd. X**, S. 523, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.

² T. C. TSO u. R. N. JEFFREY, Arch. Biochem. Biophysics **92**, 253 [1961].

³ M. N. ZAPROMETOV, Dokl. Akad. Nauk SSSR **125**, 1359 [1959].

⁴ A. O. TAYLOR u. M. ZUCKER, Plant Physiol. **41**, 1350 [1966].

⁵ A. BRECCIA u. R. BADIello, Z. Naturforschg. **22 b**, 441 [1967].

⁶ J. W. FAIRBAIRN u. S. EL-MASRY, Phytochemistry **6**, 449 [1967].

⁷ L. PATSCHKE, W. BARZ u. H. GRIEBACH, Z. Naturforschg. **19 b**, 1110 [1964].

⁸ R. D. BENNETT, E. R. LIEBER u. E. HEFTMANN, Plant Physiol. **42**, 973 [1967].

Die bisher für Isoflavone in Kleearten^{9, 10} und Luzerne¹¹ aufgefundenen Konzentrationsunterschiede lassen sich weitgehend durch Variation von Umweltfaktoren (z. B. Mineralsalz-mangel, Temperatur) erklären.

Auf Grund früherer Untersuchungen¹² über die Isoflavon-Biosynthese konnte für Formononetin in der Kichererbse ein weiterer Umsatz vermutet werden, da im Vergleich zu Biochanin A bei wesentlich höheren Einbauraten radioaktiver Vorstufen stets geringere Konzentrationen an Formononetin aufgefunden wurden. Die Umwandlung von Formononetin in Biochanin A ließ sich eindeutig ausschließen¹³.

Da die Beteiligung von Daidzein bei der Cumö-strol-Biosynthese schon gezeigt worden war¹⁴, mußte man auch für dieses Isoflavon einen weiteren Stoffwechsel erwarten.

Zur Feststellung eines Umsatzes der Isoflavone wurde nach einmaliger Gabe von DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) die Gesamtkonzentration der Isoflavone, ihre spezifische Radioaktivität und die Gesamaktivität der Isoflavone über einen Zeitraum von maximal 122 Std. nach Beendigung der Fütterung verfolgt. Gleichzeitig wurde die Ausscheidung der untersuchten Substanzen über die Wurzeln bestimmt, um die Größenordnung dieses Ausscheidungsweges in bezug auf den Gesamtumsatz zu erfassen.

Ergebnisse

a) Aufzucht der Pflanzen

Kichererbsensamen ließ man 2 Tage unter fließendem Wasser bei 20° quellen, bevor sie in Vermiculit eingesetzt wurden. Alle 24 Std. wurde mit einer hydroponischen Lösung gegossen. Nach 10 Tagen wurden die Pflanzen vorsichtig aus dem Vermiculit entfernt, die Wurzeln gut abgespült und in die radioaktive Lösung gestellt. Nach Beendigung der Fütterung wurden die Pflanzen unter gleichen Licht- und Temperaturbedingungen in hydroponischer Lösung gehalten.

Mungbohnen ließ man 24 Std. bei 20° in Wasser quellen und sodann in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier für 48 Std. im Brutschrank bei 24° wachsen. Die Wurzeln der Keimlinge wurden anschließend in eine hydroponische Lösung getaucht. Nach weiteren 5 Tagen hatten die Pflanzen eine Höhe von ca. 15 cm erreicht. Nach Beendigung der Fütterung wurden die Pflanzen wieder in hydroponischer Lösung gehalten.

b) Verfolgung des Umsatzes von Formononetin und Biochanin A in der Kichererbse

An 60 Cicerpflanzen wurden in 120 cm³ Wasser 60 µC DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) appliziert, von denen 88% während 20 Std. aufgenommen wurden. Nach Überführung in hydroponische Lösung wurden nach 0, 7,5, 22,5, 42,5, 66,5 und 122,5 Std. nach Beendigung der Fütterung jeweils 10 Pflanzen aufgearbeitet. Die Nährlösungen wurden alle 24 Std. erneuert.

Da die Hauptmenge der Isoflavone als Glykoside vorliegen¹², wurde durch Bereitung eines Homogenats eine enzymatische Hydrolyse durch endogene Glykosidasen herbeigeführt¹⁵. Der Ätherextrakt des wäßrigen Überstandes und der Methanolextrakt der gefriergetrockneten festen Rückstände wurden gemeinsam auf **1** und **2** aufgearbeitet. Nach Entfernung von Chlorophyll und Lipiden mit Petroläther wurden die Isoflavone dünn-schichtchromatographisch getrennt. Nach 2 weiteren Chromatographieschritten, quantitativer Bestimmung und Trägerzusatz wurden die Proben durch mehrfache Kristallisation auf eine konstante spezifische Aktivität gebracht.

In Abb. 2 sind die aus jeweils 10 Pflanzen erhaltenen Mengen sowie die während der Versuchsdauer von 122 Std. auftretenden Änderungen der spezifischen Radioaktivität und der isolierten Gesamaktivität beider Isoflavone dargestellt.

Während die Gesamtkonzentration von **1** und **2** keinen allzu großen Schwankungen unterworfen sind, zeigen die Radioaktivitätskurven für Formononetin einen deutlichen Abfall der einmal eingebauten Radioaktivität. Damit ist für Formononetin bei

⁹ G. SCHULTZ, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. **74**, 118 [1967].

¹⁰ R. C. ROSSITER u. A. B. BECK, Austral. J. agric. Res. **18**, 561 [1967] und frühere Arbeiten.

¹¹ C. H. HANSON, G. M. LOPER, G. O. KOHLER, E. M. BICKOFF, K. W. TAYLOR, W. A. KEHR, E. H. STANFORD, J. W. DUDLEY, M. W. PEDERSEN, E. L. SORENSSEN, U. L. CARNAHAN u. C. P. WILSIE, USDA, Techn. Bull. No. 1333 [1965].

¹² W. BARZ u. H. GRIEBACH, Z. Naturforsch. **22b**, 627 [1967] und frühere Veröffentlichungen.

¹³ L. PATSCHKE, W. BARZ u. H. GRIEBACH, Z. Naturforsch. **21b**, 201 [1966].

¹⁴ W. BARZ u. H. GRIEBACH, Z. Naturforsch. **21b**, 1113 [1966].

¹⁵ A. B. BECK, Austral. J. agric. Res. **15**, 223 [1964].

Abb. 2. Versuch mit *Cicer arietinum* L. A Isolierte Gesamtaktivität (Zerf./min). B Änderung der spezifischen Aktivität (Zerf./min/mMol). C Ausbeute der Isoflavone (mMol).

gleichbleibender Syntheserate ein mit vergleichbarer Geschwindigkeit ablaufender Umsatz bewiesen. Die biologische Halbwertszeit von Formononetin beträgt ca. 50 Stunden. Im Falle des Biochanin A ist der Abfall wesentlich geringer, so daß ein Umsatz von Biochanin A, wenn überhaupt, nur sehr langsam abläuft.

a) Verfolgung des Umsatzes von Daidzein und Cumöstanen in *Phaseolus aureus* Roxb.

Neben dem schon länger als Inhaltsstoff von *Phaseolus aureus* Roxb. bekannten Daidzein¹⁶ wurden auch das erst kürzlich von ZILG und GRISEBACH¹⁷ in dieser Pflanze nachgewiesene Cumöstrol (4) sowie das von denselben Autoren aufgeklärte Cumöstan Soyagol (5) in die Untersuchungen einbezogen.

420 *Phaseolus*-pflanzen erhielten in 80 cm³ Wasser 100 µC DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C), die in 7 Stdn. zu 98,5% aufgenommen worden waren. Nach Beendigung der Fütterung wurden die Pflanzen wieder in hydroponische Lösung eingestellt und dann sofort, wie auch nach 7,5, 19,5, 47,5, 67,5 und 101,5 Stdn., jeweils 70 Pflanzen aufgearbeitet.

Enzymatische Hydrolyse etwaiger Isoflavonglykoside sowie Isolierung von 3, 4 und 5 aus dem Pflanzenmaterial erfolgte wie in Abschnitt b beschrieben. Durch parallele Aufarbeitung nicht radioaktiven Pflanzenmaterials gleichen Alters und Vergleich mit den Ergebnissen von ZILG und GRISEBACH¹⁷ wurde festgestellt, daß die Gesamtkonzentration an Isoflavonoiden in *Phaseolus* sehr klein ist.

Um unkontrollierbare und die Ergebnisse verfälschende Verluste bei der chromatographischen Trennung und Reinigung zu vermeiden, wurden die Ätherextrakte mit den Phenolen aus den 6 Aufarbeitungen auf gleiche Volumina gebracht und aliquote Teile dünnstichtchromatographisch miteinander verglichen. Form und Größe der Substanzflecken von 3, 4 und 5 waren nicht zu unterscheiden, so daß in der Reihe der 6 Versuche vergleichbare Konzentrationen vorgelegen haben dürften. Nach Vergleich mit Standardlösungen isolierte man ca. 10 µg Daidzein und 8 µg Cumöstrol aus je 70 Pflanzen.

Eine Konzentrationsangabe und Isolierung von Soyagol konnte aus Mangel an Trägersubstanz nicht durchgeführt werden; die Konzentration von 5 lag schätzungsweise bei 3–5 µg.

Die Phenolfractionen wurden nach Zusatz von Daidzein- und Cumöstrolträgerrmengen dünnsticht-

Abb. 3. Versuch mit *Phaseolus aureus* Roxb. Änderung der Gesamtaktivität in Daidzein und Cumöstrol.

¹⁶ E. WALZ, Liebigs Ann. Chem. **489**, 118 [1931].

¹⁷ H. ZILG u. H. GRISEBACH, Phytochemistry, im Druck.

chromatographisch aufgetrennt und beide Substanzen bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt. Cumöstrol wurde vor der Aktivitätsbestimmung noch permethyliert¹⁴.

Die Kurven in Abb. 3 zeigen die Änderung der Gesamtaktivität in Daidzein und Cumöstrol während der Versuchsdauer von 102 Stdn. nach Beendigung der Gabe von Phenylalanin-(1-¹⁴C). Bei beiden Substanzen tritt ein deutlicher Abfall der inkorporierten Radioaktivität auf, so daß man für Daidzein eine biologische Halbwertszeit von ca. 47 Stdn. und für Cumöstrol von ca. 51 Stdn. angeben kann.

d) Ausscheidung von Isoflavonen und Cumöstrol über die Wurzeln

Die Ausscheidung zahlreicher organischer Verbindungen durch die Wurzeln höherer Pflanzen ist eine wohlbekannte Erscheinung¹⁸, deren Ausmaß offensichtlich stark von den osmotischen Verhältnissen in der Rhizosphäre abhängt¹⁹.

In den beiden oben beschriebenen Versuchsreihen wurde die Ausscheidung der vier Substanzen über die Wurzeln ebenfalls verfolgt. Obwohl die Wurzeln nicht unter sterilen Bedingungen gehalten werden konnten, sollte jedoch die Größenordnung der Exkretion in die Nährlösung feststellbar sein, um sie gegebenenfalls an der Gesamtbilanz des Umsatzes berücksichtigen zu können. Aus den regelmäßig erneuerten Nährlösungen wurden die vier Substanzen nach Trägerzusatz durch Ätherextraktion isoliert und dünnschichtchromatographisch sowie durch Kristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt. Die Tabn. 1 und 2 zeigen die insgesamt von den Wurzeln ausgeschiedenen Radioaktivitätsmengen sowie die Gesamtaktivität der untersuchten Verbindungen.

Ausgeschieden in Stdn. nach der Fütterung	Prozent der aufg. Gesamt- aktivität	Formononet. [Zerf./Min.]	Biochanin A [Zerf./Min.]
22,5	6,3	19 770	11 250
66,5	1,6	4 550	3 000
122,5	0,5	380	690

Tab. 1. Ausscheidung von aufgenommener Radioaktivität und von Isoflavonen über die Wurzeln von Cicerpflanzen.

¹⁸ N. A. KRASIL'NIKOV, Soil Microorganism and Higher Plants, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau 1958, verteilt von US Dept. of Commerce, TT 60-21126 [1961].

ungen. Von den beiden Pflanzen wurden die Isoflavone bzw. Cumöstrol eindeutig in die Nährlösung ausgeschieden. Quantitative Betrachtungen — unter dem Vorbehalt nicht steriler Bedingungen — zeigen, daß ca. 3% des Gesamtumsatzes (Abb. 2 und 3) als Ausscheidung über die Wurzeln erklärt werden können.

Ausgeschieden in Stdn. nach der Fütterung	Prozent der aufg. Gesamt- aktivität	Daidzein [Zerf./Min.]	Cumöstrol [Zerf./Min.]
7,5	0,64	827	190
19,5	0,39	358	650
47,5	0,39	540	380
67,5	0,29	340	200
101,5	0,08	170	18

Tab. 2. Ausscheidung von aufgenommener Radioaktivität und von Isoflavonen über die Wurzeln von *Phaseolus*-pflanzen.

Diskussion

Nach einmaliger, kurzzeitiger Gabe von DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) ließ sich für Formononetin in der Kichererbse und für Daidzein und Cumöstrol in der Mungbohne ein Umsatz feststellen, nach dem die biologische Halbwertszeit der drei Verbindungen ca. 50 Stdn. beträgt. Da auch der als Glykoside in den Pflanzen vorliegende Anteil der Verbindungen erfaßt wurde und weiterhin Formononetin aus Cicerpflanzen vollständig mit Alkohol extrahiert werden kann, d. h. nicht an unlösliche Strukturen gebunden vorliegt²⁰, muß man für die drei Verbindungen einen weiterführenden Stoffwechsel annehmen. Es handelt sich bei den genannten Verbindungen demnach nicht um metabolisch inaktive Stoffwechselendprodukte. Im Falle des Biochanin A ist der Umsatz dagegen wenig ausgeprägt. Bei dem geringen Strukturunterschied von Formononetin und Biochanin A überrascht diese unterschiedliche Stoffwechselaktivität.

Die hier vorgelegten Ergebnisse erklären frühere Beobachtungen²¹, nach denen Formononetin bei wesentlich geringerer Konzentration in den Pflanzen vorrangig gebildet werden sollte. Die schnellere Bildung von Formononetin kann wegen des anschlie-

¹⁹ B. M. McDUGALL u. A. D. ROVIRA, Nature [London] **207**, 1104 [1965].

²⁰ L. SCHILL, W. BARZ u. H. GRIEBACH, unveröffentlicht.

²¹ W. BARZ u. H. GRIEBACH, Z. Naturforschg. **21b**, 47 [1966].

henden weiteren Umsatzes nicht zu einer Anreicherung führen.

In der Kichererbse erreicht die Formononetinmenge am ca. 7. Tag nach der Keimung einen Wert, der bis zum 22. Tag nahezu unverändert bestehen bleibt. Die Biochanin-A-Konzentration steigt dagegen zwischen dem 7. und 12. Tag bis auf das Fünffache an²², d. h. ein der Bildung entsprechend schneller Abbau findet nicht statt. Dieses Ergebnis wird auch aus Abb. 2 deutlich.

Der nachgewiesene Umsatz von Daidzein entsprach den Erwartungen, da für dieses Isoflavon bereits gezeigt worden war, daß es eine Zwischenstufe bei der Biosynthese von Cumöstrol darstellt; es ist jedoch fraglich, ob diese Reaktion die alleinige Erklärung für den Daidzein-Umsatz ist. Ebenso muß geprüft werden, ob der gefundene Umsatz von Cumöstrol nicht teilweise durch Umwandlung in Soyagol oder andere Cumöstane²³ bedingt ist.

Die Ergebnisse mit Cumöstrol erscheinen im Zusammenhang mit den von LOPER²³ und von BICKOFF²⁴ veröffentlichten Untersuchungen über die Akkumulation von Cumöstrol in Luzerne nach Infektion mit *Pseudopeziza medicaginis* (Lib) Sacc. von Interesse.

Die nach Infektion mit dem Parasiten steigende Cumöstrol-Konzentration wurde als vermehrte Syntheseleistung interpretiert. Nach den hier vorliegenden Werten erscheint ebenso eine durch die Infektion bedingte verminderte Umsatzleistung möglich.

Untersuchungen über den Verlauf der Gesamtkonzentration von Isoflavonen in Leguminosen^{9, 10, 11, 25}, die teilweise über einen Zeitraum von Monaten ausgeführt wurden, hatten ergeben, daß zwischen den einzelnen Isoflavonen beträchtliche Unterschiede bestehen und daß sich zu manchen Zeiten des Pflanzenwachstums (z. B. Blüte, Reifung der Samen) signifikante Veränderungen ergeben können. Nach den hier beschriebenen Ergebnissen muß gefolgert werden, daß die Gesamtkonzentration eines Isoflavons aus dem Zusammenspiel von Biosyntheserate und Umsatz resultiert. Es gilt demnach zu prüfen, warum

und zu welchem Zeitpunkt die Biosynthese oder der Umsatz überwiegen.

Die Ergebnisse bilden einen weiteren Beweis, daß die sogenannten „sekundären“ Pflanzeninhaltsstoffe keine Endprodukte darstellen, sondern teilweise sehr wohl weiterem Umsatz unterliegen können und damit wohl auch eine — bisher unbekannte — Funktion in den Pflanzen ausüben können.

Art und Richtung (anabolisch oder katabolisch) wie auch Regulation des nachgewiesenen Isoflavonumsatzes können aus den vorliegenden Ergebnissen nicht entnommen werden. Zur Lösung dieser Fragen sind Untersuchungen mit spezifisch markierten Isoflavonen begonnen worden.

Experimenteller Teil

Chemikalien

DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) (Radiochemical Center, Amersham) besaß eine spez. Aktivität von 44,2 mCi/mMol.

Formononetin²⁶ und Biochanin A²⁷ wurden nach bekannten Vorschriften synthetisiert. Daidzein²⁸ erhielt man durch HJ-Demethylierung von Formononetin.

Pflanzenmaterial

Cicersamen waren ein käufliches Produkt aus Spanien. Mungbohnen (kleine indonesische) wurden von dem Henselwerk, Magstadt, bezogen.

Aufzucht der Pflanzen

Die vorgekeimten Samen wurden entweder in Vermiculit (Cicer) oder in hydroponischen Lösungen²⁹ (*Phaseolus*) bei 24° unter 2 Osram HQL-Lampen (125 Watt) bei ca. 11 000 Lux (16-Stdn.-Tag) aufgezogen.

Isolierung der Isoflavonoide aus den Pflanzen

a) aus *Cicer arietinum* L.

Jeweils 10 Pflanzen wurden im Waring Blendor mit ca. 150 cm³ Wasser zerkleinert und das Homogenat bei 20° 5 Stdn. inkubiert.

Nach Zentrifugation (20 min, 8000 g) wurde der Überstand 6-mal mit je 50 cm³ Äther extrahiert. Die

²² W. BARZ u. B. LAUTERBACH, unveröffentlicht.

²³ G. M. LOPER u. C. H. HANSON, *Crop. Sci.* **4**, 480 [1964].

²⁴ E. M. BICKOFF, G. M. LOPER, C. H. HANSON, J. H. GRAHAM, S. C. WITT u. R. R. SPENCER, *Crop Sci.* **7**, 259 [1967].

²⁵ W. DEDIO u. K. W. CLARK, *Canad. J. Plant Sci.* **48**, 175 [1968].

²⁶ R. N. JYER, K. H. SHAH u. K. VENKATARAMAN, *Proc. Indian Acad. Sci.* **33 A**, 116 [1951], *zit. C. A.* **46**, 500 [1952].

²⁷ W. BAKER, J. CHADDERTON, J. B. HARBORNE u. W. D. OLLIS, *J. chem. Soc. [London]* **1953**, 1852.

²⁸ R. B. BRADBURY u. D. E. WHITE, *J. chem. Soc. [London]* **1951**, 3447.

²⁹ Modifizierte Hoagland-Lösung. Privatmitteilung von E. LEDERER, Gif-sur-Yvette.

festen Pflanzenteile wurden nach Gefriertrocknung mit Methanol im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Die Äther- und Methanolextrakte wurden vereinigt, im Vakuum bei 20° zur Trockne gebracht und mit 5·30 cm³ Petroläther (60–80°) digeriert. Aus dem verbleibenden grauen Pulver extrahierte man nach Zugabe von 15 cm³ Wasser die Isoflavone mit 8·30 cm³ Äther. Biochanin A und Formononetin wurden auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit dem Laufmittel Benzol/Äthanol 92/8 getrennt. Biochanin A reinigte man noch einmal auf Kieselgel mit den Laufmittelsystemen Äther/Petroläther 7/3 und Benzol/Essigester/Methanol/Petroläther 6/4/1/3. Formononetin wurde neben dem zuletzt genannten Laufmittel auch noch mit Chloroform/Isopropanol 10/1 gereinigt. Die Kristallisation der verdünnten Proben erfolgte aus Methanol, Äthanol und Aceton.

b) aus *Phaseolus aureus* Roxb.

Die Zerkleinerung der Pflanzen, enzymatische Hydrolyse und Gewinnung der Phenolfractionen wurde wie unter a beschrieben durchgeführt. Die 6 Phenolfractionen wurden mit Äther auf jeweils 20 cm³ aufgefüllt und 1 cm³ auf einer Kieselgeldünnschichtplatte im System Benzol/Essigester/Methanol/Petroläther 6/4/1/3 chromatographiert. Die Konzentrationen von Daidzein und Cumöstrol wurden mit Vergleichslösungen von 0,1–10 µg/cm³ bestimmt. Nach Zusatz von Trägermaterial trennte man Daidzein und Cumöstrol auf Kieselgelplatten mit dem gleichen Laufmittelsystem und reinigte beide Verbindungen noch einmal mit Chloroform/Isopropanol 100/13. Daidzein wurde nach weiterer Verdünnung durch mehrfache Kristallisation aus Methanol und Äthanol, Cumöstrol nach Permethylierung¹⁴ durch Sublimation im liegenden Rohr (190°, 0,05 Torr, 1 Stde.) sowie durch Kristallisation aus Methanol und Äthanol gereinigt.

Isolierung der Isoflavonoide aus den Nährlösungen

a) bei *Cicer arietinum*

Nach Zusatz von in Alkohol gelöster Trägersubstanz wurde mit konz. HCl eine Säurekonzentration von 2-n.

eingestellt und 2 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad gehalten. Anschließend extrahierte man die Isoflavone mit Äther und reinigte sie dünnschichtchromatographisch und durch Kristallisation wie oben angegeben.

b) bei *Phaseolus aureus* Roxb.

Da in diesem Falle keine Glykoside von den Wurzeln ausgeschieden wurden, konnten ohne Hydrolyse gleich nach Trägerzusatz die Isoflavone mit Äther extrahiert werden. Die Reinigung von Daidzein und Cumöstrol erfolgte wie oben beschrieben.

Quantitative Bestimmungen

Die Isoflavone und Cumöstrol wurden photometrisch (Zeiss Spektralphotometer PMQ II) in Methanol bestimmt. Daidzein λ max 248 nm ($\log \epsilon = 4,439$), Formononetin λ max. 248,5 nm ($\log \epsilon = 4,441$), Biochanin A λ max 261 nm ($\log \epsilon = 4,574$), Cumöstrol λ max. 343 nm ($\log \epsilon = 4,451$).

Messung der Radioaktivität

Die Messung von ¹⁴C-Radioaktivität erfolgte in einem Beckmann LS 100 Flüssigkeits-Szintillationszähler in einem Dioxan-Szintillatormischung. Die Zählausbeute bestimmte man mit einem Toluol-¹⁴C-Standard.

Herrn Prof. Dr. H. GRIEBACH danke ich für großzügige Förderung, Dr. H. ZILG für eine Probe Soyagol und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung. Ebenso gilt mein Dank Dr. E. M. BICKOFF, Albany, Californien, für die Überlassung von Cumöstrol sowie dem Henselwerk, Magstadt, für Phaseolussamen. Herrn Prof. Dr. K. STOPP, Mainz, danke ich für die Identifizierung der Samen von *Phaseolus aureus* Roxb.