

ZUR BIOSYNTHESE DES GRAVEOLINS BEI *RUTA ANGUSTIFOLIA*

MARIANNE BLASCHKE-COBET und MARTIN. LUCKNER

Sektion Pharmazie der Martin-Luther-Universität,
Halle-Wittenberg, 402 Halle/Saale, DDR

(Eingegangen 24. April 1973. Angenommen 9. Mai 1973)

Key Word Index—*Ruta angustifolia*; Rutaceae; quinoline alkaloids; graveoline; biosynthesis; NIH-shift.

Abstract—The carbon skeleton of the quinoline alkaloid graveoline is built up from the aromatic ring and probably the carboxylic group of anthranilic acid and the ring and the C-atoms 2' and 3' of a phenylpropane. The nitrogen atom of the alkaloid is derived from that of anthranilic acid. It seems that a benzoylacetate acid derivative which is formed from phenylalanine via cinnamic acids reacts with anthranilic acid with loss of its carboxylic group. The two oxygen atoms of the methylenedioxy group of graveoline are introduced by mixed function oxygenation. The value of the NIH-shift which occurs during this reaction shows that the oxygen in the *p*-position is introduced before that in the *m*-position. A monomethylated *o*-dihydroxy group seems to be the direct precursor of the methylenedioxy structure. The introduction of the oxygen atoms, the methylation and the formation of the methylenedioxy group can proceed at different stages in the pathway of graveoline biosynthesis.

Zusammenfassung—Das Kohlenstoffgerüst des Chinolinalkaloids Graveolin entsteht aus dem Ring und wahrscheinlich der Carboxylgruppe der Anthranilsäure und dem Ring sowie den C-Atomen 2' und 3' eines Phenylpropankörpers. Das Stickstoffatom des Alkaloids leitet sich von dem der Anthranilsäure ab. Wahrscheinlich reagiert ein Benzoylessigsäure-Derivat, das aus Phenylalanin über Verbindungen mit Zimtsäurestruktur gebildet wird, unter Verlust seiner Carboxylgruppe mit der Anthranilsäure. Die beiden Sauerstoffatome der Methylenedioxygruppe des Graveolins werden durch mischfunktionelle Oxygenierung in das Molekül eingeführt. Die Größe des dabei auftretenden NIH-Shifts läßt erkennen, daß zunächst der Sauerstoff in *p*-Stellung und danach der in *m*-Stellung eingebaut wird. Unmittelbare Vorstufe der Methylenedioxystruktur scheint eine monomethylierte Dihydroxygruppierung zu sein. Die Einführung der Sauerstoffatome, die Methylierung und die Bildung der Methylenedioxygruppierung können auf verschiedenen Stufen der Graveolinbiosynthese erfolgen.

EINLEITUNG

IN DEN oberirdischen Teilen von *Ruta angustifolia* Pers. ist das Graveolin (1-Methyl-2-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-chinolon-4) (I) das in der höchsten Konzentration vorkommende Alkaloid.¹ Untersuchungen über die Biosynthese dieser Verbindung (oder der anderer 2-Phenylchinolon-4-Derivate) waren vor Beginn der im folgenden beschriebenen Experimente unbekannt. *In vitro* Versuche² sowie die Ergebnisse der Arbeiten über die Biosynthese der 2-Alkylchinolon-4-Verbindungen (Pseudane) bei *Pseudomonas aeruginosa* (Schroet.) Migula^{3,4} wiesen jedoch darauf hin, daß die 2-Phenylchinolon-4-Alkaloide aus Anthranilsäure und einem Benzoylessigsäure-Derivat entstehen, wobei die Carboxylgruppe dieser β -Ketosäure verloren geht.

Die im folgenden beschriebenen Versuche hatten das Ziel, den direkten Einbau von Phenylalanin als Vorstufe der postulierten β -Ketosäure und von Anthranilsäure in das Graveolin zu beweisen. Darüber hinaus sollten sie klären, ob bei der Biosynthese die Zwischenstufe der β -Ketosäure wirklich durchlaufen wird und auf welchem Wege bzw.

¹ VASUDEVAN, T. N. und LUCKNER, M. (1968) *Pharmazie* 23, 520.

² VON NIEMENTOWSKI, S. (1906) *Chem. Ber.* 38, 2044.

³ LUCKNER, M. und RITTER, C. (1965) *Tetrahedron Letters* 741.

⁴ RITTER, C. und LUCKNER, M. (1971) *European J. Biochem.* 18, 391.

auf welcher Stufe der Biosynthesekette die Ausbildung der im Molekül des Graveolins enthaltenen Methylenedioxygruppe erfolgt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Biosynthese des Graveolin-Grundgerüsts

Die in der Tabelle 1 zusammengestellten Fütterungsversuche zeigen, daß sowohl Anthranilsäure als auch Phenylalanin in das Molekül des Graveolins inkorporiert werden. Der Ring der Anthranilsäure wird dabei einschließlich der Aminogruppe in das Alkaloid eingebaut. Dies geht aus den relativ hohen Inkorporationsraten für ^3H und ^{15}N in das Graveolin sowie aus dem Verhältnis des $^3\text{H}:^{15}\text{N}$ -Einbaus hervor, das im Rahmen der Fehlergrenze dem errechneten Wert entspricht (Tabelle 1, Versuch 1).

TABELLE 1. DER EINBAU ISOTOPMARKIERTER VERBINDUNGEN IN DAS GRAVEOLIN

Ver- such Nr.	Bezeichnung	Precursoren			Spezifische Radioaktivität		Graveolin		Verhältnis der Einbauraten*	
		Spezifische Radioaktivität Imp./min/mMol $^{14}\text{C} \times 10^8$	^3H	Atom % ^{15}N - Über- schuß	$^{14}\text{C} \times 10^5$	^3H	Atom % ^{15}N - Über- schuß	berechnet $^{14}\text{C}:^3\text{H}:^{15}\text{N}$	gefunden $^{14}\text{C}:^3\text{H}:^{15}\text{N}$	
1	Anthranilsäure- [$^{14}\text{COOH}$, ^{15}N , U- ^3H]	4,78	49,70	77,5	0,10	42,00	0,07	1:1:1	0,03:1:1,2	
2	Phenylalanin-[3- ^{14}C , o- ^3H]	4,56	54,50		4,50	50,80		1:1	1:0,95	
3	Phenylalanin-[1- ^{14}C , o- ^3H]	4,29	67,00		0,10	33,50		0:1	0,05:1	
4	Phenylalanin-[3- ^{14}C , p- ^3H]	4,51	54,50		2,60	14,10		1:0,5	1:0,45	
5	Phenylalanin-[3- ^{14}C , m- ^3H]	5,13	62,00		2,60	15,80		1:0,5	1:0,50	
6	Zimtsäure-[3- ^{14}C]+ Phenylalanin-[o- ^3H]	2,36	38,80		0,01	8,80			0,02:1	
7	p-Cumarsäure-[3- ^{14}C]+ Phenylalanin-[o- ^3H]	11,70	11,30		0,50	3,63			0,15:1	
8	Ferulasäure/Isoferulasäure- [CH ₃]+Phenylalanin-[3- ^{14}C]	3,60	38,10		0,06	0,31			1:0,75†	
9	Benzoylessigsäureester-[U- ^3H]+ Phenylalanin-[3- ^{14}C]	1,13	29,40		0,06	0,42			1:0,70†	
10	Piperonylessigsäureester-[U- ^3H] + Phenylalanin-[3- ^{14}C]	2,60	13,80		0,03	0,04			1:0,40†	

* Die spezifische Einbaurate des als Bezugssubstanz verwendeten Phenylalanin-[3- ^{14}C] oder Phenylalanin-[o- ^3H]-Präparates bzw. die des Tritiums aus der Anthranilsäure wurde gleich 1 gesetzt.

† Der Wert wurde unter Berücksichtigung der bei der Inkorporation der markierten Substanz verlorengelassenen Wasserstoffatome korrigiert. Dabei wurde angenommen, daß alle H-Atome gleich stark markiert sind.

Die im Vergleich dazu geringe spezifische Einbaurate der Carboxylgruppe der Anthranilsäure in das Alkaloid (Tabelle 1, Versuch 1) ist offenbar dadurch bedingt, daß auch in *Ruta angustifolia* der bereits mehrfach beobachtete Cyclus Anthranilsäure \rightarrow Tryptophan \rightarrow Anthranilsäure abläuft. Hierbei geht die Carboxylgruppe der Anthranilsäure verloren und wird durch das C-Atom 2 eines Moleküls Ribose ersetzt, während Aminogruppe und Ring erhalten bleiben. Der für diesen Cyclus notwendige oxydative Abbau des Tryptophans über Kynurenin scheint auch bei höheren Pflanzen möglich zu sein.^{5,6}

Ring und C-Atom 3' der Seitenkette des Phenylalanins werden in das Graveolin ohne Aufspaltung eingebaut. Es geht dies aus dem Verhältnis der $^{14}\text{C}:^3\text{H}$ -Einbauraten nach Verfütterung von Phenylalanin-[3- ^{14}C , o- ^3H] hervor (Tabelle 1, Versuch 2), das nahezu mit dem theoretischen Wert identisch ist. Mit diesem Ergebnis steht in Übereinstimmung, daß bei dem chemischen Abbau des Alkaloid-Moleküls durch Ozonisierung⁷ (vgl. auch⁴) zu Anthranilsäure (C-4 bis C-10 und N des Graveolins) bzw. Methylantranilsäure (C-4 bis C-10 und N-CH₃ des Graveolins) und Piperonylsäure (C-2, C-1' bis C-6' und

⁵ WILTSHIRE, G. M. (1953) *Biochem. J.* **55**, 408.

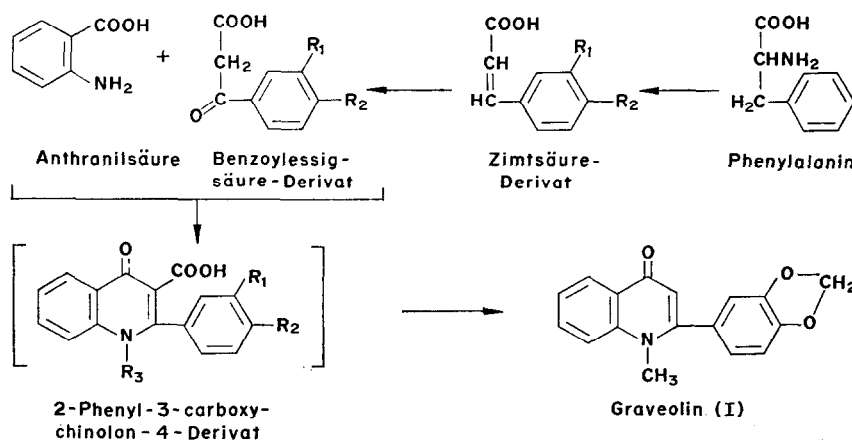
⁶ SLAYTOR, M., COPELAND, L. und MAGNICO, P. K. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1779.

⁷ WELLS, I. C., ELLIOTT, W. H., THAYER, S. A. und DOISY, E. A. (1952) *J. Biol. Chem.* **196**, 321.

-O-CH₂-O- des Graveolins) nur eine geringfügige Verschmierung der inkorporierten Radioaktivität gefunden wird (Tabelle 2, Versuch 1).

Im Gegensatz dazu geht die Carboxylgruppe des Phenylalanins beim Einbau in das Graveolin verloren (vgl. die niedrigere Einbauraten der ¹⁴C-Aktivität nach Verfütterung von Phenylalanin-[1-¹⁴C, o-³H]) (Tabelle 1, Versuch 3) und die Verschmierung der inkorporierten ¹⁴C-Radioaktivität über das Molekül (Tabelle 2, Versuch 4).

Während Zimtsäure selbst einen nur geringen Einbau erkennen läßt (Tabelle 1, Versuch 6), werden *p*-Cumarsäure (Tabelle 1, Versuch 7) und insbesondere Ferulasäure/Isoferulasäure (Tabelle 1, Versuch 8) mit verhältnismäßig guten Raten in das Graveolin inkorporiert. Auch die Inkorporation von Benzoylessigsäureäthylester und Piperonylessigsäureäthylester (beide Verbindungen werden sehr leicht zu den entsprechenden Säuren verseift) lagen in einer ähnlichen Größenordnung wie die des als Standard gleichzeitig verfütterten Phenylalanins (Tabelle 1, Versuche 9 und 10). Es weist dies darauf hin, daß die Stufen der Zimtsäuren und der Benzoylessigsäuren bei der Biosynthese durchlaufen werden.



SCHEMA 1. WAHRSCHEINLICHER WEG FÜR DIE BIOSYNTHESE DES GRAVEOLINS.

In Übereinstimmung mit der Biosynthese der Pseudane^{3,4} könnte somit das Grundgerüst des Graveolins auf dem in Schema 1 dargestellten Wege entstehen: Aus Phenylalanin wird über ein Zimtsäure- ein Benzoylessigsäure-Derivat gebildet (vgl.⁸). Anthranilsäure und diese β -Ketosäure reagieren in aktivierter Form, wahrscheinlich als CoA-Ester⁹ miteinander, wobei über ein 2-Phenyl-3-carboxy-chinolon-4-Derivat das Graveolin synthetisiert wird.

Die Bildung der Methylendioxygruppe

Verbindungen mit Methylendioxygruppen entstehen wahrscheinlich aus dihydroxylierten Substanzen über monomethylierte Derivate durch oxydative Cyclisierung.¹⁰ Bei der Untersuchung der Bildung der Methylendioxygruppe des Graveolins war deshalb zunächst der Mechanismus der Hydroxylierung zu klären. Reaktionen dieses Typs werden bei aromatischen Strukturen durch mischfunktionelle Oxygenasen katalysiert. Hierbei ist neben dem

⁸ ZENK, M. H. (1966) *Biosynthesis of Aromatic Compounds* (BILLEK, G., ed.), pp. 45–60, Pergamon Press, Oxford.

⁹ GEIGER, U. und LUCKNER, M. (1973) *European J. Biochem.* im Druck.

¹⁰ BARTON, D. H. R., KIRBY, G. W. und TAYLOR, J. B. (1962) *Proc. Chem. Soc.* 340.

Einbau von molekularem Sauerstoff die 1,2-Verschiebung von Hydridionen (NIH-Shift) charakteristisch.¹¹⁻¹³

Nach Verfütterung von Phenylalanin-[3-¹⁴C, *p*-³H] war eine solche Verschiebung nachweisbar. Die Verbindung wird in das Graveolin unter Erhaltung eines Teils ihrer Tritiumaktivität inkorporiert (Tabelle 1, Versuch 4). Ohne NIH-Shift würde alles Tritium bei dem Einbau verloren gehen. Die Tritiumretention betrug etwa die Hälfte der dem ¹⁴C-Einbau entsprechenden Werte und stimmt damit mit Ergebnissen überein, die bei der Biosynthese anderer Substanzen in höheren Pflanzen, z.B. bei der Hydroxylierung von Flavonoidderivaten, gefunden wurden.^{14,15} Die erhaltenen Befunde beweisen, daß zunächst die Hydroxylgruppe in *p*-Stellung und danach diejenige in *m*-Stellung eingeführt wird. Bei dieser Reihenfolge wird nach Verfütterung von in *p*-Stellung tritiiertem Phenylalanin bei der ersten Hydroxylierung ein großer Prozentsatz der Tritiumaktivität in die einander gleichwertigen Positionen 3' und 5' verschoben. Bei der zweiten Hydroxylierung, bei der kein NIH-Shift auftritt, geht die Hälfte dieser Radioaktivität verloren. Im Gegensatz dazu würde bei der Einführung der Hydroxylgruppen in umgekehrter Reihenfolge die gesamte in *p*-Stellung vorhandene Tritiumaktivität abgespalten. Bei Verfütterung von in *m*-Stellung tritiiertem Phenylalanin würden auf beiden Wegen, wie gefunden, 50% der Radioaktivität ersetzt, wenn das hydroxylierende Enzym keine der beiden *m*-Positionen bevorzugt.

TABELLE 2. VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT IM GRAVEOLIN NACH VERFÜTTERUNG VERSCHIEDENER PHENYLALANINPRÄPARATE

Versuch Nr.	Abgebautes Graveolin- präparat, gebildet nach Verfütterung von	Nr. d. Ver- suches in Tabelle 1	% der inkorporierten Radioaktivität in den Abbauprodukten							
			Piperonylsäure				Anthranilsäure und Methylantranilsäure			
			berechnet ¹⁴ C	gefunden ³ H	berechnet ¹⁴ C	gefunden ³ H	berechnet ¹⁴ C	gefunden ³ H	berechnet ¹⁴ C	gefunden ³ H
1	Phenylalanin-[3- ¹⁴ C, <i>o</i> - ³ H]	2	100	100	96	83	0	0	4	17
2	Phenylalanin-[3- ¹⁴ C, <i>p</i> - ³ H]	4	100	100	93	—	0	0	6	—
3	Phenylalanin-[3- ¹⁴ C, <i>m</i> - ³ H]	5	100	100	100	100	0	0	0	0
4	Phenylalanin-[1- ¹⁴ C, <i>o</i> - ³ H]	3	100	100	50	100	0	0	50	0

Durch den Abbau der nach Verfütterung der genannten Phenylalaninpräparate gebildeten radioaktiv markierten Alkaloide konnte nachgewiesen werden, daß eine Verschmierung der Radioaktivität über das Molekül nicht erfolgt ist (Tabelle 2, Versuche 2 und 3). Diese Ergebnisse beweisen, daß die Methylenedioxygruppe wie zu erwarten über freie Hydroxylgruppen gebildet wird, die ihrerseits durch mischfunktionelle Oxygenierung in das Molekül eingeführt werden. Die hohe, mit der des Phenylalanins vergleichbare Einbaurrate des Gemisches von Ferulasäure/Isoferulasäure-[C³H₃] (Tabelle 1, Versuch 8) läßt darüber hinaus den Schluß zu, daß die Methylenedioxygruppe aus einer monomethylierten Dihydroxystruktur gebildet wird.

¹¹ GUROFF, G., DALY, J. W., JERINA, D. M., RENSON, J., WITKOP, B. und UDENFRIEND, S. (1967) *Science* **157**, 1524.

¹² NOVER, L. (1969) *Pharmazie* **24**, 361.

¹³ LUCKNER, M. (1972) *Secondary Metabolism of Plants and Animals*, S. 41, Chapman & Hall, London.

¹⁴ AMRHEIN, N. und ZENK, M. H. (1969) *Phytochemistry* **8**, 107.

¹⁵ SUTTER, A. und GRISEBACH, H. (1968) *Z. Physiol. Chem.* **349**, 1630.

Wahrscheinlich können die Hydroxylierungen und die Ausbildung der Methylendioxygruppe ähnlich wie bei den flavonoiden Verbindungen (vgl. ^{16,17}) auf verschiedenen Stufen des Biosyntheseweges erfolgen. Der im Vergleich zur *p*-Cumarsäure schlechte Einbau der Zimtsäure (Tabelle 1, Versuche 6 und 7) weist darauf hin, daß zumindest die *p*-ständige Hydroxylgruppe schon auf der Stufe des Phenylalanins eingeführt werden kann. Andererseits ist jedoch der auf Phenylalanin bezogene Einbau von Benzoylessigester größer als der von Piperonylessigester (Tabelle 1, Versuche 9 und 10). Dieser Befund zeigt, daß die Ausbildung der Methylendioxygruppe auch auf einer späteren Stufe der Biosynthesekette möglich ist.

EXPERIMENTELLES

Isotop markierte Precursoren. D,L-Phenylalanin-[3-¹⁴C], D,L-Phenylalanin-[1-¹⁴C], *p*-Cumarsäure-[3-¹⁴C] und Anthranilsäure-[¹⁵N] waren Handelsprodukte. D,L-Phenylalanin-[*o*-³H], -[*m*-³H] und -[*p*-³H] wurden durch reduktive Tritierung aus den entsprechenden Halogenverbindungen hergestellt.¹⁸ Die Synthese von Anthranilsäure-[¹⁴COOH] erfolgte ausgehend von Nitranilin und KCN[¹⁴C]¹⁹.

Anthranilsäure-[U-³H], Benzoylessigsäureäthylester-[U-³H] und Piperonylessigsäureäthylester-[U-³H] wurden nach der Methode von Wilzbach markiert. Die Anthranilsäure wurde wie unter²⁰ angegeben von labilem Tritium befreit und durch Sublimation (120–130°, 10⁻²–10⁻³ Torr) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt. Die Ester wurden durch Chromatographie an einer Kieselgelsäure (Kieselgel Merck 0,05–0,2 mm (70–325 mesh ASTM); Elutionsmittel: ammoniakgesättigter Ät₂O) gereinigt. Die radiochemische Reinheit wurde dünnenschichtchromatographisch überprüft [Kieselgel PF₂₅₄₊₃₆₆ Merck; Toluol, MeCOÄt, HCOOH (5:4:1)]. Zimtsäure-[3-¹⁴C] wurde durch Einwirkung des Enzyms Phenylalanin-Ammonium-Lyase (E.C. 4.3.1.5.) aus 6 Tage alten Gerstenkeimlingen²¹ auf D,L-Phenylalanin-[3-¹⁴C] hergestellt. Die Reinigung der Säure erfolgte durch präparative DC in dem für die β -Ketosäureester angegebenen System.

Ferulasäure-[methyl-³H] und Isoferulasäure-[methyl-³H] wurden ausgehend von 1,6 mMol (60 mCi) eines durch Methylierung von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd entstandenen Gemisches von Vanillin-[methyl-³H], Isovanillin-[methyl-³H] und Veratrumaldehyd-[methyl-³H] (1:5:4) nach Knoevenagel-Doebner²² unter Zusatz von Wolfen-Zeosorb 3 A (Fa. VEB Jenapharm, Jena) zur Bindung des entstehenden Wassers synthetisiert. Die Abtrennung der gleichzeitig gebildeten Dimethoxyzimtsäure-[methyl-³H] erfolgte durch präparative DC (Polyamidpulver für die DC Merck + 20% Cellulosepulver MN 300 Macherey, Nagel & Co.; C₆H₆-MeCOÄt-MeOH 30:12:7; R_F-Werte: Ferulasäure/Isoferulasäure: 0,44, Dimethoxyzimtsäure: 0,68). Das Gemisch aus Ferulasäure-[methyl-³H] und Isoferulasäure-[methyl-³H] wurde durch Sublimation (135–145°, 10⁻²–10⁻³ Torr) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt. Ausbeute: 25,3 mg (14% d. Th.), spez. Aktivität: 15,7 mCi/mMol. Eine Trennung der beiden Verbindungen voneinander war wegen der geringen zur Verfügung stehenden Mengen nicht möglich.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Tricarb Flüssigkeits-Scintillations Zähler (Packard Instruments Co., Chicago). Der ¹⁵N-Gehalt wurde nach Trockenverbrennung der Substanz auf spektrographischem Wege bestimmt.²³ Die Bestimmung der radiochromatographischen Reinheit der verwendeten Substanzen erfolgte mit dem Dünnschicht-Scanner II (Fa. Berthold-Frieseke, Karlsruhe).

Synthese der β -Ketosäureester. Benzoylessigsäureäthylester wurde nach²⁴ synthetisiert. Die Synthese des Piperonylessigsäureäthylesters erfolgte aus Piperonylsäurechlorid nach.²⁵ Die Reinigung des nach dem Abdestillieren des Ät₂O verbleibenden β -Ketosäureesters wurde analog der der radioaktiven Verbindungen mittels Kieselgelsäule und durch Umkristallisieren aus MeOH-H₂O durchgeführt. (Fp. 31–34°; Ausbeute: 8 g, 14% d. Th.).

Verwendetes Pflanzenmaterial. Zu den Versuchen wurden ein Jahr alte, im Gewächshaus kultivierte Pflanzen von *Ruta angustifolia* Pers. verwendet.

¹⁶ GRISEBACH, H., BARZ, W., HAHNBROCK, K., KELLNER, S. und PATSCHKE, L. (1966) *Biosynthesis of Aromatic Compounds* (BILLEK, G., ed.), pp. 25–36, Pergamon Press, Oxford.

¹⁷ HESS, D. (1966) *Z. Pflanzenphysiol.* **55**, 374.

¹⁸ NOVER, L. und LUCKNER, M. (1969) *FEBS Letters* **3**, 292.

¹⁹ MUNSCHE, D. und SCHÜTTE, H. R. (1963) *Z. Chemie* **3**, 230.

²⁰ NOVER, L. und LUCKNER, M. (1969) *European J. Biochem.* **10**, 268.

²¹ KOUKOL, J. und CONN, E. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2692.

²² ORGANICUM (1965) *Organisch-chemisches Grundpraktikum (Autorenkollektiv)*, S. 446, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

²³ MUNSCHE, D. (1965) *Isotopenpraxis* **1**, 32.

²⁴ CLAISEN, L. (1896) *Ann. Chem.* **291**, 79.

²⁵ TSCHESCHE, R. und WERNER, W. (1967) *Tetrahedron* **23**, 1873.

Fütterung der Versuchspflanzen. Pro Versuchspflanze wurde eine der im folgenden aufgeführten Lösungen verfüttert: 5 mg des jeweils verwendeten D,L-Phenylalanin-[^{14}C , ^3H]-Derivates in 2 ml H_2O ; 5 mg Anthranilsäure-[$^{14}\text{COOH}$, ^{15}N , U - ^3H] in 2 ml 0,2%iger Natriumcarbonatlösung; 2,5 mg Zimtsäure-[$^3\text{-}^{14}\text{C}$] und 2,5 mg D,L-Phenylalanin-[$^3\text{-}^3\text{H}$] in 2 ml 0,05%iger KOH; 2,5 mg Ferulasäure/Isoferulasäure-[methyl- ^3H] bzw. Piperonylsäureäthylester-[U - ^3H] und 2,5 mg D,L-Phenylalanin-[$^3\text{-}^{14}\text{C}$] in 2 ml 0,05%iger KOH; 2,5 mg Benzoylessigsäureäthylester-[U - ^3H] und 2,5 mg D,L-Phenylalanin-[$^3\text{-}^{14}\text{C}$] in 2 ml 0,05%iger KOH unter Zusatz von 1 Tr. Tween 80. Die Fütterung der Precursorlösungen erfolgt mittels Baumwollfadentechnik (vgl. ²⁶) in den unteren Teil des Stengels. Nach ca. 10 hr hatten die Pflanzen die radioaktiven Lösungen vollständig aufgenommen. Es wurde nun und am darauffolgenden Tag jeweils 1 ml H_2O nachgefüttert. Die Aufarbeitung der Pflanzen erfolgte 90 h nach Fütterungsbeginn.

Isolation des Graveolins. Aus dem durch Extraktion der oberirdischen Pflanzenteile der Versuchspflanzen gewonnenen Alkaloidgemisch (vgl. ²⁷) wurde Graveolin durch mehrfache präparative DC (Kieselgel G Merck; Laufmittel I: NH_3 -gesättigter $\text{Ät}_2\text{O}$, R_f -Wert: 0,12; Laufmittel II: Toluol-MeCOOÄt-HCOOH 5:4:1, R_f -Wert: 0,28) isoliert. Die Reinigung des Graveolins bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität erfolgte durch Sublimation (190–195°, 10^{-2} – 10^{-3} Torr) und durch wiederholtes Lösen des Alkaloids in 10%iger HCl und anschließendem Fällen mit 25%igem NH_4OH (Fp. 186–188° bzw. 208–210°, Lit.²⁸: 186–187° bzw. 209–210°), Ausbeute: 0,035% (bezogen auf das frische Pflanzenmaterial).

Abbau des Graveolins. In eine Lösung von 6 mg des isotop markierten Alkaloids in 5 ml CHCl_3 wurde ein Sauerstoff-Ozon-Gemisch (Ozongehalt: 2%) 8 Min. bei Raumtemperatur eingeleitet. Die mit Ozon gesättigte Lösung wurde danach 2 Min stehen gelassen. Anschließend wurden 6 ml 30%iger H_2O_2 zugefügt und das Reaktionsgemisch 30 Min geschüttelt. Durch vorsichtiges Erwärmen wurde das CHCl_3 aus dem Reaktionsgemisch entfernt und der Rückstand nach Zusatz von 5 ml 4%iger KOH und 5 ml ÄtOH 12 h unter Rückflußkühlung gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde danach bei pH 3 viermal mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Aus dem nach dem Abdestillieren des CHCl_3 verbleibenden Rückstand wurde durch Sublimation (120–125°, 10^{-2} – 10^{-3} Torr) ein Gemisch von Anthranilsäure, Methylantranilsäure und Piperonylsäure gewonnen. Das Säuregemisch wurde in 10 ml Azeton gelöst und mittels Kationenaustauscher (Dowex Type 50 WX 2, mesh: 200–400, Gegenion H) aufgetrennt. Das die Piperonylsäure enthaltende Effluat wurde vorsichtig zur Trockne eingedampft. Die Reinigung der Piperonylsäure bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität erfolgte durch Sublimation (110–115°, 10^{-2} – 10^{-3} Torr). Mittlere Ausbeute: 2,7 mg, 80% d. Th.

Anthranilsäure und Methylantranilsäure wurden mit 5 ml 10%igem NH_4OH vom Ionenaustauscher eluiert und anschließend aus dem Eluat bei pH 3 mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Die Reinigung des Säuregemisches bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität erfolgte durch Sublimation (120–125°, 10^{-2} – 10^{-3} Torr). Mittlere Ausbeute: 1,8 mg, 66% d. Th.

Anerkennungen—Herrn Dr. H. Böhm (Institut für Biochemie der Pflanzen der AdW der DDR, Halle) danken wir für die Überlassung von *p*-Cumarsäure-[$^3\text{-}^{14}\text{C}$]. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk und Herrn Dr. B. E. Ellis (Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Bochum) für die Überlassung des mit Tritium markierten Vanillin-Isovanillin-Veratrumaldehyd-Gemisches. Herrn Dr. D. Munsche und Herrn Dr. H. W. Liebisch (Institut für Biochemie der Pflanzen der AdW der DDR, Halle) danken wir für die Durchführung der ^{15}N - bzw. ^{14}C -Bestimmungen.

²⁶ EUW, J. und REICHSTEIN, T. (1964) *Helv. Chim. Acta* **47**, 719.

²⁷ COBET, M. und LUCKNER, M. (1968) *European J. Biochem.* **4**, 76.

²⁸ SCHNEIDER, G. und IMMEL, D. (1967) *Arch. Pharm.* **300**, 953.