

Dieser Versuch deutet an, daß auch zwischen der Haftfestigkeit der  $\beta$ -Chlor-Atome und der Ringgröße Beziehungen zu bestehen scheinen; systematische Vergleichsuntersuchungen in dieser Richtung wären daher interessant. Man

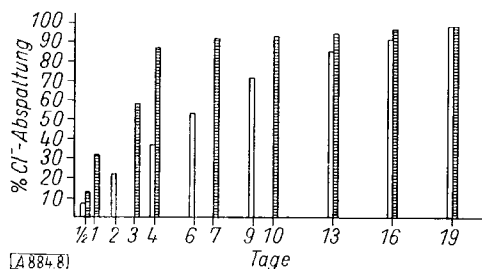


Abb. 8

Chlor-Abspaltung in wäßriger Lösung von B 485 und B 518; schraffiert = 0,05 molare (1,23 %)-Lösung von B 485, weiß: 0,05 molare (1,39 %)-Lösung von B 518. Chlor-Bestimmung: Mercurometrisch nach Clarke.

kann annehmen, daß die Geschwindigkeit der Ringöffnung den Zeitpunkt maßgebend bestimmt, in welchem sich die cytostatische Wirkform bildet.

Unter Zugrundelegung der in Schema C und D dargestellten Abbauege können zunächst die N.N-Bis-( $\beta$ -chloräthyl)-O-(aminoalkanol)-phosphamidestersäuren XI und XIV als cyto-statisch aktive Umwandlungsprodukte diskutiert werden. Sie sind unbeständig und vermögen daher sehr leicht mit Bausteinen der Zelle zu reagieren. Als cytostatisches Agens kommt auch das N.N-Bis-( $\beta$ -chloräthyl)-amin in Frage. Es besitzt bei der Freisetzung in der Zelle noch beide Chlor-Atome, die durch N-Positivierung reaktionsfähig geworden sind<sup>15</sup>). Da der erste Abbauschritt in der Lösung der cyclischen Phosphamid-Bindung gemäß Formeln XI und XIV bestehen dürfte, kann daran gedacht werden, daß er durch die bei malignen Tumoren in erhöhter Konzentration vorliegenden Phosphamidasen<sup>16, 17</sup>) erheblich beschleunigt wird. Eine Tumorspezifität der cyclischen N-Lost-phosphamidester würde hierdurch eine plausible Erklärung finden.

Wir danken: Frau M. Meyer z. Bexten für die papierchromatographischen Untersuchungen, Frau H. Klose für die biochemischen Spaltversuche mit Phosphatase, Herrn M. Meyer z. Bexten für präparative Arbeiten sowie für die Aufnahme und Interpretation von IR-Spektren, Herrn O. Niepel für die wertvolle Mitarbeit bei den Synthesen.

Eingegangen am 28. März 1958 [A 884]

<sup>15</sup>) R. Preussmann, *Arzneimittel-Forsch.* 8, 9 [1958].

<sup>16</sup>) M. Ichihara, *J. Biochemistry [Tokyo]* 18, 87 [1933].

<sup>17</sup>) G. Gomori, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 69, 407 [1948].

## Antimikrobiell wirksame Substanzen in Kulturpflanzen

Von Prof. Dr. ARTTURI I. VIRTANEN\*)

Biochemisches Institut, Helsinki/Finnland

Das Vorkommen von Antibiotica in höheren Pflanzen erklärt ihre seit alters bekannte Heilwirkung. Vorkommen, Isolierung, Struktur, Eigenschaften und Wirksamkeit antimikrobiell wirksamer Substanzen aus Nutzpflanzen werden beschrieben.

Vor der Entwicklung der modernen Medizin waren verschiedene Kräuter die wichtigsten Arzneimittel, und man schrieb einigen Pflanzen einfach wundersame Wirkungen zu. Seit Anfang der 1940er Jahre haben Antibiotica im Kampf gegen die von Mikroorganismen erregten Krankheiten eine entscheidende Bedeutung erlangt, jedoch handelt es sich dabei ausschließlich um Produkte von Mikroorganismen. Aus höheren Pflanzen ist bisher keine einzige antibiotisch wirksame Substanz isoliert worden, die von praktischer Bedeutung für die therapeutische Medizin wäre, wenn auch schon lange vor dem heutigen Zeitalter der Antibiotica festgestellt wurde, daß einige Pflanzen das Wachstum von Mikroorganismen hemmen können.

Die schönen Erfolge der Pflanzenveredelung und -kultivierung bei der Entwicklung neuer, beständigerer und zugleich ertragreicherer Pflanzensorten haben die Frage immer mehr in den Vordergrund treten lassen, worauf die Beständigkeit von Pflanzen gegen pathogene Mikroorganismen eigentlich beruht. Auf diese Frage hat man bisher keine befriedigende Antwort geben können. Die Genetiker haben in einigen Fällen festgestellt, daß die Beständigkeit einer Pflanzensorte gegen irgendeinen pathogenen Pilz von einem oder mehreren Genen bestimmt wird, aber es ist unbekannt geblieben, welchen Mechanismus die Gene beeinflussen.

Pflanzenpathologen scheinen der Annahme, daß das Resistenzvermögen von Pflanzen auf der Produktion antimikrobiell wirksamer Stoffe beruhen könnte, nicht viel Glauben zu schenken. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß man bis vor einigen Jahren in den wichtigsten

Kulturpflanzen, wie z. B. in Getreidepflanzen, noch keine gegen pathogene Krankheitserreger aktiven Substanzen gefunden hatte. Einige Pflanzenpathologen haben die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß eine Infektion in den Pflanzen die Bildung von Antistoffen hervorrufen könnte, die das Wachstum der infizierenden Mikroorganismen hemmen. Eine solche Hypothese ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, wenn sie im Sinne einer allgemeinen Immunisierung der Pflanze in Analogie zu Erscheinungen im tierischen Organismus gedacht ist. Wie wir sehen werden, gibt es aber mehrere Beweise dafür, daß die örtliche Beschädigung pflanzlicher Zellen durch mechanische Verletzung oder vielleicht auch durch Infektionen zu schnellen enzymatischen Reaktionen führen kann, die antimikrobiell wirksame Substanzen aus inaktiven Mutterverbindungen entstehen lassen. Die Möglichkeit, daß Pflanzen über mehrere, zum Teil prinzipiell neuartige Mechanismen verfügen, um von Mikroben verursachte Infektionen abzuwehren, muß ernstlich in Erwägung gezogen werden.

In den letzten Jahren sind verschiedene Kulturpflanzen in unserem Laboratorium untersucht worden, um das Vorhandensein von Stoffen aufzudecken, die gegen Pilzkrankheiten antimikrobiell wirksam sind. Diese Arbeit hat gezeigt, daß in all den zahlreichen von uns untersuchten Kulturpflanzen, auch in Getreidepflanzen, solche Substanzen oder deren Vorstufen angetroffen werden. Einige davon ließen sich bereits in reiner Form isolieren und chemisch charakterisieren. Die antimikrobielle Aktivität pflanzlicher Verbindungen ist meistens gering verglichen mit der enormen Aktivität vieler Antibiotica, die von Mikroorganismen gebildet werden. Die einzige Gruppe von Substanzen, deren Aktivität der gebräuchlicher Antibiotica nahekkommt, ist die der Senföle, die beim Zer-

\*) Nach einem Vortrag auf der dritten Tagung der Nobelpreisträger der Chemie in Lindau (29. 6.—4. 7. 1958). Das Thema wurde auch auf dem deutschen Ernährungskongreß in Mainz (9. 4. 1958) und auf dem Kongreß der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrobiologie in Rheinfelden (28. 6. 1958) behandelt.

quetschen von Pflanzen, die Senfölglykoside enthalten, enzymatisch aus diesen in Freiheit gesetzt werden.

Wie groß die Bedeutung der in den Kulturpflanzen angetroffenen antimikrobiellen Substanzen für deren Resistenz ist, läßt sich nicht leicht ergründen. Angesichts der Konzentrationen, in denen sie in der frischen Pflanze enthalten sind, kann man aber die Auffassung nicht umgehen, daß sie trotz geringer Aktivitäten in der Tat wichtige Faktoren sind. Ehe man ihr Wirken in allen Einzelheiten verstehen kann, bedürfen noch viele Fragen, wie ihre Konzentration in den verschiedenen Teilen der Pflanze und in den verschiedenen Wachstumsstadien, ihre Löslichkeit im Pflanzensaft und Cytoplasma, die Abhängigkeit ihrer Synthese von Licht und Temperatur, einer genaueren Aufklärung.

Vor etwa drei Jahren begannen wir zu untersuchen, ob möglicherweise in jungen Roggenpflanzen eine gegen Schneeschimmel, *Fusarium nivale*, aktive Substanz zu finden sei. Dieser Pilz vernichtet die aufgegangene Roggen- saart besonders in solchen Wintern, in denen eine dicke Schneedecke den ungefrorenen oder nur leicht gefrorenen Erdboden bedeckt. Nur die nördlichen Roggensorten können deswegen in Finnland angebaut werden. Diese Sorten haben lange Halme, was *O. Pohjanheimo*, einen finnischen Pflanzenveredler, auf den Gedanken brachte, daß möglicherweise Auxine bei der Resistenz eine Rolle spielen. *Hietala* und ich<sup>1, 2)</sup> konnten jedoch nachweisen, daß junge Roggen- pflanzen zwar eine bedeutende Wirksamkeit gegen *Fu- sarium nivale* zeigen, daß diese aber nicht den Auxinen zu- kommt. Der Preßsaft als solcher oder oft auch mit demsel- ben Volumen Wasser verdünnt genügte, um das Wachs- tum der Pilzes zu hemmen<sup>3)</sup>). Der aktive Faktor ließ sich aus zerriebenen, leicht angesäuerten Pflanzen quantitativ mit Äther extrahieren, mit Äthanol auch ohne vorheriges Ansäuern. Auf dem Papierchromatogramm wandert die Substanz bei Verwendung der Lösungsmittelkombination Isopropanol-Ammoniak-Wasser mit einem  $R_f$ -Wert, der von dem von Substanzen mit Auxinwirkung gänzlich ver- schieden ist (Abb. 1).

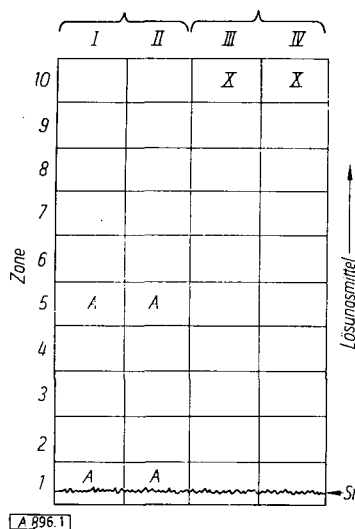


Abb. 1  
Papierchromatogramm (aufsteigend) eines Äther-Extraktes aus jungen Roggenpflanzen (Lipide vorher mit Wasser entfernt). Whatman 1 Papier, 22x24 cm, Lösungsmittel Isopropanol-Ammoniak-Wasser (8:1:1), 0,4 ml Äther-Extrakt wurden auf eine 12 cm lange Startlinie pipettiert, Laufzeit des Lösungsmittels 12 h. Das Papier wurde horizontal in 10 Streifen geschnitten. A = Substanzen mit Auxinwirkung, X = Substanzen mit Antifungalwirkung (Seitenlänge eines Feldes 3 cm x 2 cm im Original).

<sup>1)</sup> A. I. Virtanen u. P. K. Hietala, Acta chem. scand. 9, 1543 [1955]; Suomen Kemistilehti 28 B, 165 [1955].

<sup>2)</sup> A. I. Virtanen, Vortrag auf dem 1. europäischen Symposium für Biochemie der Antibiotica, Milano, 9. Sept. 1956, Giron. Microbiol. 2, 15 [1956].

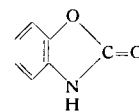
<sup>3)</sup> Raible und Virtanen haben in einer Mitteilung<sup>3)</sup> über die antifungale Aktivität von Heidelbeerpflanzen, die nach dieser Arbeit von Gerbstoffen herrührt, den Ausdruck „antimikrobielle Einheit“ gebraucht. Wenn die Aktivität der frischen Pflanze eben genügt, um das Wachstum des Testorganismus zu hemmen, so entspricht ihre Aktivität einer antimikrobiellen Einheit. Die Aktivität der jungen Roggenpflanzen ist also 1–2 Einheiten.

<sup>3)</sup> Raible u. A. I. Virtanen, Acta chem. scand. 11, 1432 [1957].

Die Aktivität gegen *Fusarium* wurde nur in einer Zone (X) in der Nähe der Lösungsmittelfront gefunden, die Zonen mit Auxinwirkung (A) zeigten keine antifungale Wirkung.

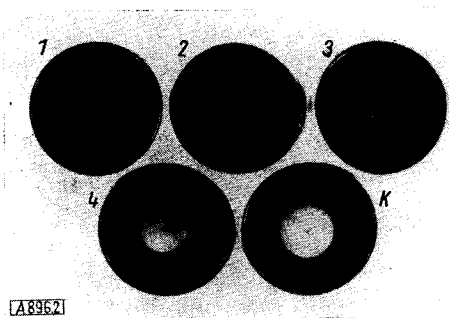
Die antifungale Aktivität wurde bestimmt, indem man die Oberfläche des mit Nährlösung befeuchteten Papierchromatogramms mit *Fusarium*-Hyphen infizierte, wobei der Pilz überall auf dem Papier außer auf der Zone mit aktiver Substanz wuchs, oder indem man das Papierchromatogramm quer in Streifen zerschneidet, diese mit Wasser extrahiert und die eingeeengte Lösung auf eine Agar-Platte brachte, die mit dem Pilz infiziert worden war.

In der Cellulose-Säule ließ sich der aktive Stoff aus dem Pflanzenextrakt abtrennen und nach verschiedenen Operationen als reine, kristalline Substanz gewinnen. Die Konstitutionsaufklärung<sup>1)</sup> ergab, daß es sich um Benzoxazolinon (BOA) handelt, das in der Natur bisher nicht angetroffen worden ist. Die Konstitution konnte durch Synthese aus o-Aminophenol und Harnstoff gesichert werden.



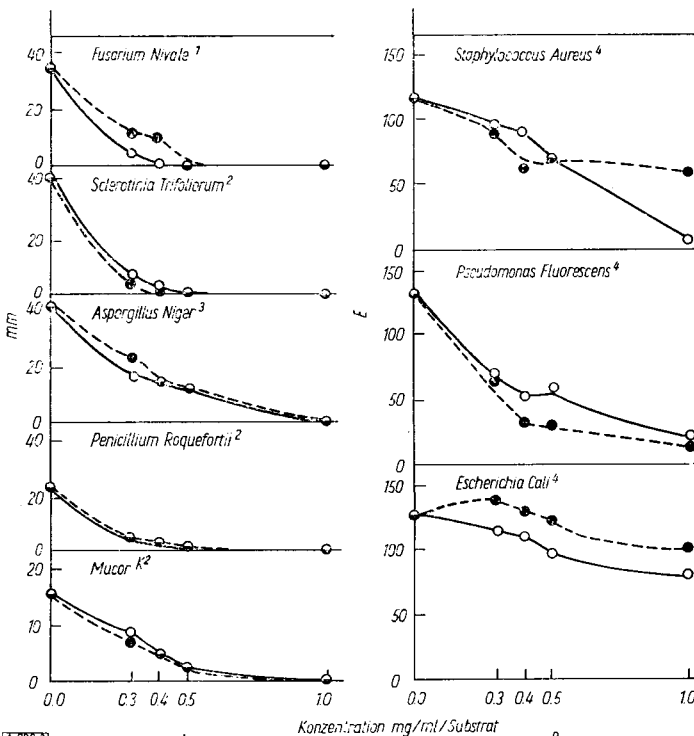
Benzoxazolinon (BOA)

Die Aktivität der Substanz gegen *Fusarium nivale* und gegen viele andere Mikroorganismen geht aus den Abb. 2 und 3 hervor<sup>2, 4)</sup>.



[A 896.2]

Abb. 2. Wachstum von *Fusarium nivale* auf Hafermehl-Glycerin-Agar. BOA-Konzentration: 1 = 0,1 %, 2 = 0,05 %, 3 = 0,01 %, 4 = 0,002 %, K = Kontrolle



[A 896.3]

Abb. 3. A. Wachstum verschiedener Pilze. 1. auf Hafermehl-Glycerin-Agar, 2. auf Glucose-Agar, 3. auf Hefe-Agar Ord.: Koloniedurchmesser in mm, Absz.: Konzentration von BOA (---) bzw. MBOA (—) in mg/ml Substrat; MBOA = 6-Methoxy-2(3)-benzoxazolinon; B. Wachstum von Bakterien in Fleischextrakt-Nährlösung, Ord.: Extinktion bei 622 mμ

<sup>4)</sup> A. I. Virtanen, P. K. Hietala u. Ö. Wahlroos, Arch. Biochem. Biophysics 69, 486 [1957].

Nach Wahlroos und Virtanen<sup>5)</sup> werden die Pilz-Hyphen durch eine Lösung, die mehr als 0,06% BOA enthält, getötet, bei geringeren Konzentrationen ist die Einwirkung mehr fungistatisch, und die Hyphen beginnen nach einer Adaptationszeit zu wachsen (Abb. 4).

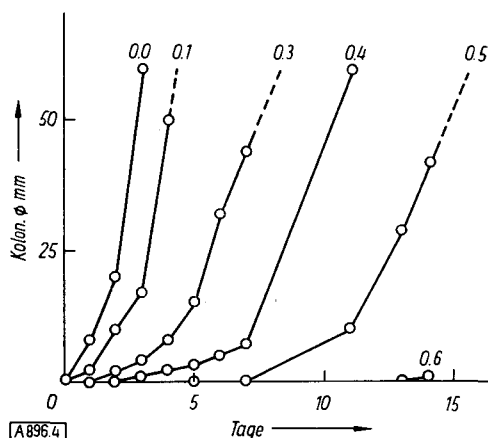


Abb. 4. Wachstum des Mycel von *Fusarium nivale* auf Hafer-Glycerin-Agar mit BOA. Die Zahlen der Kurven geben BOA-Konzentrationen in mg/ml an.

Zur Bestimmung von BOA wurde eine Mikromethode<sup>6)</sup> entwickelt, die auf der Messung der UV-Absorption bei 257 m $\mu$  in äthanolischer Lösung beruht. Mit ihrer Hilfe läßt sich die Substanz aus 1–2 g frischer Pflanzen quantitativ bestimmen, wenn störende Stoffe vorher in einer Cellulosesäule entfernt werden.

Die Substanz ist nicht in den Körnern vorhanden, sondern bildet sich erst beim Keimen. Etwas BOA entsteht bereits beim Keimen im Dunkeln, die kräftige Synthese beginnt aber erst nach dem Grünwerden des Keimes und nach dem Einsetzen der Assimilation<sup>4, 7)</sup> (Abb. 5).

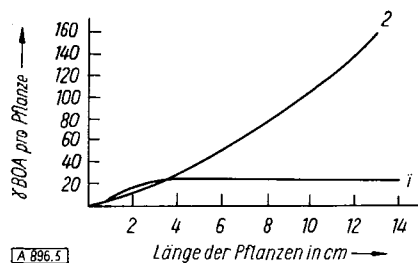


Abb. 5. Bildung von BOA in Roggenpflanzen (Pekka Sorte). 1. im Dunkeln, 2. im Licht

Bei den von uns untersuchten Roggensorten steigt die BOA-Konzentration auf maximal 0,06–0,1% des Frischgewichtes, was völlig ausreicht, um das Wachstum von *Fusarium nivale* zu hemmen. Werden die im Licht gewachsenen jungen Roggenpflanzen mit *Fusarium*-Hyphen infiziert, so vermag der Pilz auf ihnen nicht zu wachsen und stirbt bald ab. Wird der entsprechende Versuch mit Pflanzen vorgenommen, die im Dunkeln gewachsen sind, so wächst der Pilz schnell und vernichtet sie in etwa 1–2 Wochen<sup>2, 4)</sup> (Abb. 6 und 7).

Diese Versuche in vivo beweisen natürlich nicht bindend, daß die Resistenz der jungen Roggenpflanzen auf deren BOA-Gehalt zurückzuführen ist, weil gleichzeitig noch andere Veränderungen neben der Synthese bzw. dem Abbau von BOA in den Pflanzen möglich sind. Sie machen die Annahme einer durch BOA bedingten Resistenz jedoch sehr wahrscheinlich.

<sup>5)</sup> Ö. Wahlroos u. A. I. Virtanen, Acta chem. scand. 12, 124 [1958].

<sup>6)</sup> P. K. Hietala u. A. I. Virtanen, ebenda 12, 119 [1958].

<sup>7)</sup> A. I. Virtanen, A. Aura u. T. Ettala, Suomen Kemistilehti 30 B, 246 [1957].

Im Herbst ist die aufgegangene Saat durch BOA geschützt. Andere antifungale Substanzen kommen zu dieser Zeit in den jungen Roggenpflanzen nicht oder wenigstens nicht in bedeutender Menge vor, denn die Totalaktivität der Pflanze nach Extraktion mit 70proz. Äthanol übersteigt nicht oder nur wenig die Aktivität, die sich aus ihrem BOA-Gehalt berechnet<sup>1)</sup>. Beim Eintritt des Winters mit Frost sinkt der BOA-Gehalt binnen einer Woche auf ungefähr  $\frac{1}{10}$  des Herbstwertes. Die antimikrobielle Aktivität



Abb. 6. Links: 16 Tage alte Roggenpflanzen in Quarzsand. Samen mit *Fusarium nivale* infiziert. Im Licht gewachsen. Benzoxazolinon-Gehalt der Pflanzen 0,09%. Rechts: Parallelversuch im Dunkeln, Benzoxazolinon-Gehalt der Pflanzen 0,02%. Auf den Sand wurde in beiden Versuchen nach der Aussaat Ruß aufgetragen, um die *Fusarium*-Hyphen im Bild klar sichtbar werden zu lassen.

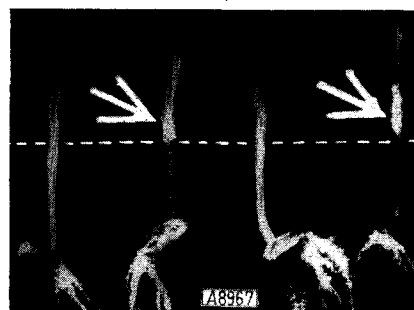


Abb. 7. Die in Abb. 6 gezeigten jungen Pflanzen aus dem Sand gezogen. Von links gerechnet: Pflanzen 1 und 3 im Licht, 2 und 4 im Dunkeln gewachsen. Die Pfeile weisen auf die *Fusarium*-Hyphen am Schaft oberhalb der Sandoberfläche. Die Zerstörung des Schaftes ist besonders unterhalb der *Fusarium*-Hyphen gut sichtbar. Die weißen Körner im Bild sind Quarzkörner, die an den Wurzeln und teilweise an den *Fusarium*-Hyphen haften geblieben sind. — — — Oberfläche des Sandes.

der Pflanze verringert sich dabei zwar auch etwas, aber nicht in demselben Verhältnis. Bei der Spaltung des BOA-Moleküls entstehen also offenbar neue antifungal wirksame Substanzen, möglicherweise über o-Aminophenol. Diese Substanzen werden zur Zeit in unserem Laboratorium untersucht. Im Frühling wird nach der Schneeschmelze neues BOA synthetisiert<sup>2)</sup> (Abb. 8).

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, ist am 30. 4., wenn kein Schnee mehr vorhanden ist, plötzlich eine neue Substanz mit einem Absorptionsmaximum bei 260 m $\mu$  vorhanden (Kurve 4). Dieses Maximum wurde am selben Tag bei fünf verschiedenen Roggensorten gefunden. Später im Mai hat die gleiche Fraktion des Pflanzenextraktes wieder das für BOA typische Absorptionsmaximum bei 275 m $\mu$  (Kurve 5).

Der BOA-Gehalt sinkt auch, wenn die jungen Roggenpflanzen wachsen (Abb. 9).

Abermals nimmt dabei die antifungale Aktivität des Preßsaftes weniger stark ab als der BOA-Gehalt. Wie Abb. 10 zeigt, ist die Verteilung des BOA in den Roggenkeim-

lingen nicht gleichmäßig<sup>4)</sup>, was darauf hindeutet, daß BOA hauptsächlich in den Zellen der Pflanze vorkommt.

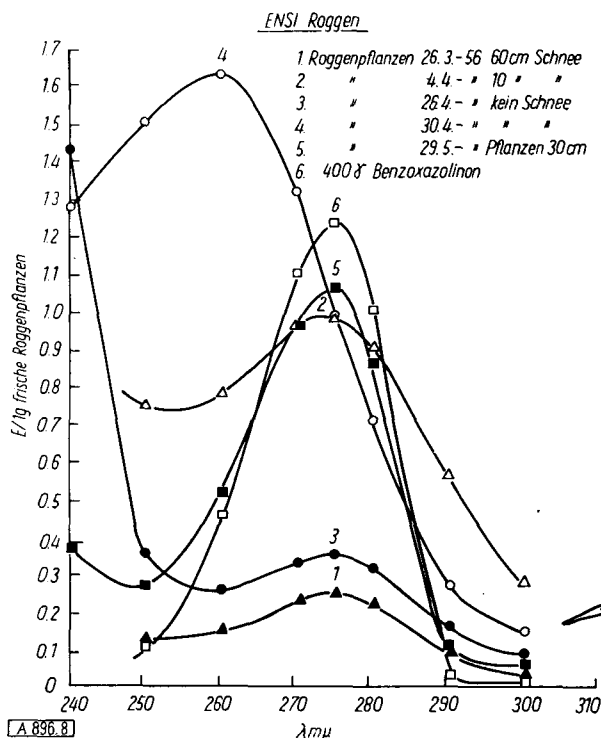


Abb. 8. UV-Spektrum der BOA enthaltenden Fraktion (äthanolische Lösung). Tag der Probenahme und Dicke der Schneedecke gehen aus dem im Bild befindlichen Text hervor.

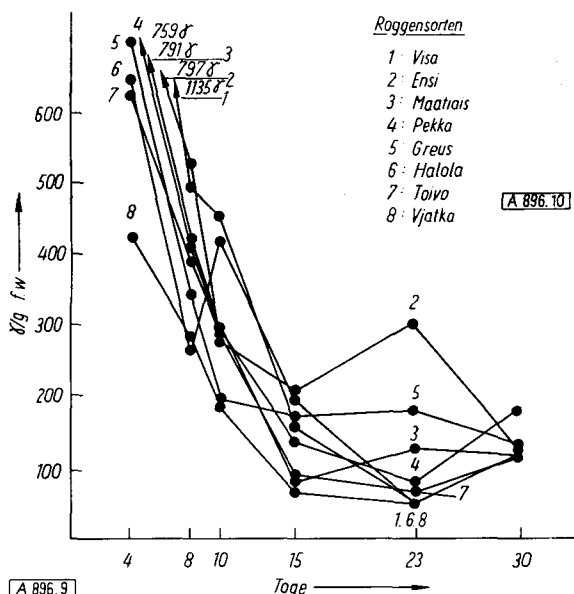


Abb. 9. BOA-Gehalt verschiedener Roggensorten (γ/g Frischgewicht). Im Gewächshaus gewachsen, Alter der Pflanzen 3-30 Tage. Höhe der Pflanzen nach 30 Tagen etwa 35 cm

Wie schon gesagt, wird BOA aus den zerriebenen jungen Roggenpflanzen mit 70proz. Äthanol quantitativ extrahiert, mit Äther dagegen nur nach Aufkochen des wäßrigen Extraktes oder nach Ansäuern bis etwa  $p_H$  2. Bei  $p_H$  5 ist die Ausbeute noch etwa 35%, bei  $p_H$  6 geht aus pflanzlichen Extrakten kein BOA mehr in die Ätherschicht. In Wasser gelöstes BOA geht dagegen leicht und ohne Ansäuern in Äther über. Beim Dialysieren des Preßsaftes der Roggenpflanzen gegen Wasser geht BOA durch die Membran und die biologische Aktivität des Dialysates entspricht seinem BOA-Gehalt. BOA ist jedoch auch daraus ohne Ansäuern oder Kochen der Lösung nur zum kleinen Teil mit Äther extrahierbar. Auf Grund dieser und anderer Beobachtungen ist zu schließen, daß BOA in den Roggenpflanzen auf irgendeine Weise an relativ niedermolekulare Substanzen gebunden sein muß. Die

Annahme, daß BOA erst beim Extrahieren des Preßsaftes überhaupt gebildet würde, ist unwahrscheinlich, weil ja die biologische Aktivität des Preßsaftes seinem BOA-Gehalt entspricht.

Als Windblütler sind die üblichen Roggensorten genetisch mehr oder weniger heterogen. Der BOA-Gehalt einzelner Pflanzenindividuen derselben Roggensorte kann daher ganz überraschend verschieden sein<sup>2)</sup>. Große Differenzen kommen besonders dann vor, wenn man Roggen im Gewächshaus kultiviert, wobei jedes Pflanzenindividuum überlebt.

Die Frage, ob zwischen dem BOA-Gehalt und der Beständigkeit verschiedener Roggensorten eine eindeutige Korrelation besteht, können wir noch nicht beantworten,

vor allem weil während der kritischen Zeit im Winter unter dem Schnee und im Frühling während der Schneeschmelze der BOA-Gehalt der Pflanzen stark erniedrigt ist und statt dessen neue antifungale Substanzen wirksam sind. Die verhältnismäßig wenigen BOA - Bestimmungen von Hietala und Virtanen 1956 gaben zwar den Hinweis, daß beständigere Sorten bedeutend mehr BOA enthalten als schlecht überwinternde (Abb. 11), mit einer endgültigen Antwort läßt sich aber erst rechnen, wenn das im vergangenen Winter und Frühling gewonnene Material analysiert worden ist.

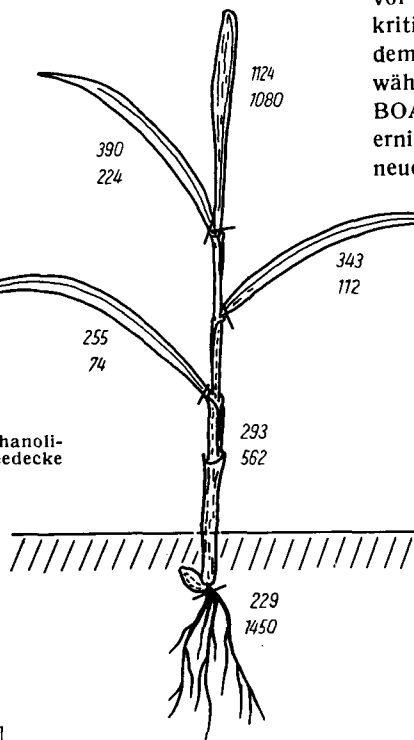


Abb. 10. Verteilung von BOA in jungen grünen Roggenpflanzen (γ/g Frischgewicht). Die oberen Zahlen gelten für die Ensi-Sorte, die unteren für die Kungsräg II. Sorte.

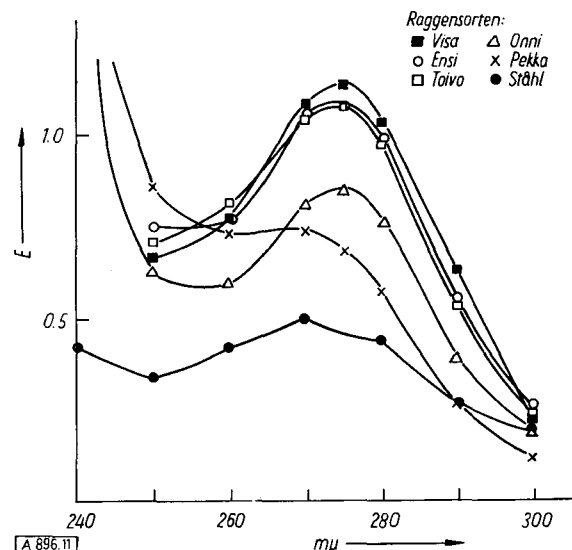
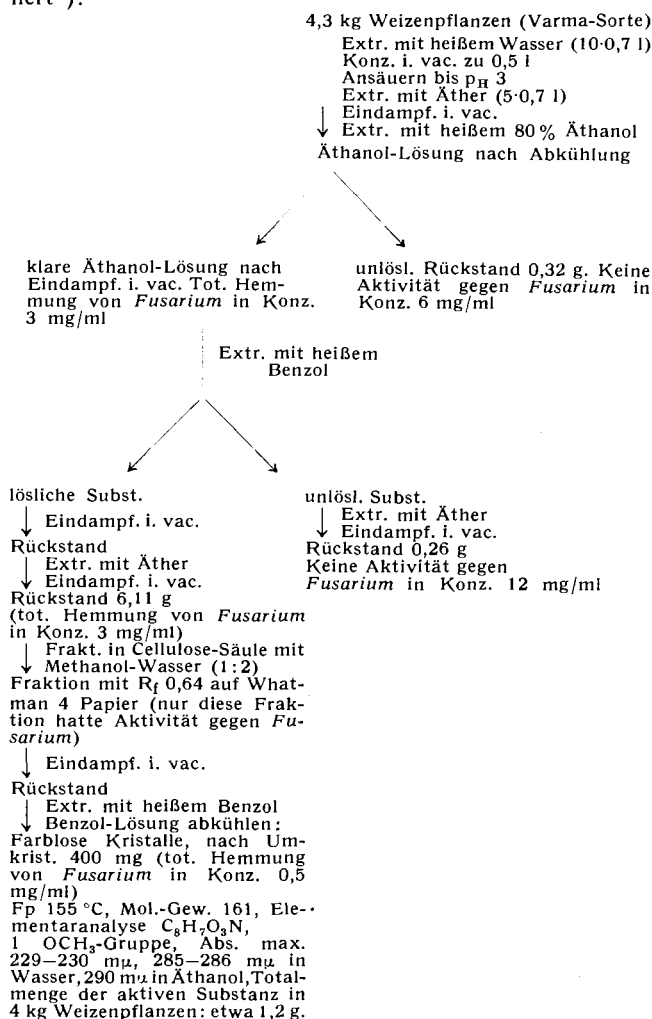
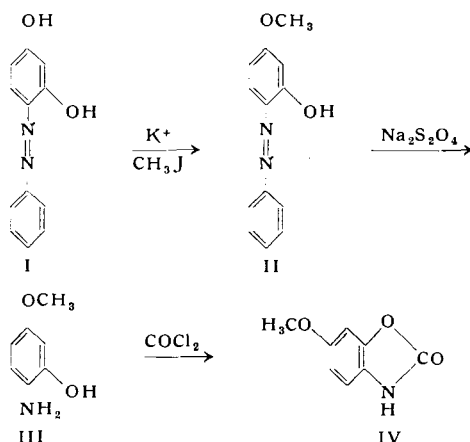


Abb. 11. UV-Spektrum der BOA-Fraktion verschiedener Roggensorten. Die Fraktion wurde in einer Cellulosesäule gereinigt. Feldexperiment, Proben am 4. 4. 56 genommen; Schneedecke 10 cm (am 26. 3. noch 60 cm).

Eine andere mikrobiell wirksame Substanz wurde aus jungen Weizen- und Maispflanzen in folgender Weise isoliert<sup>8)</sup>:



Wir konnten sie als 6-Methoxy-benzoxazolinon (IV) charakterisieren<sup>8)</sup> und diese Struktur durch folgende Synthese sichern<sup>2, 8, 9)</sup>:



Die biologische Aktivität des Methoxy-Derivates ist etwa so groß wie die des Benzoxazolinons selbst (Abb. 3).

Unabhängig von uns isolierte Loomis<sup>10)</sup> aus jungen Maispflanzen eine kristalline Substanz, die ein für den Mais gefährliches Insekt, den europäischen Maisbohrer (*Pyrau-*

<sup>8)</sup> A. I. Virtanen, P. K. Hietala u. Ö. Wahlroos, Suomen Kemistilehti 29 B, 143, 147 [1956].

<sup>9)</sup> P. K. Hietala u. Ö. Wahlroos, Acta chem. scand. 10, 1196 [1956].

<sup>10)</sup> R. S. Loomis, briefl. Mitteil., 18. 4. 1956.

sta nubilalis, Hubn.), vernichtet. Diese Substanz erwies sich als mit dem von uns aus Weizen und Mais isolierten 6-Methoxy-benzoxazolinon identisch, das demnach sowohl eine antimikrobielle als auch eine insektizide Aktivität besitzt. Ähnliche Beobachtungen hatte man schon früher am Tomatin, dem antifungalen Faktor der Tomaten gemacht<sup>18)</sup> (s. S. 549).

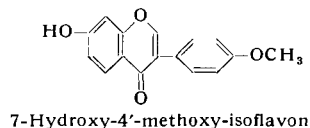
Auf die Ernährung des Menschen haben die in jungen Getreidepflanzen vorkommenden antimikrobiellen Substanzen keinen Einfluß, weil der Mensch die jungen Pflanzen nicht zu seiner Ernährung benutzt. Haustiere können dagegen bedeutende Mengen Benzoxazolinon erhalten, wenn junge Roggenpflanzen im Herbst als Futter verwendet werden. In Versuchen mit Ratten ließen sich jedoch keine schädlichen Wirkungen des BOA auf Wachstum und Wohlbefinden der Tiere feststellen, auch nicht bei weit höheren Konzentrationen, als Tiere sie mit der Nahrung zu sich nehmen können. Im Kuhfutter enthaltenes BOA gelangt nicht in die Milch. Als neutrale und geschmacklose Substanz ist BOA ein gutes Konservierungsmittel für Obstsaft und Obstmus.

Antimikrobiell wirksame Stoffe aus den wichtigen, zu den Leguminosen gehörenden Futterpflanzen Rotklee, Weißklee und Blauluzerne sind in unserem Laboratorium Gegenstand besonderen Interesses gewesen. Der Rotklee ist die wichtigste Futterpflanze Finnlands und überhaupt der nördlichen Länder. Die Kleeäule, *Sclerotinia trifoliorum*, zerstört ihn jedoch in großem Umfang besonders in Wintern, die auf einen langen und regnerischen Herbst folgen.

Die antifungale Aktivität des Rotklee gegen *Sclerotinia* läßt sich quantitativ mit 70proz. Äthanol oder Äther extrahieren<sup>11)</sup>. Beim Schütteln der Äther-Lösung mit 2 n Sodalösung geht etwa die Hälfte der Aktivität verloren und ist auch in der Sodalösung nicht mehr zu finden.

Die Aktivität des Rotklee (Äthanol-Extrakt) variierte bei unseren Bestimmungen zu verschiedenen Zeiten des Sommers zwischen 0,5 und 4 antimikrobiellen Einheiten. Die niedrigste Aktivität wurde im Frühjahr, beim Beginn des Wachstums gefunden. Die Verteilung der Aktivität auf die verschiedenen Teile und Gewebe der Pflanze ist noch nicht untersucht worden.

Durch Gegenstromverteilung mit Butanol-3 n-Ammoniak wird die Aktivität in zwei Fraktionen geteilt, von denen eine in der Ammoniak-Lösung bleibt, während die andere in die Butanol-Phase geht. Aus letzterer haben Hietala und Virtanen zwei Faktoren in kristalliner Form isoliert: eine Substanz A 1<sup>11)</sup> mit der Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> und einem Absorptionsmaximum bei 262 mμ (in 94proz. Äthanol) und eine Substanz A 2<sup>12)</sup> mit der Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> und einem Absorptionsmaximum bei 249 mμ. Letztere kommt im Rotklee bedeutend reichlicher vor als erstere. Die Trennung beider Substanzen voneinander ist schwierig, da ihre Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln sehr ähnlich ist. Trocknet man Rotklee, so verschwindet A 1, wodurch die Isolierung von A 2 sehr erleichtert wird. A 2 ist nach unseren Untersuchungen 7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavan<sup>12)</sup>.



Diese Substanz ist identisch mit Prato, das von Power und Salway<sup>13)</sup> aus den Blüten des Rotklee isoliert und als Flavon charakterisiert wurde. Die Isoflavonstruktur ist jedoch von uns bindend bewiesen worden. Dieselbe Struktur hat auch das von Wessely und Mitarbeitern<sup>14)</sup> schon früher synthetisierte Formonetin, das sich als mit unserer Substanz A 2 identisch erwiesen hat<sup>12)</sup>.

<sup>11)</sup> A. I. Virtanen u. P. K. Hietala, Suomen Kemistilehti 29 A, 280 [1956], 30 B, 99 [1957].

<sup>12)</sup> P. K. Hietala u. A. I. Virtanen, Acta chem. scand. 12, 119 [1958].

<sup>13)</sup> F. B. Power u. A. H. Salway, J. chem. Soc. [London] 97, 231 [1910].

<sup>14)</sup> F. Wessely, L. Kornfeld u. F. Lechner, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 685 [1933].

Die Konstitution von A 1 ist noch nicht völlig aufgeklärt. Ebenso konnte die Substanz, die in der Ammoniak-Phase bleibt und möglicherweise der wichtigste anti-Sclerotinia-Faktor im Rotklee ist, noch nicht näher charakterisiert werden. Sie wurde eben als kristallines Kupfersalz rein isoliert.

Die sehr geringe Wasserlöslichkeit der isolierten Substanzen A 1 und A 2 erschwert die Bewertung ihrer antimikrobiellen Aktivität. Im Pflanzensaft konnten Kristalle dieser Substanzen nicht beobachtet werden. Zentrifugiert oder filtriert man den Preßsaft, der im rohen Zustand gegen *Sclerotinia* aktiv ist, so bleiben nur Spuren der Aktivität im Filtrat.

Fressen Kühe große Mengen Rotklee, so können sie täglich bis zu 70 g des oben erwähnten Isoflavons und etwa 30 g der Substanz A 1 zu sich nehmen. Ob und in welchem Maße diese Stoffe auf die Zusammensetzung der Mikrobenflora des Pansens einwirken, ist nicht bekannt. Dem Isoflavon kommt jedenfalls eine oestrogene Wirkung zu, wie Cheng und Mitarbeiter<sup>15)</sup> mit einem synthetischen Präparat gezeigt haben.

Die starke antifungale Wirksamkeit des Weißklee (etwa 3–10 antimikrobielle Einheiten) scheint mit wenigstens zwei Substanzen verbunden zu sein. Die Substanzen A 1 und A 2 kommen nicht im Weißklee vor. (Virtanen und Björkstén). Ein Äthanol-Extrakt aus Blauluzerne (*Medicago sativa*) enthält ebenfalls eine bedeutende Aktivität gegen *Sclerotinia* (etwa 2 antimikrobielle Einheiten). Es ist interessant, daß die mit Äther gewaschene Saponin-Fraktion der Blauluzerne noch antimikrobiell wirksam ist (Virtanen und Piironen). Möglicherweise kommt diese Aktivität jedoch nicht den Saponinen selbst zu.

Die antimikrobielle Aktivität der Möhre ergibt sich aus dem Zusammenwirken sehr vieler Substanzen, die kürzlich von DeLaey und Virtanen näher untersucht worden sind<sup>17)</sup>. Nach Mukula<sup>18)</sup> ist in Finnland das Verderben von Möhren beim Lagern vor allem auf vier Pilzarten zurückzuführen: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Stemphylium radicinum* und *Fusarium avenaceum*. Direkt nach dem Einbringen der Ernte im Herbst besitzen die Möhren eine ziemlich gleichmäßig durch die ganze Wurzel verbreitete antifungale Aktivität von etwa 1–1,5 Einheiten (mit *Fusarium nivale* als Testorganismus). Die aktiven Substanzen lassen sich nicht mit Wasser extrahieren, dagegen quantitativ sowohl mit 70proz. Äthanol als auch mit Äther. Die mit Äther gewaschene Oberfläche der durchschnittenen Möhre erweist sich bereits als guter Boden für die schädlichen Pilze. Während der Lagerung sinkt die antifungale Aktivität der Möhre je nach Sorte verschieden stark ab. Die aufgehellte Mitte der Chanteneay-Möhre besitzt nach fünfmonatiger Lagerung praktisch keine Aktivität mehr gegen *Fusarium* und *Stemphylium*, wohl aber die dicke Außenschicht der Möhre, die unter der Einwirkung von Polyphenol-Oxydase während der Lagerung immer dunkler geworden ist.

Es ergab sich, daß die saure Fraktion des Äther-Extraktes nahezu die gesamte antimikrobielle Aktivität der Möhre enthält. Bisher ließen sich darin Benzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure nachweisen. Diese Säuren kommen auch in den Blättern der Möhre vor. Das in der Möhre in geringer Menge auftretende Terpen  $\alpha$ -Pinen ist ebenfalls antifungal wirksam.

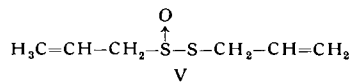
Die bisher charakterisierten Säuren reichen wegen ihrer kleinen Menge jedoch nicht aus, um die gesamte antimikrobielle Aktivität der Möhre zu erklären. Es ist daher möglich, daß die Chinonbildung durch Polyphenol-Oxydase zur antifungalen Aktivität beiträgt oder daß der Ätherextrakt doch noch weitere aktive Substanzen enthält. Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Irving<sup>19)</sup> untersuchte vor einigen Jahren die Resistenz verschiedener Tomatensorten gegen *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*, welches das Welken der Tomatenpflanzen bewirkt. Sie isolierten aus Tomatenblättern in kristalliner Form das Tomatin und stellten fest, daß dieses gegen einige menschenpathogene Pilze antifungal wirksam ist, gegen das fragliche *Fusarium* dagegen nur eine sehr schwache Aktivität besitzt. Diese Aktivität kommt dem Aglykon des Tomatins, dem Tomatidin, zu. Tomatin ist auch gegen Kartoffelkäfer und dessen Larven wirksam.

Die verschiedene Beständigkeit der Kartoffelsorten gegen die Kartoffelfest (*Phytophthora infestans*) ist in vielen Ländern Gegenstand großen Interesses gewesen. Im Rahmen dieser Ausführungen kann ich auf diese Arbeiten und auf die im Zusammenhang mit ihnen vorgetragenen Hypothesen nicht näher eingehen. Ich erwähne nur, daß E. Valle<sup>19)</sup> in unserem Laboratorium ein paar Jahre lang besonders die gegen Kartoffelfest aktiven Substanzen des Kartoffelkrautes untersucht hat. Chlorogensäure findet sich in den Kartoffelblättern in einer Menge von etwa 0,5–3 mg/g frischer Pflanze. Eine Bewertung ihrer Bedeutung als antifungal wirksamer Substanz wird durch den Umstand erschwert, daß das bei ihrer Oxydation entstehende Chinon stärker als die Säure selbst wirksam ist. Die Aktivität der Polyphenol-Oxydase in den Kartoffelblättern ist deshalb möglicherweise von Bedeutung für deren Resistenz.

Die bis hierher beschriebenen antifungalen Substanzen sind als Ergebnis des normalen Stoffwechsels in den Pflanzen gebildet worden, wenn man auch z. B. bei Kartoffel und Möhre damit zu rechnen hat, daß weitere derartige Substanzen sekundär bei mechanischer Beschädigung oder Infektion der Pflanze enzymatisch entstehen. Im folgenden werden Pflanzen behandelt, in denen sich antimikrobiell wirksame Stoffe allgemein erst unter der Einwirkung äußerer Verletzungen bilden. Wir kommen dabei gleichzeitig zu Fragen, die auch vom Standpunkt der Ernährung des Menschen und der Tiere wichtig sind.

Jahrtausende alte Vorstellungen von der verhütenden und heilenden Wirkung einiger Pflanzen, besonders des Knoblauchs (*Allium sativum*) und des Kohls, haben durch die moderne Forschung zum Teil eine Erklärung gefunden. Man hat nämlich zeigen können, daß Pflanzen der Gattungen *Allium* und *Brassica* sowie einige andere Vegetabilien antimikrobielle Eigenschaften haben. Es wurde früher angenommen, daß die antibakterielle Wirkung des Knoblauchs auf den sehr unangenehmen Geruchsstoffen beruht, die bei seiner Zerkleinerung entstehen und unter denen Diallyl-disulfid den wichtigsten Platz einnimmt. Erst 1944 stellten Cavallito und Bailey<sup>20)</sup> fest, daß beim Zerreiben von Knoblauch enzymatisch eine stark antibiotisch wirksame Substanz gebildet wird, die einen nur schwachen und nicht unangenehmen Geruch hat. Sie nannten diese Substanz Allicin und nahmen für sie die Struktur eines Diallyl-thiosulfates (V) an, die später durch die Untersuchungen von Stoll und Seebach<sup>21)</sup> sichergestellt wurde.



Allicin verhindert nach den Ermittlungen von Cavallito und Bailey schon in einer Verdünnung von 1:125000 das Wachstum zahlreicher grampositiver und gramnegativer

<sup>15)</sup> E. Cheng, L. Yoder, Ch. D. Story u. W. Burroughs, Science [Washington] 120, 575 [1954].

<sup>16)</sup> J. Mukula, Acta Agric. scand. 1957, Suppl. 2.

<sup>17)</sup> P. De Laey u. A. I. Virtanen, Suomen Kemistilehti 30 B, 218 [1957].

<sup>18)</sup> G. W. Irving jr., Washington Acad. Sci. 37, 293 [1947].

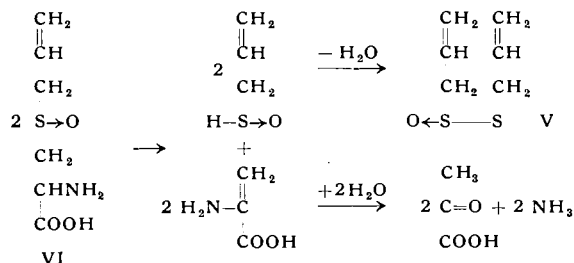
<sup>19)</sup> E. Valle, Acta chem. scand. 11, 395 [1957].

<sup>20)</sup> C. J. Cavallito u. J. Bailey, J. Amer. chem. Soc. 66, 1952 [1944].

<sup>21)</sup> A. Stoll u. E. Seebach, Helv. chim. Acta 31, 189 [1948]; Advances in Enzymol. 2, 377 [1951].

Bakterien, auch solcher, auf die Penicillin praktisch keine Wirkung hat. Die Aktivität des Allicins gegen einige Tumortypen hat *H. v. Euler*<sup>22)</sup> bei Ratten gefunden.

*Stoll* und *Seebach*<sup>21)</sup> isolierten einige Jahre später aus Knoblauch die Substanz, aus der Alliin enzymatisch entsteht. Sie erhielt den Namen Alliin und wurde als (+)-S-Allyl-L-cysteinsulfoxyd (VI) erkannt. Natürliches Alliin und seine drei Isomeren wurden von *Stoll* und *Seebach* synthetisiert, die auch den Verlauf der enzymatischen Spaltung unter Bildung von Allicin (V) aufklären konnten.

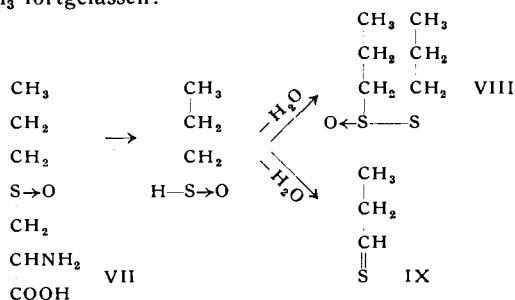


Eine andere, allgemein als Gewürz und in einigen Ländern auch als Nahrung verwendete Zwiebelart ist die Hauszwiebel (*Allium cepa*). In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über ihre antibiotische Wirksamkeit. Man hat sowohl flüchtige als auch nichtflüchtige aktive Substanzen in ihr nachgewiesen<sup>23)</sup>. *Huddleson* und Mitarbeiter<sup>24)</sup> haben aus der Zwiebel einen Extrakt hergestellt, der das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, *Brucella abortus* und vielen anderen pathogenen, grampositiven Bakterien in einer Verdünnung von 1:1600000 verhindert. *Huddleson* konnte auch zeigen, daß das aktive Prinzip der Zwiebel nicht Crotonaldehyd ist, wie *Ingersoll* und Mitarbeiter<sup>25)</sup> früher vermutet hatten. *Gupta* und *Viswanathan*<sup>26)</sup> teilten kürzlich mit, daß sie aus *Allium schoenoprasum* ein Wasserdampf-Destillat erhalten haben, dessen Äther-Extrakt in einer Konzentration von 1,25 bis 2,5  $\gamma$  pro ml das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* (auch gegen Streptomycin resistenter Stämme) inhibiert. Der entsprechende Extrakt aus der Hauszwiebel hat den gleichen Effekt in einer Konzentration von 10  $\gamma$ /ml.

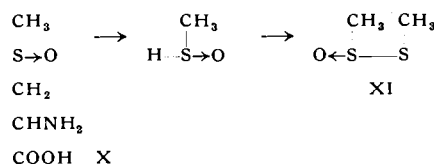
Nicht geklärt wurde bisher die Frage, ob die antimikrobiell wirksamen Substanzen in der Zwiebel bereits vorhanden sind oder erst im Laufe der Aufarbeitung gebildet werden. *Matikkala* und *Virtanen* haben keine antibakterielle Aktivität in einer Zwiebel gefunden, die zum Inaktivieren der Enzyme bei etwa 100 °C in einem geschlossenen Gefäß erhitzt worden war und danach zerrieben wurde. Zerreibt man dagegen die unbehandelte Zwiebel, so erhält man prompt eine hohe Aktivität. Als Testorganismen dienten *Bac. subtilis* und *E. coli*. Es ist also wahrscheinlich, daß die von früheren Forschern gefundene, hohe antibiotische Aktivität der flüchtigen und vermutlich auch der nichtflüchtigen Fraktionen der Zwiebel erst beim Zerreiben durch enzymatische und nachfolgende chemische Reaktionen entstanden ist.

Schon zu Beginn der 1950er Jahre wurde die Bildung von Brenztraubensäure beim Zerreiben der Zwiebel (*Allium cepa*) in unserem Laboratorium untersucht und dabei das Vorhandensein einer schwefelhaltigen Aminosäure festgestellt, aus der enzymatisch äquimolare Mengen Brenz-

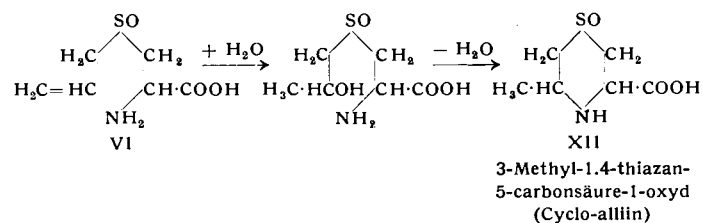
traubensäure und Ammoniak freigesetzt werden<sup>28)</sup>. Diese Reaktionsprodukte entsprechen denen, die bei der oben geschilderten enzymatischen Spaltung des Alliins entstehen. Spätere papierchromatographische Bestimmungen der Aminosäuren von *Allium cepa* in unserem Laboratorium zeigten jedoch, daß Alliin und die schwefelhaltige Aminosäure der Zwiebel nicht identisch sind. Diese konnte vielmehr inzwischen als Dihydro-alliin (VII) identifiziert werden, aus dem beim Zerreiben das antimikrobiell wirksame Di-n-propyl-thiosulfinat (VIII) enzymatisch analog der Bildung von Allicin aus Alliin entsteht. Falls die Beobachtung *Kohmans*<sup>27)</sup> zutrifft, daß Thio-propionaldehyd (IX) das tränenerzeugende Prinzip der zerriebenen Zwiebel ist, lassen sich die Reaktionen beim Zerreiben der Zwiebel folgendermaßen formulieren (die Bildung von Brenztraubensäure und  $\text{NH}_3$  fortgelassen):



Außer Dihydro-alliin enthält die Zwiebel noch bedeutend größere Mengen von S-Methyl-cystein-sulfoxyd (X), das vor einigen Jahren von *Synge* und *Wood*<sup>29)</sup> auch aus Kohl isoliert wurde. In zerriebenen Zwiebeln wird dieses enzymatisch gespalten, wobei neben Brenztraubensäure und Ammoniak Dimethyl-thiosulfinat (XI) entsteht, das ebenfalls antimikrobiell wirksam ist.



Aus Zwiebeln haben *Matikkala* und *Virtanen*<sup>30)</sup> auch eine neuartige, schwefelhaltige Iminosäure isoliert, der wir vorläufig die Konstitutionsformel (XII) zuerteilen. Dabei ist die 3-Stellung der Methyl-Gruppe noch nicht sichergestellt, Stellung 2 wäre ebenfalls möglich. Falls jedoch, wie wir annehmen, die Methyl-Gruppe Stellung 3 einnimmt, so ist eine Biosynthese der Substanz aus Alliin (VI) denkbar. Wir bezeichnen die neue Iminosäure daher und der Kürze halber als Cyclo-alliin.



Cyclo-alliin ist in der Zwiebel in beträchtlicher Menge enthalten. Aus 1 kg einer in Finnland angebauten Zwiebelsorte isolierten wir 1,5 g kristallines Cycloalliin-hydrochlorid, aus einer ungarischen Zwiebelsorte 3,2 g/kg. Dagegen ließ sich die Substanz in einer aus Ägypten eingeführten Zwiebelprobe nur in minimaler Menge nachweisen. Dies veranschaulicht die starken Variationen in der che-

<sup>22)</sup> *H. v. Euler* u. *G. Lindeman*, Ark. Kemi 1, 8797 [1949].

<sup>23)</sup> *J. C. Walker*, *C. C. Lindegren* u. *F. M. Bachmann*, J. agric. Res. 30, 175 [1925]; *W. C. Hatfield*, *J. S. Walker* u. *J. H. Owen*, ebenda 77, 115 [1948].

<sup>24)</sup> *I. F. Huddleson*, *J. Dufrain*, *K. C. Barrons* u. *M. Giefel*, J. Amer. veter. med. Assoc. 103, 394 [1944].

<sup>25)</sup> *R. L. Ingersoll*, *R. E. Vollrath*, *B. Scott* u. *C. C. Lindegren*, Food Res. 3, 389 [1938].

<sup>26)</sup> *K. C. Gupta* u. *R. Viswanathan*, Antibiotics Chemotherapy 5, 18 [1955].

<sup>27)</sup> *E. F. Kohman*, Science [New York] 106, 625 [1947].

<sup>28)</sup> *P. Vilkkilä*, Suomen Kemistilehti 27 B, 21 [1954].

<sup>29)</sup> *R. L. M. Synge* u. *J. C. Wood*, Biochem. J. 60, 15 [1955].

<sup>30)</sup> *A. I. Virtanen* u. *E. J. Matikkala*, Suomen Kemistilehti 29 B, 134 [1956], 31 B, 191 [1958]; *E. J. Matikkala* u. *A. I. Virtanen*, ebenda 30 B, 219 [1957].

mischen Zusammensetzung der Zwiebel. Ob der Unterschied durch die klimatischen Verhältnisse oder die Verschiedenheit der Zwiebeln bedingt wird, ist unbekannt.

Cyclo-alliin, das auch im Knoblauch und überhaupt in allen von uns untersuchten *Allium*-Arten sowohl in den grünen Teilen als auch in den Zwiebeln vorkommt, ist eine relativ beständige Substanz. Es oxydiert Cystein zu Cystin. Bei starker Säurehydrolyse disproportioniert es unter Bildung des entsprechenden cyclischen Thio-äthers<sup>31)</sup>, von Cysteinsäure und einer anderen noch nicht mit Sicherheit charakterisierten Sulfonsäure.

Cyclo-alliin hat keine antibiotischen Eigenschaften und über seine Wirkung im menschlichen Organismus sind noch keine Kenntnisse vorhanden. Man darf aber nicht vergessen, daß Knoblauch und Zwiebel nicht nur gegen Infektionskrankheiten, sondern auch gegen viele andere Leiden seit alters her Anwendung gefunden haben. Deshalb ist es wichtig, neben den antibiotischen Substanzen auch die Wirkungen anderer, für *Allium*-Arten spezifischer Stoffe kennen zu lernen, ehe man den Wert dieser Vegetabilien als Heil- und Nährpflanzen richtig beurteilen kann.

In den harten Außenschalen der Zwiebel sind Protocatechusäure, Catechin<sup>32)</sup> und Quercetin<sup>33)</sup> gefunden worden, die antimikrobiell wirksam sind.

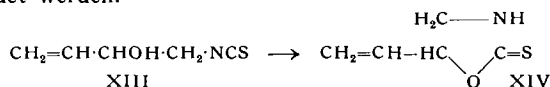
Man weiß schon lange, daß sich in Kreuzblütlern, zu denen sowohl Futter- als auch Nährpflanzen gehören, Isothiocyanate glykosid-artig an Zucker gebunden vorfinden. Diese Glykoside werden unter der Einwirkung von Enzymen, die in denselben Pflanzen vorkommen, gespalten, wobei die Senföle in Freiheit gesetzt werden. Senföle haben eine starke antimikrobielle Wirkung besonders gegenüber aeroben Mikroorganismen. Äthyl- und Allylsenföl verhindern das Wachstum gewöhnlicher Schimmelarten bereits bei einer Verdünnung von 1:1000000 vollständig, teilweise sind antibiotische Aktivitäten sogar noch bei einer Verdünnung von 1:6000000 gefunden worden (Winter<sup>34)</sup>).

In den 20er Jahren benutzte man daher in Finnland Allylsenföl zur Verhinderung des Schimmels von Silofutter und später Äthylsenföl zur Konservierung von Obstsaften und Obstmusen. 10 mg Äthylsenföl/Obstsaft und 25 mg/kg Obstmus garantierten gute Haltbarkeit. Das Senföl zersetzt sich in den Konserven im Verlauf einiger Monate, wobei auch sein Geruch verschwindet. Senföle wurden auch in der Medizin zur Behandlung schwer heilender, durch Pilze erregter Hautkrankheiten verwendet.

Durch ihre leichte Spaltbarkeit sind Senfölglykoside für die Widerstandsfähigkeit von Kreuzblütlern und anderen Pflanzen gegenüber Mikroorganismen offenbar von großer Bedeutung. Man muß aber annehmen, daß sie als kräftige Antibiotica und die Schleimhaut reizende Substanzen auch auf Mensch und Tier einen Einfluß haben. Nach Winter<sup>34)</sup> bewirkt die Verabreichung von Kressen (*Tropaeolum maius*, *Lepidium sativum*) in Mengen von nur 20 g das Auftreten einer starken antibiotischen Aktivität im Urin, die mehrere Stunden anhält.

Neben antimikrobiellen Wirkungen sind für einige Nähr- und Futterpflanzen auch schädigende Wirkungen festgestellt worden. So sind z. B. in Pflanzen der Gattung *Brassica* Senfölglykoside enthalten, aus denen Thiooxazolidone entstehen, welche die Jod-Aufnahme der Schilddrüse hemmen und damit Kropfbildung verursachen

können. Nach Kjaer und Gmelin<sup>35)</sup>, Greer<sup>36)</sup> sowie Schultz und Wagner<sup>37)</sup> können in 5-Stellung substituierte 2-Thiooxazolidone (z. B. XIV) sekundär aus enzymatisch freigesetzten Alkyl-2-hydroxy-isothiocyanaten (z. B. XIII) gebildet werden.



Hopkins<sup>38)</sup> isolierte schon 1938 aus den Samen des Kreuzblütlers *Corringia orientalis* 5,5-Dimethyl-2-thiooxazolidon, das antithyreodische Eigenschaften besitzt. Das allgemeine Vorkommen derartiger Substanzen in *Brassica*-Arten wurde entdeckt, als vor einigen Jahren Astwood, Greer und Ettlinger<sup>39)</sup> aus den Samen solcher Pflanzen und aus der Wurzel der Kohlrübe beträchtliche Mengen von 1-5-Vinyl-2-thiooxazolidon (XIV) isolierten und zeigten, daß die antithyreodische Wirkung dieser Substanz für den Menschen ebenso stark ist wie die von Thiouracil, das in großem Umfang zur Therapie der Hyperthyreose angewendet wird. In Rattenversuchen ist schon früher gezeigt worden, daß auch Kohl eine kropfentwickelnde Wirkung hat. Jüngst berichteten Clements und Wishart<sup>40)</sup> die Zunahme von Kropf bei Schulkindern in einigen Gegenden Tasmaniens, in denen Markstammkohl größere Verwendung zur Fütterung von Kühen gefunden hatte, wodurch die Milch kropfbildende Eigenschaften bekam. Der Gebrauch von jod-haltigem Salz schien die Kropfbildung nicht zu verhüten. In unserem Laboratorium haben Kreula und Kiesvaara<sup>41)</sup> eine Methode entwickelt, mit der man Vinyl-thiooxazolidon in grünen Pflanzen in einer Konzentration von 1 γ/g Frischgewicht bestimmen kann. Unter Anwendung dieses Verfahrens wurden u. a. im Kohlkopf, Grünraps und Markstammkohl bis zu 40 γ Vinyl-thiooxazolidon/g gefunden. Das meiste enthält der Stengel in der Mitte des Kohlkopfes. Nach unseren Bestimmungen besitzt Vinyl-thiooxazolidon auch eine antifungale Aktivität, die jedoch sehr viel schwächer ist als z. B. die der Senföle.

Angeichts der allgemeinen Verbreitung von Vinyl-thiooxazolidon in *Brassica*-Pflanzen ergibt sich die vom Standpunkt der Ernährung aus wichtige Frage, ob die Substanz vom Futter in die Kuhmilch übergeht. Zur Klärung dieser Frage haben wir<sup>42)</sup> einen Fütterungsversuch an einer Kuh vorgenommen, deren Tagesproduktion etwas über 8 l Milch betrug. An die Kuh wurden 0,5 kg feinzermahlene, mit Wasser angefeuchtete Rapssamen verfüttert, die nach der Analyse 4,5 g Vinyl-thiooxazolidon enthielten. Die Milchproben wurden vor der Fütterung und danach 6 Tage lang alle 12 Stunden entnommen. In keiner Milchprobe ließ sich auch nur eine Spur Vinyl-thiooxazolidon, das ein starkes Absorptionsmaximum bei 240 mμ aufweist, papierchromatographisch auffinden. Dagegen trat in der Milch 12 h nach der Fütterung eine Substanz auf, die ein starkes Absorptionsmaximum bei 255 mμ besitzt, von der aber weder bekannt ist, ob sie aus Vinyl-thiooxazolidon entstanden ist oder im Rapssamen in sehr kleiner Menge bereits vorhanden war, noch ob sie eine antithyreodische Wirkung besitzt. Dem Panseninhalt zugesetzte Vinyl-thiooxazolidon verschwindet nach unseren in vitro-Experimenten sehr schnell, vermutlich durch Reduktion der Doppelbindung und Aufspaltung des Oxazolidin-Ringes.

<sup>31)</sup> B. Bramesfeld u. A. I. Virtanen oxydierten diesen Thio-Äther, der aus dem mit 6 n Salzsäure hydrolysierten Zwiebelextrakt von Virtanen u. Matikkala isoliert worden war, zum entspr. Sulfoxyd. Etwas später fanden Matikkala u. Virtanen dieses Sulfoxyd im nicht hydrolysierten Zwiebelextrakt.

<sup>32)</sup> F. A. Skinner in Paech-Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer, Berlin 1955, 3. Band, Teil 3, S. 655.

<sup>33)</sup> S. Kuroda, Chem. Abstr. 48, 12148 [1954].

<sup>34)</sup> A. G. Winter, Hippokratès 28, 695 [1957].

<sup>35)</sup> A. Kjaer, R. Gmelin u. R. B. Jensen, Acta chem. scand. 10, 432 [1956]; A. Kjaer u. R. Gmelin, ebenda 11, 906 [1957].

<sup>36)</sup> M. A. Greer, J. Amer. chem. Soc. 78, 1260 [1956].

<sup>37)</sup> O.-E. Schultz u. W. Wagner, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 281/61, 597 [1956].

<sup>38)</sup> C. Y. Hopkins, Canad. J. Res., Sect. B 16, 341 [1938].

<sup>39)</sup> E. B. Astwood, M. A. Greer u. M. G. Ettlinger, J. biol. Chemistry 181, 121 [1949].

<sup>40)</sup> F. W. Clements u. J. W. Wishart: Metabolism Clinical and Experimental 5, 623 [1956].

<sup>41)</sup> M. Kreula u. M. Kiesvaara, Acta chem. scand., im Druck.

<sup>42)</sup> A. I. Virtanen, M. Kreula u. M. Kiesvaara, ebenda 12, 580 [1958].



Es wurde hier ein ziemlich heterogenes Material über antimikrobiell wirksame Substanzen zusammengetragen, die während der letzten Jahre in Kulturpflanzen gefunden wurden und die für die Pflanzen wahrscheinlich eine große Bedeutung bei der Verhütung von Pilz-Infektionen und möglicherweise auch von Insektenbefall haben. Die Forschung befindet sich auf diesem Gebiet erst im Beginn. Die Isolierung und chemische Charakterisierung antimikrobiell wirksamer Substanzen ist daher im Augenblick besonders wichtig, weil die Kenntnis der Stoffe die Voraussetzung für ihre quantitative Bestimmung und für das Verstehen ihrer Funktionen ist. Eine Zusammenarbeit von Chemikern und Genetikern ist notwendig, um festzustellen, ob sich mit Hilfe solcher Stoffe die verschiedenartige Resistenz der

Pflanzen erklären läßt. Eine weitere wichtige Frage betrifft den möglichen Einfluß solcher Substanzen auf die Ernährung von Mensch und Haustieren. Der auf die Erfahrung von Jahrtausenden gegründeten Vorstellung von der vorteilhaften Wirkung einiger Nähr- und Gewürzpflanzen steht die Entdeckung von Stoffen gegenüber, die schädliche Wirkungen haben können. Auch hier besteht die nächste Aufgabe in der Isolierung und Charakterisierung der aktiven Prinzipien. Je besser wir die chemische Zusammensetzung der Pflanzen kennen lernen und dadurch mit reinen Stoffen ihren Einfluß auf den menschlichen und tierischen Organismus studieren können, umso größer werden die Möglichkeiten, den Wert der Pflanzen als Bestandteile unserer Nahrung zu beurteilen. Eingegangen am 4. August 1958 [A 896]

## Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation

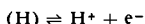
Von Prof. Dr. TH. BÜCHER und Dr. M. KLINGENBERG

Institut für Physiologische Chemie der Universität Marburg/L. \*)

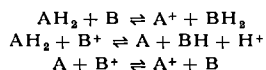
(Otto Warburg zum 75. Geburtstag gewidmet)

Die Wechselbeziehungen innerhalb des Netzwerks von Redox-Reaktionen, das sich über einen großen Teil der metabolisch wesentlichen Funktionen lebender Zellen erstreckt, werden erörtert. Anschließend an die Darlegung grundsätzlicher Gegebenheiten bei der Zerlegung der Brennstoffe werden einige Gruppen von Redox-Systemen in verschiedenen Räumen der Zellen und Gewebe in ihren Beziehungen zur Biosynthese, zur Bioenergetik und zur Zellatmung behandelt. Neuere Ergebnisse aus dem Arbeitskreis der Verfasser stehen dabei im Vordergrund. Die Beispiele zeigen, wie weitgehend die Entwicklung der Problematik der dynamischen Biochemie an den Fortschritt der Cytologie gebunden ist.

Wenn der Biochemiker von „Wasserstoff“ spricht, meint er das reduzierende Agens, d. h. Wasserstoff-Ionen oder Elektronen,



das in lebenden Zellen und Geweben in einer Mannigfaltigkeit von Redox-Systemen den Partner wechselt:



Es geht als eines der wesentlichen Basis-Substrate der lebendigen Organisation in verschiedenartige biosynthetische Reaktionen ein und treibt vor allem die Bioenergetik an, indem es in einem Netzwerk von Redox-Systemen der Vereinigung mit Sauerstoff entgegenstrebt.

So klar sich diese grundsätzlichen Gegebenheiten heute vor dem geistigen Auge des Zellphysiologen abzeichnen, so problematisch sind für ihn noch die verwickelten Bahnen, die der Wasserstoff in den Redox-Reaktionen durchläuft.

\*) Ausgearbeitet auf der Grundlage des Konzepts zu einem Vortrag im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, Januar 1957. — Mit Unterstützung der Rockefeller Foundation, des Schwerpunktprogramms „experimentelle Zellforschung“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des Fonds der Chemie sowie großzügiger ungebundener Zuwendungen der Firmen C. H. Boehringer & Sohn, Ingelheim am Rhein, C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof und der deutschen Laevosan-Gesellschaft, Mannheim-Waldhof.

\*\*) Neuere Zusammenfassungen über die hier berührten Gebiete der Biochemie und Cytologie findet man unter Fußnoten 1-9):

1) a) H. A. Krebs u. H. L. Kornberg, *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmacol.* 49, 212 [1957]. — b) K. Burton, ebenda 49, 275 [1957].

2) F. Lynen u. K. Decker, ebenda 49, 327 [1957].

3) B. L. Horecker in: *Neuere Ergebnisse aus Chemie u. Stoffwechsel der Kohlenhydrate*, 8. Kolloquium d. Gesellschaft für Physiol. Chemie, Mosbach/Ba. 1957, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.

4) F. Leuthard, ebenda.

5) O. Wieland, ebenda.

6) B. Chance u. G. R. Williams, *Advances in Enzymol.* 17, 65 [1956].

7) a) G. E. Pallade in: *Enzymes — Units of Biological Structures and Function*, Verlag Academic Press Inc., New York 1956. — b) A. L. Lehninger, ebenda.

8) G. H. Hogeboom, E. L. Kuff u. W. C. Schneider, *Int. Rev. Cytology* 6, 425 [1957].

9) Th. Bücher, *Advances in Enzymol.* 14, 1 [1953].

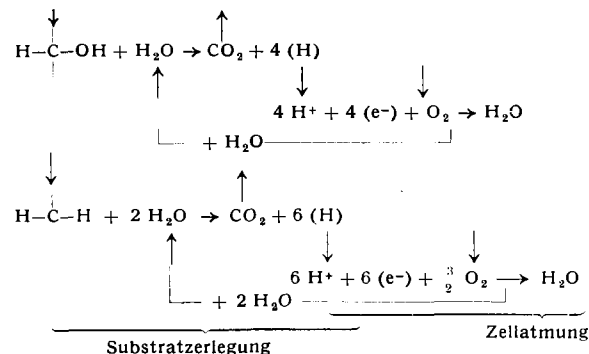
10) Th. Bücher in: *Biologie und Wirkung der Fermente*, 4. Kolloquium d. Gesellschaft für Physiol. Chemie, Mosbach/Ba. 1953, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953.

Die Zellphysiologie steht gewissermaßen vor Aufgaben, wie sie sich der allgemeinen Physiologie mit der Entdeckung des Kreislaufs eröffneten. Wir wollen einige der Fragen dieses Aspekts darlegen und zunächst die bekannten Gegebenheiten der Bilanz und der Reaktionsmechanismen betrachten\*\*).

### „Wassercyclus“

Wenn wir das Bild des Blutkreislaufs herangezogen haben, dann meinen wir weniger das Kreisgeschehen an sich als die Dynamik gerichteter Versorgung und gelenkten Abtransports. Tatsächlich aber ist mit der Zellatmung ein zwar nicht vollendeter so doch wesentlicher Kreislauf des Wasserstoffs verbunden.

Mindestens die Hälfte des für den Stoffwechsel mobilisierten Wasserstoffs, bei reiner Fettverbrennung sogar fast zwei Drittel, entstammt dem Zell-Wasser, dessen Sauerstoff — von hier aus übersieht man die Bilanz — im gebildeten Kohlendioxyd deponiert wird:



Erst im letzten Glied der Atmungskette, dem sauerstoffübertragenden Ferment von Otto Warburg, vereinigt der Wasserstoff sich mit Sauerstoff. Bis zu 25% des verfügbaren Zellwassers kann in aktiv atmenden Geweben, wie zum