

NOTIZEN

**¹H-Breitlinien-KMR-Untersuchung
des Bis(salicylaldehydato)-(pyridazin)-kobalt(II)-
Komplexes**

¹H-Wide Line NMR Investigation of Bis(salicylaldehydato)-(pyridazine)-Cobalt(II)

H. G. BIEDERMANN, P. K. BURKERT und
K. E. SCHWARZHANS

Anorganisch-chemisches Laboratorium der Technischen
Universität München

(Z. Naturforsch. 26 b, 968–969 [1971]; eingegangen am 18. Mai 1971)

Bei der Umsetzung von Bis(salicylaldehydato)-bis(aquo)-kobalt(II) mit dem *N*-Heterozyklus Pyridazin entsteht durch Verdrängung des Axialliganden H₂O der Komplex Bis(salicylaldehydato)-(pyridazin)-kobalt(II)¹, dessen ¹H-Breitlinien-KMR-Spektrum in Abhängigkeit von der Temperatur im festen Zustand aufgenommen wurde.

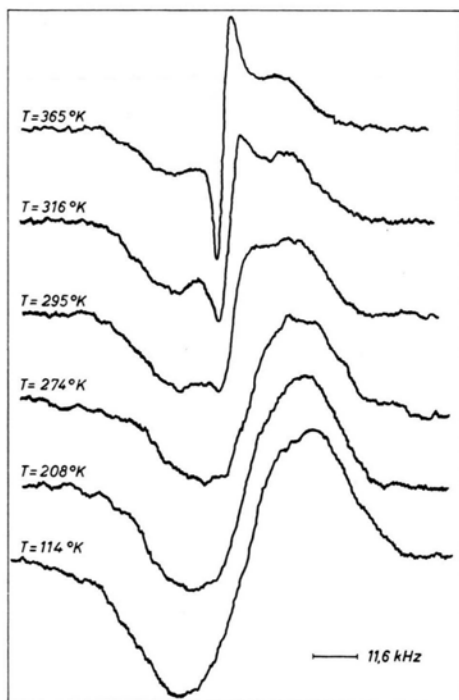


Abb. 1. ¹H-KMR-Spektrum von Co(sal)₂pyridazin in Abhängigkeit von *T* [°K].

Sonderdruckanforderungen an Dr. P. K. BURKERT, Anorganisch-chemisches Laboratorium der Technischen Universität, D-8000 München 2, Arcisstraße 21.

¹ H. G. BIEDERMANN u. K. E. SCHWARZHANS, Z. Naturforsch. 25 b, 1056 [1970].

In dem relativ hohen Temperaturbereich von *T* = 274–316 [°K] verändert sich die Linienformfunktion im ¹H-KMR-Spektrum beträchtlich (s. Abb., Tab.)

<i>T</i>	Schmale Komponente		Breite Komponente	
	¹ H-Halbwertsbreiten	[G]	¹ H-Halbwertsbreiten	[G]
[°K]	[kHz]	[G]	[kHz]	[G]
365	3,4	0,8	26,2	6,2
345	4,3	1,0	27,4	6,4
316	5,8	1,4	28,5	6,7
295	9,9	2,3	29,3	6,9
274	(16,9)	(4,0)	29,3	6,9
243	—	—	29,3	6,9
208	—	—	29,3	6,9
157	—	—	30,8	7,2
114	—	—	33,1	7,7
93	—	—	34,3	8,0

Tab. 1. ¹H-Halbwertsbreiten des Co(sal)₂pyridazin. * sal = salicylaldehydato.

Diskussion

Man erkennt aus der Tabelle bzw. Abbildung, daß sich aus der breiten ¹H-KMR-Linie, wie sie bei tiefen Temperaturen zu erwarten ist, eine sehr schmale Komponente entwickelt, deren Halbwertsbreite im angegebenen Temperaturbereich bis auf 0,8 [G] sinkt. Die breite Komponente des Signals bleibt von dieser Linienverschmälerung, abgesehen von dem normalen Temperaturverlauf und dem Gebiet von *T* = 208–295 [°K], in dem beide Komponenten offensichtlich ineinander übergehen, unbeeinflusst.

Beim Entstehen der schmalen Komponente des ¹H-KMR-Dispersionssignals handelt es sich um das Auftreten eines Rotationsfreiheitsgrades. Im angegebenen Temperaturbereich reicht die Energie der Wärmebewegung des Gitters (*kT*) aus, um die Höhe der Potentialmulden, in denen Torsionsschwingungen stattfinden, zu überwinden. Offensichtlich beginnt die Molekülgruppe des *N*-Heterozyklus Pyridazin zu rotieren. Das Verschmelzen der zwei Komponenten der Linien tritt ein, wenn die Reorientierungs- und Rotationsfrequenz ν_c sich der Linienbreite $\Delta\nu$ des „starr“ Gitters annähert². Diese Abschätzung liefert für den Fall des Pyridazin-Rings eine Rotationsfrequenz in der Größenordnung $\nu_c(295 \text{ °K}) \cong \Delta\nu \cong 10^5 \text{ Hz}$.

Eine direkte Bestimmung der entsprechenden Aktivierungsenergie aus der Änderung der Linienbreite $\Delta\nu$ bzw. des 2. Moments ($\Delta\nu$)² ist wegen der Aufspaltung in zwei Komponenten nicht möglich³. Die Rotations-

² E. R. ANDREW u. P. S. ALLEN, J. Chim. physique 63, 85 [1966].

³ O. J. ZOGAL u. B. STALINSKI, Proc. XIV. Coll. A.M.P.E. R.E., S. 432, Ljubljana 1966, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1967.

Behinderung bei tieferen Temperaturen zeigt das Bestehen einer guten koordinativen Bindung des Stickstoffatoms des Pyridazin-Rings, welches in Orthostellung zum komplexierenden Stickstoff steht, mit der Aldehydfunktion des Salicylaldehydliganden an.

Experimenteller Teil

Die ^1H -KMR-Spektren wurden mit einem Varian-Breitlinien-KMR-Gerät VF 16 aufgenommen, wobei die

variable Frequenzeinheit V-4210 A durch eine Scho-mandl-Frequenzdekade ND 100 M stabilisiert war. Die Eichung erfolgte durch einen AEG-Kernresonanz-Magnetfeldmesser.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sei für die Unterstützung dieser Arbeit gedankt.

Die Wirkung von Tetraalkylammoniumionen auf die polarographische Reduktion von Diazoaminobenzolen (Triazenen)

The Influence of Tetraalkylammonium Ions on the Polarographic Reduction of Diazoaminobenzenes (Triazenes)

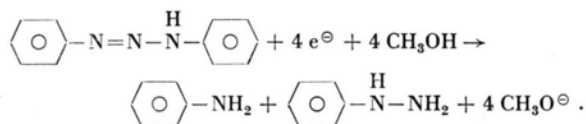
L. HOLLECK und G. KAZEMIFARD

Chemisches Institut der Hochschule, Bamberg/BRD

(Z. Naturforsch. 26 b, 969–970 [1971]; eingegangen am 5. Februar 1971)

Tetraalkylammonium-Kationen (TAA^\oplus), die verschiedentlich einen negativierenden Einfluß auf die polarographischen Halbstufenpotentiale ($E_{1/2}$) organischer Reduktionsprozesse ausüben^{1–3}, zeigen bei der Reduktion von Diazoaminobenzolen gerade den entgegengesetzten Effekt.

Diazoaminobenzole werden an der Tropfelektrode unter Aufnahme von 4 Elektronen und 4 Protonen zu Anilin und Phenylhydrazin bzw. *p*-substituiertem Anilin und Phenylhydrazin reduziert. Die Bruttoreaktion ist wie folgt zu formulieren⁴:



Wird nun das Diazoaminobenzol, z. B. in methanolischer Lösung, einerseits in Gegenwart von TAA^\oplus und andererseits von Li^\oplus als Leitsalzkatation reduziert, so liegen die $E_{1/2}$ bei Gegenwart von TAA^\oplus — alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur — um den beachtlichen Betrag von 180 mV positiver.

Diese Positivierung zeigt sich auch in gleichem Ausmaß bei fast allen untersuchten substituierten Triazenen und verringert sich nur bei den Verbindungen mit den stärksten elektronensaugenden Substituenten, wie z. B. *p*- COOC_2H_5 - oder *p*- CN -Diazoaminobenzol, bis nahezu zum Zusammenfallen der Halbstufenpotentiale. Abb. 1 veranschaulicht dies.

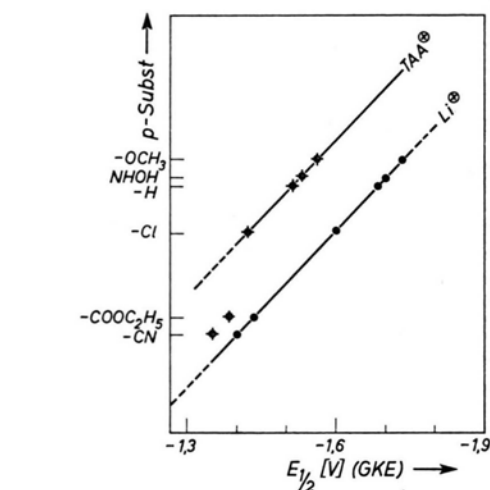


Abb. 1. Halbstufenpotentiale der Diazoaminobenzole in Methanol ($5 \cdot 10^{-4}$ M Depolarisator, 0,1 M LiCl bzw. 0,1 M $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NJ}$).

Die Halbstufenpotentiale, bezogen auf die gesättigte Kalomelektrode (GKE), sind für die untersuchten *p*-substituierten Verbindungen für das eine Leitsalzkatation auf einer Geraden aufgereiht und für das andere Leitsalzkatation auf gleichem Niveau eingezeichnet. Es ergibt sich dabei eine parallel liegende Gerade im Abstand von 180 mV; nur bei den letzten, positivsten liegenden Reduktionspotentialen verringert sich der Abstand auf ca. 50 mV.

Dieser Gang läßt sich mit dem Adsorptionsverhalten der Leitsalzkatationen in unmittelbare Beziehung bringen. Aus den Wechselstrompolarogrammen der Abb. 2 ist zu ersehen, daß die TAA^\oplus erst ab etwa $-1,3$ V eine merkliche Verminderung der Doppelschichtkapazität infolge ihrer Adsorption bewirken. Eine positivierende Wirkung der TAA^\oplus tritt nur im Bereich ihrer Adsorption an der Hg-Tropfelektrode auf. Außerhalb dieses Adsorptionsbereichs unterscheiden sich die $E_{1/2}$ praktisch nicht.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. L. HOLLECK, Chem. Institut d. Phil.-Theol. Hochschule Bamberg, D-8600 Bamberg, Am Kranen 12.

¹ L. HOLLECK u. D. BECHER, J. electroanalyt. Chem. 4, 321 [1962].

² M. E. PEOVER u. J. D. DAVIES, J. electroanalyt. Chem. 6, 44 [1963].

³ T. FUJINAGA, K. IZUTSU u. T. NOMURA, J. electroanalyt. Chem. 29, 203 [1971].

⁴ L. HOLLECK u. G. KAZEMIFARD, noch unveröffentlicht.

Die Begrenzung des Kationeneffektes im Negativen, wo keine Desorption der TAA[⊙] für die Annäherung der Potentiale verantwortlich gemacht werden kann, ist vom Li[⊙]-Verhalten her zu verstehen. Bei 3.3-Dimethyl-

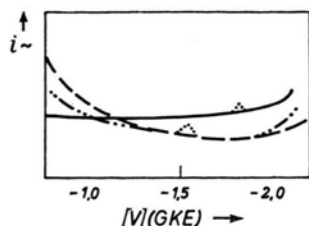


Abb. 2. Wechselstropmpolarogramme von: ——— 0,1 M LiCl, ——— mit $5 \cdot 10^{-4}$ M Diazoaminobenzol, - - - 0,1 M $(C_2H_5)_4NJ$, - · - · mit $5 \cdot 10^{-4}$ M Diazoaminobenzol, - · - · - 0,1 M LiCl mit 0,005 M $(C_2H_5)_4NJ$.

The Structure of Dehydrodecodine

R. B. HÖRHAMMER, A. E. SCHWARTING,
and J. M. EDWARDS

School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs
(Z. Naturforsch. 26 b, 970—971 [1971]; received May 10, revised
June 26, 1971)

In recent years several novel quinolizidine alkaloids have been isolated from plants of the Lythraceae family¹. Dehydrodecodine (1) is a new alkaloid isolated from *Heimia salicifolia* Link & Otto. We have obtained data which show that dehydrodecodine has the structure of decodine² with a double bond in the lactonic side chain.

Materials and Methods

Twenty six pounds of *Heimia salicifolia* herb were defatted with petroleum ether (bp 30–60°), dried, ground and extracted with absolute methanol in a steam-heated Lloyd extractor, until a test for alkaloids with modified Dragendorff's reagent was negative. The methanolic extract was concentrated to an oily liquid, acidified with 10% HCl to pH 2–3 and filtered with the aid of Celite. The filtrate was further defatted in a separatory funnel with diethyl ether. After adjusting the pH to 8.5 with 10% NaOH solution, the aqueous phase was continuously extracted in a liquid-liquid extractor with chloroform. After evaporating the chloroform, the residue was dissolved in a 1:1 mixture of methanol and chloroform. The precipitate from this solution was collected and chromatographed over a basic aluminum oxide column (Woelm activity grade 3) with benzene and then with increasing proportions of methanol in benzene. Dehydrodecodine was isolated from

phenyltriazen, das mit TAA[⊙] ein $E_{1/2}$ von $-1,89$ V aufweist, würde sich bei Li[⊙] bei einer Differenz von 180 mV ein $E_{1/2}$ ergeben, das bereits im Bereich der Li-Abscheidung zu liegen käme. Der experimentell ermittelte Wert beträgt bei Li-Leitsalz aber $-1,94$ V und nähert sich damit jenem bei Vorliegen von TAA-Salzen. Im Bereich der Li-Abscheidung liegen zweifellos infolge Adsorption der Li[⊙] ähnliche Verhältnisse in der elektrochemischen Doppelschicht vor, wie bei der TAA[⊙]-Adsorption, insbesondere kann diese Angleichung auf vergleichbare Potentialverteilungen in der inneren Helmholtz-Schicht mit sich angleichenden kinetischen Parametern für die betreffende Elektrodenreaktion zurückgeführt werden.

Näheres über interionische Wechselwirkungen im Zuge der Reduktion bzw. über die Natur dieses Effekts, wird noch berichtet werden.

fractions containing 5–13% MeOH by fractional crystallization and thick layer chromatography (silica gel GF 254; benzene-methanol 17 : 3). For the uv and ir studies dehydrodecodine was purified by sublimation at 175° and 0.1 mm Hg.

Dehydrodecodine was methylated in the usual manner with diazomethane, and the resulting dimethylether was compared chromatographically (tlc on Al_2O_3 ; benzene-acetone 18 : 2) with 6'-O-methylnesodine^{3,4}. The methylated derivative, dimethyldehydrodecodine, was hydrogenated over 10% Pd on charcoal and the reduced product was compared with dimethyldecodine (tlc on Al_2O_3 ; benzene-acetone 18 : 2).

Results

The chromatographic behavior of methylated dehydrodecodine was identical with that of 6'-O-methylnesodine. Further chemical comparison of these two compounds was not carried out because of the difficulty of obtaining a stable crystalline sample of dimethyldehydrodecodine possessing a sharp melting point. These same difficulties were experienced with the reference compound 6'-O-methylnesodine, mp. 90–110°³. For these reasons the chemical properties (mp, mmp, chromatographic behavior, ir spectrum) of hydrogenated dimethyldehydrodecodine and those of authentic dihydro-6'-O-methylnesodine³ were compared and found to be in full agreement (dihydro-6'-O-methylnesodine = dimethyldecodine⁵).

The position of the methoxyl function of dehydrodecodine was clearly established by nmr spectroscopy. The methoxyl resonance at δ 3.82 implies that this function is at C-5''. Methoxyl groups at C-6'' and C-6' are excluded, since these would resonate at higher field (about δ 3.7) due to the shielding effect of the

Reprints request to Dr. ARTHUR E. SCHWARTING, School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs, Connecticut 06268, U.S.A.

¹ R. HEGNAUER, "Chemotaxonomie der Pflanzen", Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1966, S. 438.

² J. B. FERRIS, J. org. Chemistry 27, 2985 [1962].

³ H. G. APPEL, A. ROTHER u. A. E. SCHWARTING, Lloydia 28, 84 [1965].

⁴ J. B. FERRIS, C. B. BOYCE u. R. C. BRINER, Tetrahedron Letters [London] 1966, 3641.

⁵ J. B. FERRIS, J. org. Chemistry 28, 817 [1963].

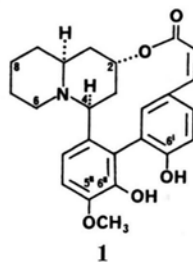
biphenyl system⁴. The resonances of the two additional *O*-methyl groups introduced by methylation were both observed at δ 3.69. These properties are quite in accord with the proposed structure **1** for dehydrodecodine.

Spectroscopic data for dehydrodecodine

The nmr spectrum of **1** determined on a Varian Associates HA-100 spectrometer, gave δ (CDCl₃) 7.05 complex aromatic absorption (5H); 6.25, broad singlet (2H; OH, exchangeable with D₂O); 5.78 and 6.80, quartet, $J = 13$ Hz (2H; ethylenic protons); 5.20, broad singlet (1H; H-2); 4.38, broad doublet (1H; H-4); 3.82, singlet (3H; O-CH₃).

The ir spectrum of **1** recorded on a Perkin Elmer 21 spectrometer showed ν_{\max} 3378 cm⁻¹ (broad, OH); 2915 cm⁻¹ (C-H); 1718 cm⁻¹ (lactone, C=O).

High resolution mass spectrometry of **1** recorded on



1

a CEC 21-110B spectrometer gave m/e 421.18803, calculated for C₂₅H₂₇NO₅ $M = 421.18892$.

The uv spectrum in MeOH recorded on a Cary 14 spectrometer showed λ_{\max} 287 nm ($\log \epsilon = 4.06$), λ_{\min} 262.5 nm.

The melting point determined on a Kofler hot stage apparatus was 181–183°; the compound decomposes above 184° if the melting point is taken *in vacuo*.

Flavonoide Inhaltsstoffe in den Früchten von *Silybum eburneum*

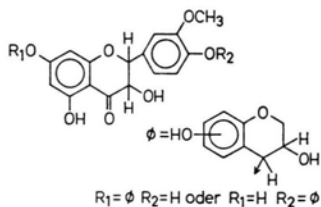
Flavonoids in the Fruits of the Genus *Silybum eburneum*

GÜNTER HALBACH und WILHELM WINKLER

Abteilung Chemische Forschung und Entwicklung und Analytisches Laboratorium der Firma Dr. Madaus & Co., Köln-Merheim

(Z. Naturforsch. 26 b, 971–972 [1971]; eingegangen am 29. März 1971, revidiert am 29. Juni 1971)

In den Früchten der Mariendistel (*Silybum marianum* Gaertn.) sind mehrere flavonoide Verbindungen enthalten, die ihrer chemischen Struktur nach neu sind und die in dieser Droge erstmalig in der Natur aufgefunden worden sind. Für zwei dieser Verbindungen, die als Silymarin und Silydianin bezeichnet worden sind, konnten die Strukturen inzwischen aufgeklärt werden^{1–3}.



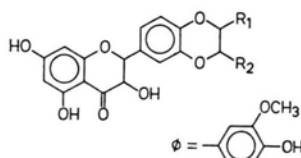
Silymarin nach WAGNER, HÖRHAMMER und MÜNSTER¹

Zur Gattung *Silybum* gehört als zweite Art *Silybum eburneum* Coss. et Durieux, deren Früchte wir auf die Gegenwart gleicher oder ähnlicher flavonoider Inhaltsstoffe wie in *Silybum marianum* genauer untersucht

Sonderdruckanforderungen an Dr. G. HALBACH, D-5000 Köln 91, Ostmerheimerstraße 198.

¹ H. WAGNER, L. HÖRHAMMER u. R. MÜNSTER, Arzneimittel-Forsch. 18, 688 [1968].

² A. PELTER u. R. HÄNSEL, Tetrahedron Letters [London] 25, 2911 [1968].



R₁=CH₂OH R₂=φ oder R₁=φ R₂=CH₂OH

Silymarin nach PELTER und HÄNSEL²



Silydianin³

haben. Die von uns überprüfte Droge stammte aus eigenem Anbau.

Die zerkleinerten Früchte wurden zunächst mit Petroläther vollständig entfettet und anschließend mit Essigester erschöpfend extrahiert. In diesem Extrakt konnten chromatographisch auf Dünnschichtplatten als Hauptbestandteile eindeutig Silymarin und Silydianin nachgewiesen werden. Der Gehalt an Trockensubstanz im Essigesterextrakt war allerdings mit 0,2% (bezogen auf die eingesetzte, nicht entfettete Droge) im Vergleich zu dem aus den Früchten von *Silybum marianum* nur sehr gering.

Die Fruchtschalen konnten von den getrockneten Früchten durch einen einfachen Dreschvorgang leicht abgelöst werden, wonach diese mittels Flotation in Wasser von den Fruchtkernen abgetrennt wurden. Eine Extraktion nach vorstehendem Arbeitsgang und die

³ D. J. ABRAHAM, S. TAKAGI, R. D. ROSENSTEIN, R. SHIONO, H. WAGNER, L. HÖRHAMMER, O. SELIGMANN u. N. R. FARNSWORTH, Tetrahedron Letters [London] 31, 2675 [1970].

dünnschichtchromatographische Untersuchung des Essigesterextraktes hat gezeigt, daß die beiden oben genannten flavonoiden Verbindungen in der Fruchtschale von *Silybum eburneum* enthalten sind.

Die quantitative Bestimmung von Silymarin und Silydianin im Trockenrückstand des Essigesterextraktes aus den intakten Früchten erfolgte ebenfalls dünnschichtchromatographisch. Es wurde darin ein Gehalt von 9,96% Silymarin und 34,13% Silydianin ermittelt. In den Früchten von *Silybum marianum* ist dagegen das Verhältnis von Silymarin (25–30%) zu Silydianin (8–10%) nahezu umgekehrt.

Neben der von LANGHAMMER⁴ vorgeschlagenen Methode eröffnet sich hiermit über eine Bestimmung der Relation von Silymarin zu Silydianin in den ausgereiften, luftgetrockneten Früchten eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung der beiden Silybum-Arten.

Experimenteller Teil

1. Extraktion von Silymarin und Silydianin

500 g ausgereifte und luftgetrocknete Früchte von *Silybum eburneum* wurden fein vermahlen und 4-mal mit je 900 ml Petroläther 1 Stde. bei Raumtemperatur durch intensives Rühren vollständig entfettet. Die abgetrennte Droge wurde anschließend getrocknet und dann 3-mal mit je 1200 ml Essigester ebenfalls bei Raumtemperatur mittels eines Intensivrührers extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels unter vermindertem Druck verbleibt ein trockener, fettfreier Rückstand von 1 g (0,2% bezogen auf die eingesetzte Droge).

2. Qualitative Untersuchung

Zur Ermittlung der qualitativen Flavonoidzusammensetzung des Rückstandes aus dem Essigesterextrakt wurde eine in wenig Methyläthylketon gelöste Probe auf eine Kieselgel G-Fertigplatte (Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen und das Chromatogramm im Fließmittelsystem Tetrachlorkohlenstoff/Acetonitril (1/1)

(v/v) entwickelt. Als Vergleichssubstanzen wurden authentische Muster von Silymarin und Silydianin verwendet. Die Detektion erfolgte durch Besprühen der Platte mit einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (1-proz. in 2 ml konz. H₂SO₄ + 98 ml Methanol) und anschließendes Erhitzen der Platte für 20 Min. auf 110°. Silymarin erscheint dabei als rotblau gefärbtes und Silydianin als ockerfarbenes 2,4-Dinitrophenylhydrazon.

3. Quantitative Untersuchung

Zur quantitativen Bestimmung von Silymarin und Silydianin mittels Dünnschichtchromatographie wurden 10 mg des trockenen Essigesterextraktes in 20 ml Methanol aufgelöst.

Vergleichssubstanzen: Silymarin (10 mg/200 ml Methanol), Silydianin (9,5 mg/50 ml Methanol). Sorptionsmittel: MN-Polyamid-DC 11 (handgestrichene Platten). Fließmittel: Chloroform/Äthylmethylketon/Methanol (70/20/7) (v/v/v). Keine Kammersättigung; Laufhöhe 16 cm; zweifache Entwicklung. Aufgetragene Mengen: Probe 10 µl = 5 µg, Silymarin 10 µl = 0,5 µg, Silydianin 10 µl = 1,9 µg. Die Auftragung erfolgte punktförmig, Ø ca. 2 mm.

Die Vermessung der Remissions-Ortskurven erfolgte bei 295 nm im Chromatogramm-Spektralphotometer Zeiss PMQ II (Verstärkung F/10/10; Spaltbreite 1,45 mm; Blende 3,5; Dämpfung I).

Aus 4 parallelen Messungen fanden wir als Mittelwert für Silymarin in der Probe einen Gehalt von 9,96%, und aus 6 parallelen Bestimmungen ergab sich für Silydianin als Mittelwert ein Gehalt von 34,13 Prozent. Die Berechnung erfolgte durch Ausschneiden und Wägen der Remissions-Ortskurven.

Unsere Mitarbeiterinnen Fräulein I. FISCHER und Fräulein F. FLEISSIG möchten wir an dieser Stelle sehr herzlich für die experimentellen Arbeiten danken.

⁴ L. LANGHAMMER, *Planta med.* [Stuttgart] **17** (3), 268 [1969].

Flavonol Glycosides in Flowers of *Trifolium pannonicum* L.

GERNOT SCHULTZ

Institut für Tierernährung, Tierärztliche Hochschule
D-3000 Hannover

(*Z. Naturforsch.* **26 b**, 972–973 [1971]; received April 23, revised May 19, 1971)

The great diversity of the flavonoid spectrum of *Trifolium* (clover) is well known¹. Besides, some species show a specific distribution of components²: the leaves of *Trifolium pannonicum* contain only flavones³ (cf. *T. repens*^{4,5}), the flowers, however, only flavonols. The

Reprints request to Prof. Dr. G. SCHULTZ, Tierärztliche Hochschule, D-3000 Hannover, Bischofsholer Damm 15.

¹ J. B. HARBORNE, *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Academic Press, London 1967.

² G. SCHULTZ, *Z. Pflanzenphysiol.* **61**, 29 [1969].

³ G. SCHULTZ, I. BÖHRER, and S. EICHLER, in preparation.

subject of this paper is the isolation of the following flavonol glycosides extracted from flowers of *T. pannonicum*: myricetin 3-galactoside (1), quercetin 3-galactoside (2), and some kaempferol 3-galactoside (3).

The glycosides were extracted from deep-frozen flowers without sepals. After enrichment³ the substances were adsorbed on polyamide and eluted again with methanol/0.1% HCl. The glycosides were obtained in pure state by means of ascending column chromatography on dryly-poured polyamide with chloroform/methanol 7:4 as a solvent. Thin-layer chromatography in accordance with⁶ suggested monosides. None of the glycosides was cleaved by β-glucosidase. The respective

⁴ A. L. LIVINGSTON and E. M. BICKOFF, *J. pharmac. Sci.* **53**, 1496 [1964].

⁵ E. M. BICKOFF, A. L. LIVINGSTON, and S. C. WITT, *Phytochemistry* **4**, 523 [1965].

⁶ K. EGGER, *Z. analyt. Chem.* **182**, 161 [1961].

⁷ L. JURD, in: *The chemistry of flavonoid compounds* (ed.: T. A. GEISSMAN). Pergamon Press, Oxford 1962.

bathochromic shifts after addition of $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; Na-acetate; Na-acetate + boric acid⁷ resp. dehydrated AlCl_3 ⁸ (cf. table) supported free hydroxyl groups at the positions 5; 7; 3' resp. 4'. The fusion point of **1** after crystallization from methanol/water was 193–197° (according to⁹: 198–201°).

After acidic hydrolysis the aglycones were identified by means of u.v. spectrum and PC data¹. Methyl

ethers of flavonols could be excluded by way of thin-layer chromatography in accordance with l. c.¹⁰. By means of thin-layer chromatography with solvent according to⁸ the sugar was identified as galactose.

The author is grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Forschungsmittel des Landes Niedersachsen. He acknowledges the experimental assistance of Mrs. E. BARTJEN.

	1	2	3
EtOH	261, (302), 368	259, 270 ₁ , (302), 362	268, (300), 351
+ $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	273, (308), 360 ₁ , 412	273, 302 ₁ , 355 ₁ , 405	276, (304), 347, 395
+ NaOAc	270, (318), 384	275, (315), 379	277, (305), 370
+ NaOAc + H_3BO_3	270, 330 ₁ , 392	267, (304), 384	277, 370
MeOH + AlCl_3 (sublimated)	272, 310 ₁ , 350 ₁ , 427	275, 305, (340), 427	274, (305), 350, 399

Table 1. Maxima of u.v. spectra. i = inflection; () = weak band.

⁸ T. J. MABRY, K. R. MARKHAM, and M. B. THOMAS, The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin 1970.

⁹ J. KAGAN, Phytochemistry **6**, 317 [1966].

¹⁰ K. EGGER and M. KEIL, Z. analyt. Chem. **210**, 201 [1965].

Abbau des 2',4,4',6'-Tetrahydroxychalkon-2'- β -D-glucosid durch Callussuspensionskulturen von *Pisum sativum* L.

Degradation of 2',4,4',6'-Tetrahydroxychalcone-2'- β -D-glucoside by Callus Suspension Cultures of *Pisum sativum* L.

B. JANISTYN^a, W. BARZ^b und R. POHL^a

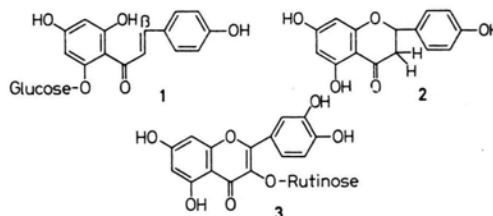
Pharmakognostisches Institut^a und Biologisches Institut II^b der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforsch. **26 b**, 973–974 [1971]; eingegangen am 2. Februar 1971)

In den letzten Jahren konnte verschiedentlich gezeigt werden, daß sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (z. B. Flavonoide, Alkaloide) in höheren Pflanzen Abbaureaktionen unterliegen^{1,2}. Die Aufklärung der katabolischen Stoffwechselwege in den Pflanzen wird vielfach durch die sehr niedrigen Konzentrationen der entstehenden Metabolite³, eine ausgeprägte Bindung exogener applizierter Verbindungen an polymere Strukturen in den differenzierten Geweben der Pflanze^{3–5} sowie durch die Anwesenheit epiphytischer Mikroorganismen³ erschwert. Für eingehendere Untersuchungen über katabolische Reaktionen auf dem Gebiet der Pflanzeninhaltsstoffe könnte der Einsatz von Gewebe-

kulturen zahlreiche Vorteile bieten⁶. So ließ sich mit dieser Methode der Nachweis erbringen, daß höhere Pflanzen aromatische Ringe spalten und bis zu CO_2 abbauen können⁷.

Wir haben in Callussuspensionskulturen von *Pisum sativum* L. einen schnell verlaufenden Abbau des 2',4,4',6'-Tetrahydroxychalkon-2'- β -D-glucosid (β -¹⁴C) (**1**) (hergestellt und gereinigt nach l. c.⁸) zu *p*-Hydroxyzimtsäure-¹⁴C und *p*-Hydroxybenzoesäure-¹⁴C beobachtet. Hinweise auf eine Spaltung von **1** zu *p*-Hydroxyzimtsäure waren bereits von PATSCHKE, HESS und GRISEBACH⁹ in *Petunia hybrida* und Rotkohlkeimlingen erhalten worden.



Für die Anzucht von Calluskulturen wurden von oberflächensterilisierten (20 Sek. in Äthanol und 40 Min. in 3,5-proz. Chlorkalklösung) und sorgfältig gewaschenen Erbsensamen nach 24-stdg. Keimung im

Sonderdruckanforderungen an Dr. WOLFGANG BARZ, Lehrstuhl f. Biochemie d. Pflanzen, D-7800 Freiburg i. Brsg., Schänzlestr. 9–11.

¹ M. H. ZENK, Ber. dtsch. bot. Ges. **80**, 573 [1967].

² H. GRISEBACH u. W. BARZ, Naturwissenschaften **56**, 538 [1969].

³ W. BARZ, CH. ADAMEK u. J. BERLIN, Phytochem. **9**, 1735 [1970].

⁴ L. J. DIETERMAN, S. H. WENDER, W. CHOREY u. J. S. KOK, Phytochem. **8**, 2321 [1969].

⁵ H. GRISEBACH u. G. BRANDNER, Experientia [Basel] **18**, 400 [1962].

⁶ H. BECKER, Mitt. dtsch. pharmaz. Ges. **39**, 273 [1969].

⁷ B. E. ELLIS u. G. H. N. TOWERS, Phytochem. **9**, 1457 [1970].

⁸ H. GRISEBACH u. L. PATSCHKE, Z. Naturforsch. **16 b**, 645 [1961].

⁹ L. PATSCHKE, D. HESS u. H. GRISEBACH, Z. Naturforsch. **19 b**, 1114 [1964].

Dunkeln die Hypokotyle in 100 ml Schraubflaschen auf einer Agarschicht (nach MURASHIGE und SKOOG¹⁰ unter Zusatz von 2.4-D (1 mg/l), Riboflavin (1 mg/l) und 15% sterilisierter Kokosnußmilch) ausgebreitet. Nach 8 Wochen wurden gut ausgebildete Primär calli zerkleinert und in eine Nährlösung¹⁰ modifiziert nach ERIKSSON¹¹ unter Zusatz von 15% Kokosnußmilch eingetragen. Die Callussuspensionen wurden nach achttägigem weiteren Wachstum bei 25 °C unter Schütteln (100 rpm) verwendet. Dünnschicht- und papierchromatographische Analysen von Alkoholextrakten zeigten, daß diese Callussuspensionen keine der charakteristischen Flavonoide^{12, 13} von *Pisum sativum* L. enthalten.

Da der Umsatz von Flavonoiden in Leguminosen nachgewiesen werden konnte¹⁴, haben wir die Callussuspensionen durch photometrische Bestimmung der Nährlösung am jeweiligen Absorptionsmaximum auf ihre Fähigkeit zum Umsatz von **1**, Naringenin (**2**) und Rutin (**3**) untersucht. Während **2** und **3** (jeweils 10⁻⁴ M Lösung) nur sehr langsam aus der Nährlösung aufgenommen wurden und auch nach mehreren Tagen noch unverändert aus dem Gewebe wieder extrahiert werden konnten, wurde bei **1** eine schnelle Reaktion beobachtet. Die Abnahme der Chalkonabsorption (λ_{\max} 360 nm) wurde von der Bildung eines neuen Absorptionsmaximums (λ_{\max} 285 nm) begleitet, das sicher zum Teil durch eine Isomerisierung von **1** zu **2** (λ_{\max} 288 nm) erklärt werden kann. Durch Vergleich der Absorptionen und der Extinktionskoeffizienten von **1** und **2** ergab sich jedoch, daß nur ein Teil von **1** diese Isomerisierung eingegangen sein konnte. Wir haben sodann in den Kulturen nach Gabe von I-(β -¹⁴C) (10⁻⁴ M) nach Abbauprodukten des Chalkons gesucht und aus der Nährlösung wie auch aus einem Alkoholauszug der Zellen durch Extraktion mit Äther und Bikarbonatlösung die freien Phenolcarbonsäuren isoliert. *p*-Hydroxyzimtsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure wurden nach Trägerzusatz durch mehrfache Papierchromatogra-

phie (Pyridin/Eisessig/Wasser = 1/2/27), Kristallisation und Sublimation (130 °C, 0,01 Torr) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt. In Tab. 1 sind die erhaltenen Gesamtradioaktivitäten und die Einbauraten in die zwei Phenolcarbonsäuren dargestellt. Entsprechend der früheren Annahme⁹ wird demnach **1** zwischen der Carbonylgruppe und dem A-Ring unter Bildung von *p*-Hydroxyzimtsäure gespalten. Die Entstehung der *p*-Hydroxybenzoesäure aus der *p*-Hydroxyzimtsäure unter Verlust einer Essigsäureeinheit¹⁵ entspricht dem bekannten Biosyntheseweg für Benzoesäuren in höheren Pflanzen¹. Die Werte in Abb. 1 und Tab. 1 zeigen, daß die Spaltung von **1** und der weitere Abbau der *p*-Hydroxyzimtsäure schnell ablaufende Reaktionen darstellen. Überraschenderweise ist die Konzentration an freier *p*-Hydroxyzimtsäure selbst nach Kurzzeitinkubation von 4 Stdn. deutlich niedriger als die der *p*-Hydroxybenzoesäure. Die im Vergleich zu der Benzoesäure bevorzugte Überführung der *p*-Hydroxyzimtsäure in polymere Strukturen (z. B. Lignin) und Ester¹⁶ ist eine mögliche Erklärung.

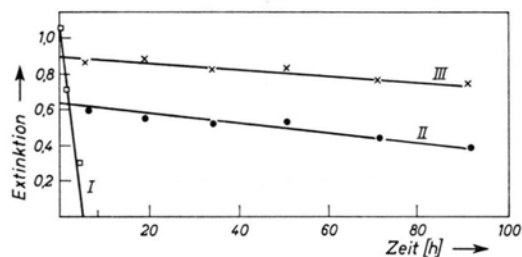


Abb. 1. Zeitabhängigkeit der Aufnahme von **1**, **2** und **3** durch Callussuspensionskulturen von *Pisum sativum* L. durch photometrische Bestimmung der Nährlösung.

Die beschriebene Spaltung von **1** ist mit der von GROCHOWSKA¹⁷ sowie von MINAMIKAWA et al.¹⁸ und CHATTERJEE¹⁹ beobachteten enzymatischen Spaltung des 2'.4.4'.6-Tetrahydroxydihydrochalkon (Phloretin) zu *p*-Hydroxy-dihydrozimtsäure und Phloroglucin mit Enzympräparationen aus Apfelblättern bzw. aus *Aspergillus niger* und *Erwinia herbicola* vergleichbar. Obwohl in den genannten Fällen Chalkone keine Substrate für die C-Acylhydrolasen darstellen, scheinen in höheren Pflanzen entsprechende Enzyme für die Spaltung von Chalkonen vorzukommen. Pflanzliche Gewebekulturen scheinen ein übersichtliches System für ihre Bearbeitung darzustellen.

Wir danken Herrn H. J. FRITSCH für die Überlassung des radioaktiven Chalkons und Herrn E. THOMA für geschickte Mithilfe. Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 46).

Chalkon-(β - ¹⁴ C) (1) angeboten [Z/Min.]	4,47 × 10 ⁶	4,4 × 10 ⁶
Inkubationsdauer [h]	4	72
<i>p</i> -Hydroxyzimtsäure [Z/Min.]	2800	850
Einbaurate in <i>p</i> -Hydroxy- zimtsäure [%]	0,06	0,02
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure [Z/Min.]	116100	9600
Einbaurate in <i>p</i> -Hydroxy- benzoesäure [%]	2,6	0,22

Tab. 1. Gesamtradioaktivität und Einbauraten in *p*-Hydroxyzimtsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure nach Gabe von I-(β -¹⁴C) an Callussuspensionskulturen von *Pisum sativum* L.

- ¹⁰ F. MURASHIGE u. F. SKOOG, *Physiol. Plant* **15**, 473 [1962].
¹¹ T. ERIKSSON, *Physiol. Plant* **18**, 976 [1965].
¹² M. FURUYA u. A. W. GALSTON, *Phytochem.* **4**, 285 [1965].
¹³ W. BOTTOMLEY, H. SMITH u. A. W. GALSTON, *Phytochem.* **5**, 117 [1966].
¹⁴ W. BARZ u. W. HÖSEL, *Phytochem.*, im Druck.
¹⁵ K. O. VOLLMER, H. J. REISNER u. H. GRISEBACH, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **21**, 221 [1965].

- ¹⁶ A. D. M. GLASS u. B. A. BOHM, *Phytochem.* **8**, 371 [1969].
¹⁷ M. J. GROCHOWSKA, *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. V*, **15**, 455 [1967].
¹⁸ T. MINAMIKAWA, N. P. JAYASANKAR, B. A. BOHM, I. E. P. TAYLOR u. G. H. N. TOWERS, *Biochem. J.* **116**, 889 [1970].
¹⁹ A. K. CHATTERJEE u. L. N. GIBBINS, *J. Bacteriol.* **100**, 594 [1969].