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

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

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.

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 _i , (302), 362	268, (300), 351
+ $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	273, (308), 360 _i , 412	273, 302 _i , 355 _i , 405	276, (304), 347, 395
+ NaOAc	270, (318), 384	275, (315), 379	277, (305), 370
+ NaOAc + H_3BO_3	270, 330 _i , 392	267, (304), 384	277, 370
MeOH + AlCl_3 (sublimated)	272, 310 _i , 350 _i , 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 exogen 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].