

den; nach Zusatz von Puffer blieb die Lösung klar. Nach Einfüllen der Corrinoidlösungen (insgesamt 0,5 bis 1,0 ml) mit einer 1,0 ml fassenden Tuberkulinspritze mit feiner Graduierung wurde der Ampulleninhalt während 10 bis 15 Min. mit dem entsprechenden Gas bei 0 °C gesättigt (Begasung mittels einer Injektionsnadel). Die Ampullen wurden noch während der Begasung zugeschmolzen. Die Erwärmung des Ampulleninhalts erfolgte im Brutschrank oder, vor allem bei kürzer dauernden Versuchen, im Wasserbad.

Durchführung von Reaktionen mit Corrinoiden in offenen Gefäßen. Man verwendete hierzu Reaktionsgefäße (Durchmesser 2,3 cm, Länge 8 cm) mit drei

Schlifföffnungen, die zur Aufnahme einer Sinterglasfritte G2 für Gaseinleitung bzw. eines Rückflußkühlers sowie zur Entnahme von Proben während der Reaktionsdauer dienten. Während der Reaktion (meist bei 70 °C) wurde die Corrinoidlösung durch die Sinterglasfritte begast (Gasdruck ca. 375 mm Wassersäule).

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Joachim-Jungius-Gesellschaft der Wissenschaften e. V., Hamburg, für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. J. KÜHNAU für Förderung und Interesse.

Zur Biosynthese des Apigenins und Chrysoeriols in der Petersilie ¹

HANS GRISEBACH UND WOLFGANG BILHUBER

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität Freiburg i. Br. *

(Z. Naturforschg. **22 b**, 746—751 [1967]; eingegangen am 29. Dezember 1966)

The aglykon of a second flavoneglycoside present in parsley plants and fruits has been identified as Chrysoeriol (5.7.4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone). According to its hydrolytic and spectral properties the glycoside is the 7-apiosyl-glucoside of chrysoeriol.

4.2'.4'.6'-Tetrahydroxychalcone-2'-glucoside- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ is incorporated into apigenin (5.7.4'-trihydroxyflavone) in parsley without randomization of the label.

When a mixture of 5.7.4'-trihydroxyflavanone- $[\text{2-}^{14}\text{C}]$ with either *trans*-3.5.7.4'-tetrahydroxyflavanone-[T] or 3.5.7.4'-tetrahydroxyflavone-[T] was fed to two month old parsley shoots, the incorporation of the trihydroxyflavanone into apigenin or chrysoeriol was higher by a factor of 67 to 400 than that of the tetrahydroxyflavanone or tetrahydroxyflavone. These results prove that the flavones are formed by dehydrogenation of flavanones and not by dehydration of dihydroflavonols.

Chalkone bzw. die mit ihnen isomeren Flavanone sind als zentrale Zwischenstufen der Flavonoid-Biosynthese durch zahlreiche Untersuchungen hinreichend gesichert ^{2,3}. Ausgehend vom Flavanon erscheinen für die Bildung der Flavone 2 Wege plausibel:

1. Eine direkte Dehydrierung oder
2. Oxydation des Flavanons zum 3-Hydroxyflavanon ⁴ und anschließende Wasserabspaltung (Abb. 1). Enzyme für beide Reaktionstypen sind hinreichend bekannt ⁵.

Chemisch gelingt die Dehydrierung von Flavanonen zu Flavonen relativ leicht, z. B. mit Selendioxid ⁶ oder Chloranil ⁷ und die Acetolyse von *trans*-

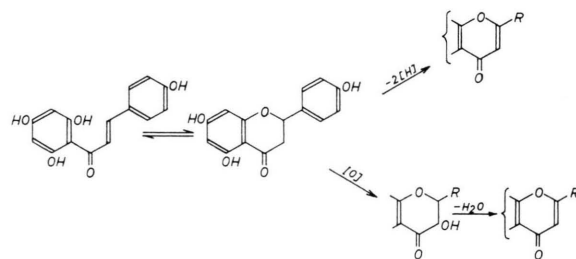


Abb. 1. Mögliche Bildungswege von Flavonen aus Flavanonen.

5.7.3'.4'-Tetramethoxyflavanon-3-*p*-toluolsulfonat zu 5.7.3'.4'-Tetramethoxyflavon ⁸ ist eine Modellreaktion für den Übergang 3-Hydroxyflavanon → Flavon.

Zur Entscheidung zwischen beiden Reaktionswegen haben wir in der vorliegenden Arbeit den Ein-

* Anschrift: Chemisches Laboratorium, 78 Freiburg i. Br., Albertstr. 21.

¹ XIV. Mitt.: Zur Biogenese der Flavonoide. XIII. Mitt.: L. PATSCHKE, W. BARZ u. H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. **21 b**, 201 [1966].

² I. c. ¹ und frühere Mitteilungen.

³ E. WONG u. E. MOUSTAFA, Tetrahedron Letters [London] **26**, 3021 [1966].

⁴ H. GRISEBACH u. S. KELLNER, Z. Naturforschg. **20 b**, 446 [1965].

⁵ M. DIXON u. E. C. WEBB, „Enzymes“ 2nd ed., Longmans, London 1965.

⁶ H. S. MAHAL, H. S. RAI u. K. VENKATARAMAN, J. chem. Soc. [London] **1935**, 866; H. S. MAHAL u. K. VENKATARAMAN, **1936**, 569.

⁷ R. T. ARNOLD u. C. J. COLLINS, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1407 [1939].

bau von 5.7.4'-Trihydroxyflavanon-[2-¹⁴C] und *trans*-3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavanon-[T] in die Flavone der Petersilie verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß Flavone durch Dehydrierung aus Flavanonen gebildet werden. Außerdem wird die Isolierung und Identifizierung eines neuen Flavonglykosids [7-(Apiosyl-glucosyl)-chrysoeriol] aus Petersilie beschrieben.

Ergebnisse

a) Isolierung und Identifizierung eines Chrysoeriolglykosids aus Petersilie

In einer früheren Arbeit⁹ über die Flavonglykoside aus Petersilie wurde neben Apiin das Vorkommen von 7-(Apiosylglucosyl)-Luteolin nachgewiesen, während das von VONGERICHTEN¹⁰ beschriebene Diosmetinglykosid (5.7.3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavonglykosid) nicht gefunden werden konnte.

Die papierchromatographische Prüfung des äthanolischen Pflanzenextraktes aus 2 Monate alten Petersilienpflanzen (*Petroselinum hortense Hoffm.*) ergab 2 Haupt- und 3 Nebenkompenten, die alle nach Besprühen mit AlCl₃ eine gelbe Färbung zeigen (Tab. 1). Die 1. Hauptkomponente ist iden-

Laufmittel:	1	2
1. Hauptkomponente (80%) *	0,56	0,57
2. Hauptkomponente (20%) *	0,46	0,46
1. Nebenkompente	0,63	0,66
2. Nebenkompente	0,40	—
3. Nebenkompente	0,36	—

Tab. 1. *R_f*-Werte der Flavonoid-glykoside und Nebenkompenten aus Petersilie. Papier Schleicher u. Schüll 2043 b. 1 = n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5). 2 = 30-proz. Essigsäure. * Prozentualer Anteil in den Pflanzen. In den Früchten betrug das Verhältnis 2:1.

tisch mit Apiin. Die 2. Hauptkomponente wurde im präparativen Maßstab aus Petersilienfrüchten isoliert und ergibt nach Hydrolyse mit 2-n. HCl/Methanol (1:1) neben Apiose und Glucose ein Aglykon, dessen UV-Spektrum demjenigen des Chrysoeriol (5.7.4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavon) gleicht¹¹. Auch die durch Zusatz von AlCl₃ erhaltene bathochrome

Verschiebung der Absorptionsbanden entspricht derjenigen des Chrysoeriol¹², während mit Borsäure keine Verschiebung eintritt, so daß das Vorliegen zweier *o*-ständiger Hydroxylgruppen im Ring B ausgeschlossen werden kann.

Zur Sicherung der Konstitution wurde ein Abbau mit 50-proz. KOH durchgeführt, wobei als Abbauprodukte Phloroglucin, Vanillinsäure und Acetovanillon durch papierchromatographischen Vergleich mit authentischen Substanzen (Tab. 2), und durch Mischschmelzpunkte und IR-Spektren identifiziert wurden.

Methode: Laufmittel:	PC 3	DC 4	DC 5
Phloroglucin	0,01	0,08	0,24
1. Spaltprodukt	0,01	0,08	0,24
Vanillinsäure	0,61	0,02	0,71
2. Spaltprodukt	0,61	0,02	0,71
Acetovanillon	0,75	0,35	0,84
3. Spaltprodukt	0,75	0,35	0,84

Tab. 2. Vergleich der *R_f*-Werte der bei der Alkalisplaltung des unbekannten Flavons aus Petersilie entstandenen Spaltprodukte mit authentischen Substanzen. PC-Papierchromatogramm, Whatman 3MM. DC = Dünnschichtchromatogramm, „Kieselgel G“ Merck. 3 = Benzol/Eisessig/Wasser (6:7:3, Oberphase). 4 = Benzol/Methanol (92:8). 5 = Benzol/Dioxan/Eisessig (80:25:4).

In Übereinstimmung mit obigen Befunden ist das Massenspektrum. Neben dem als stärksten Signal auftretenden Molekularion (*m/e* 300 = 100%) findet sich das durch Verlust von CO entstehende Fragment (*m/e* 272, 4%) und das aus diesem durch Abspaltung eines Methylradikals gebildete Fragment (*m/e* 257, 10%)^{12a}, dessen relative Intensität auf *o*-Stellung der Substituenten schließen läßt. Die beiden durch retro-Diels-Alder-Splaltung gebildeten Bruchstücke von Ring A (*m/e* 153, 21%, protoniertes Keton) und Ring B (*m/e* 148, 9%) bestätigen die Anwesenheit von 2 Hydroxylgruppen in Ring A und einer Hydroxyl- und Methoxylgruppe in Ring B. Das durch Verlust eines Methylradikals vom Fragment *m/e* 148 gebildete Bruchstück *m/e* 133 (8%) tritt ebenfalls auf.

Wie beim Apiin läßt sich auch beim Chrysoeriolglykosid die Apiose bereits durch 0,025-n. Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbad abspalten, wäh-

⁸ P. P. MEHTA u. W. B. WHALLEY, J. chem. Soc. [London] **1963**, 5327.

⁹ C. G. NORDSTRÖM, T. SWAIN u. A. J. HAMBLIN, Chem. and Ind. **1953**, 85.

¹⁰ E. VONGERICHTEN, Ber. dtsch. chem. Ges. **33**, 2334 [1900].

¹¹ L. JURD, in: The Chemistry of Flavonoid Compounds (Hrsg. T. A. GEISSMAN), Pergamon Press, Oxford 1962, S. 111.

¹² l. c. ¹¹, S. 121.

rend die Abspaltung der Glucose 1-*n*. Schwefelsäure bedarf¹³. Die Änderung der Absorptionsmaxima des Aglykons und Glykosids bei Zugabe von Na-acetat ist in Tab. 3 zusammengestellt. Da beim Glykosid mit Na-acetat die beiden kurzwelligen Banden — mit geringfügiger bathochromer Verschiebung der Bande bei 252m μ und hypsochromer Verschiebung der Bande bei 269 m μ — erhalten bleiben, während die drei kurzwelligen Banden des Chrysoerols bei Zugabe von Na-acetat in eine einzige Bande bei 275 m μ übergehen, ist wie beim Apiin sehr wahrscheinlich die 7-Stellung mit Apiosyl-glucose glykosidiert^{13b}.

Verbindung	$\lambda_{\max}$ (m μ), [log ϵ]		
	Methanol	Methanol-Na-acetat	
Chrysoeriol	243 [4,23] 269 [4,21]	249 [4,23] 345 [4,34]	275, 321*, 387
Chrysoeriol-glykosid	252 [4,17] 345 [4,22]	269 [4,15]	256, 267, 348 403*

Tab. 3. Absorptionsänderungen bei Zugabe von Na-acetat.
* Inflexion.

Die Flavonoidnatur der 3 Nebenkomponenten, die nur in den Petersilienpflanzen aber nicht in den Früchten auftraten, wurde noch nicht gesichert*.

b) Einbau des 4.2'.4'.6'-Tetrahydroxychalkon-2'-glucosid-[β -¹⁴C] in Apigenin

Die Applizierung des 4.2'.4'.6'-Tetrahydroxychalkonglucosid-[β -¹⁴C]^{13a} (Abb. 1) erfolgte während 48 Stdn. durch Schüttelinkubation¹⁴ an kleingeschnittene Petersilienblätter. Nach der Isolierung des Apiins¹³ wurde dieses mit 2-*n*. HCl/Methanol (1:1) auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert und das Apigenin durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Toluol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure (5:4:1) und über das Triacetat gereinigt¹³. Die Einbaurate in das Apigenin betrug 0,04%, die Verdünnung war 2800. Zur Lokalisierung der Radioaktivität wurde ein Abbau mit 50-proz. KOH durchgeführt, wobei als Abbaupro-

Verbindung	Spez. Aktivität [ipm/mMol]	Proz. Aktivität von Apigenintriacetat
<i>p</i> -Hydroxy-benzoesäure	7,973 · 10 ⁵	87
<i>p</i> -Hydroxy-acetophenon	8,174 · 10 ⁵	89
Phloroglucin	< als doppelter Nulleffekt	<1

Tab. 4. Aktivitätsverteilung im Apigenin nach Gabe von 4.2'.4'.6'-Tetrahydroxychalkon-2'-glucosid-[β -¹⁴C].

dukte *p*-Hydroxybenzoesäure, *p*-Hydroxyacetophenon und Phloroglucin gefaßt wurden. Die gefundene Aktivitätsverteilung ist in Tab. 4 wiedergegeben. Danach sind 87–89% der Aktivität im C-2 des Apigenins lokalisiert.

c) Vergleich des Einbaus von 5.7.4'-Trihydroxyflavanon, 3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavanon und 3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavon in Apigenin und Chrysoeriol

In zwei Parallelversuchen erhielten jeweils 70 zwei Monate alte Petersilienpflänzchen ohne Wurzeln in 50 cm³ 0,067-*m*. Phosphatpuffer (p_H 7,9): A. 3,1 μ Mol 5.7.4'-Trihydroxyflavanon-[2-¹⁴C] (5,2 μ C) und 2,6 μ Mol *trans*-3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavanon-[T]¹⁵ (Dihydrokaempferol-[T], 24,1 μ C). B. 3,1 μ Mol 5.7.4'-Trihydroxyflavanon-[2-¹⁴C] (6,3 μ C) und 2,8 μ Mol 3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavon-[T]¹⁵ (Kaempferol-[T], 19,3 μ C).

Die Aufnahme der Lösungen erfolgte während 60 Stdn. in je 10 kleinen Gläschen unter ständiger Belüftung und Dauerbelichtung. Die im Rückstand verbleibende Restaktivität wurde bestimmt und bei der Berechnung der Werte in Tab. 5 berücksichtigt. Die Ausbeuten an isoliertem Apigenin betrugen A: 13,8 mg, B: 13,1 mg und die von Chrysoeriol A: 0,85 mg, B: 1,42 mg. Die Werte der Aktivitätsbestimmungen in Tab. 5 zeigen in beiden Versuchen einen sehr starken Abfall des T/¹⁴C-Verhältnisses mit dem jeweiligen Gemisch von Flavanon-[¹⁴C]/3-Hydroxyflavanon-[T] bzw. Flavanon-[¹⁴C]/Flavonol-[T] als Vorstufen.

* Anm. b. d. Korr.: C. G. NORDSTRÖM u. P. KALO ((Suomen Kemistilehti B 38, 296 [1965]; C. A. 64, 13092 [1966]) berichteten über die Isolierung von Isorhamnetin-3.7-di-glucosid aus Petersilie.

^{12a} R. I. REED u. J. M. WILSON, J. chem. Soc. [London] 1963, 5949.

¹³ H. GRISEBACH u. U. DÖBEREINER, Z. Naturforschg. 21 b, 429 [1966].

^{13a} H. GRISEBACH u. L. PATSCHKE, Z. Naturforschg. 16 b, 645 [1961].

^{13b} R. M. HOROWITZ u. L. JURD, J. org. Chemistry 26, 2446 [1961].

¹⁴ M. H. ZENK, Z. Pflanzenphysiol. 53, 404 [1965].

¹⁵ W. BARZ u. H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. 21 b, 47 [1966].

	Verbindung	Spez. Aktivität [ipm/mMol]		Verdünnung		Einbaurrate %		T/ ¹⁴ C
		T	¹⁴ C	T	¹⁴ C	T	¹⁴ C	
A	5.7.4'-Trihydroxyflavanon-[2- ¹⁴ C]							4,59
	3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavanon-[T]**							4,43*
	Apigenin	4,86 · 10 ⁴	4,13 · 10 ⁶	4,23 · 10 ⁵	1075	0,005	1,98	0,012
	Chrysoeriol	1,57 · 10 ⁵	2,30 · 10 ⁶	1,31 · 10 ⁵	1920	0,0009	0,06	0,068
B	5.7.4'-Trihydroxyflavanon-[2- ¹⁴ C]							3,04
	3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavanon-[T]							3,05*
	Apigenin	9,35 · 10 ⁴	3,94 · 10 ⁶	1,15 · 10 ⁵	1127	0,011	1,49	0,024
	Chrysoeriol	4,65 · 10 ⁴	2,88 · 10 ⁶	3,26 · 10 ⁵	1540	0,0006	0,11	0,016

Tab. 5. Vergleich der Radioaktivität in den Flavonen der Petersilie mit Flavanon, 3-Hydroxyflavanon, oder Flavonol als Vorstufe. * Von den Pflanzen aufgenommenes T/¹⁴C-Verhältnis. ** Bei der Berechnung des Aktivitätsverhältnisses in der Ausgangsmischung ist bereits berücksichtigt, daß beim Übergang 3-Hydroxyflavanon → Flavon das T am C-2 verloren gehen muß. Am C-2 des 3-Hydroxyflavanon-[T] sind etwa 20% der Gesamtaktivität lokalisiert¹⁵.

Diskussion

Das Aglykon des neuen Flavonglykosids aus Petersilienpflanzen oder Früchten konnte eindeutig als Chrysoeriol (5.7.4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavon) identifiziert werden. Als glykosidische Komponenten wurden Glucose und Apiose identifiziert. Die Anknüpfung dieser Zucker an das Aglykon ist sehr wahrscheinlich die gleiche wie beim Apiin (7-O[β -D-Apiofuranosyl(1 → 2) β -D-glucosyl]), da bei der milden Säurehydrolyse zunächst Apiose freigesetzt wird und die bei Zusatz von Na-acetat nur schwache bathochrome Verschiebung der Absorptionsbanden für eine Anknüpfung der Zucker in 7-Stellung spricht^{13b}. Möglicherweise mag das Vorkommen von Chrysoeriol, dem 3'-Monomethyl-Derivat des Luteolins⁹, in unserem Falle an der verwendeten Petersiliensorte oder am Alter der Pflanzen liegen. NORDSTRÖM u. Mitarb.⁹ geben das Alter der untersuchten Pflanzen nicht an. Sehr wahrscheinlich hatte seinerzeit schon VONGERICHTEN¹⁰ das Chrysoeriol-glykosid in den Händen, da er die Position der Methoxylgruppe in seinem „Diosmetin“ nicht eindeutig festlegen konnte.

Beim Versuch mit 4.2'.4'.6'-Tetrahydroxychalkon-2'-glucosid-[β -¹⁴C] als Vorstufe sind erwartungsgemäß etwa 90% der Aktivität im C-2 des Apigenins lokalisiert. Möglicherweise war das zum Abbau ein-

gesetzte Produkt noch nicht völlig radioaktiv rein, so daß die geringe Verschmierung der Aktivität evtl. nur vorgetäuscht wird. Chrysoeriol wurde in diesem Versuch nicht isoliert.

Die Schüttelinkubation¹⁴ bewährte sich hier nicht so gut wie die Zufuhr der markierten Vorstufen durch die Stengel, wie die bedeutend besseren Einbauraten bei der nächsten Versuchsreihe zeigen (Tab. 5).

Der Vergleich des Einbaus von 5.7.4'-Trihydroxyflavanon mit demjenigen von 3.5.7.4'-Tetrahydroxyflavanon bzw. dem entsprechenden Flavonol (Tab. 5) zeigt eine um den Faktor 67 bis 400 höheren Einbau des Trihydroxyflavanons in die Flavone. Wie in früheren Versuchen^{15, 16} wurde das Flavonol (Kaempferol) zum Vergleich eingesetzt, da *in vitro* leicht eine Dehydrierung von Dihydrokaempferol zu Kaempferol möglich ist.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist allerdings noch die Stereochemie des 3-Hydroxyflavans zu berücksichtigen. Das Dihydrokaempferol-[T] hat *trans*-Konfiguration an C-2 und 3^{16a, *}.

Wenn eine Wasserabspaltung in der Pflanze nur bei einem – in der Natur bisher nicht gefundenem – *cis*-3-Hydroxyflavanon erfolgen könnte und *in vivo* eine Umwandlung der *trans*- in die *cis*-Form (über das Enol) nicht möglich ist, könnte damit der geringe Einbau des Dihydrokaempferol erklärt wer-

¹⁶ L. PATSCHKE, W. BARZ u. H. GRIEBACH, Z. Naturforschg. **21 b**, 45 [1966].

^{16a} W. B. WHALLEY, in: The Chemistry of Flavonoid Compounds (Hrsg. T. A. GEISSMAN), Pergamon Press, Oxford 1962, S. 352.

* Die Verbindung wurde durch Wilzbach-Markierung des Dihydrokaempferols gewonnen. Sollte bei dem Wasserstoff-Tritium-Austausch teilweise die *cis*-Verbindung entstehen, so würde diese bei der chromatographischen Reinigung¹⁵ wieder zur *trans*-Verbindung isomerisiert werden^{16b}.

^{16b} F. M. DEAN, „Naturally Occuring Oxygen Ring Compounds“, Butterworths, London 1963, S. 350.

den. Man müßte dann aber auch annehmen, daß der Einbau des Flavanons über ein *cis*-3-Hydroxyflavanon verläuft. Dies ist sehr unwahrscheinlich. Die Bildung der Flavone erfolgt also aller Wahrscheinlichkeit nach, nicht durch Dehydratisierung von 3-Hydroxyflavanonen, sondern durch Dehydrierung von Flavanonen.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Früchte

Die 2 Monate alten Petersilienpflanzen (*Petroselinum hortense* Hoffm.) stammten aus dem Botanischen Garten der Universität Freiburg i. Br.

Die Petersilienfrüchte waren in der Form eines groben Pulvers (Fructus petroselini EB 6, pulv. gross.) von der Firma Caesar und Loretz, Hilden Rhld. bezogen worden.

5.7.4'-Trihydroxyflavanon-[2-¹⁴C] (Naringenin-[2-¹⁴C])

7,1 mg 4.2'.4'.6'-Tetrahydroxychalkon-2'-glucosid-[^β-¹⁴C]^{13a} wurden mit 7 cm³ 2-n. HCl/Methanol (1:1) 1 Stde. auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert, das Hydrolysegemisch nach Entfernen des Methanols am Rotationsverdampfer mit Äther ausgeschüttelt und der Ätherextrakt über Na₂SO₄ getrocknet. Die weitere Reinigung erfolgte durch Papierchromatographie auf 2 vorgewaschenen Whatman 3MM-Bögen mit 15-proz. Essigsäure. Die Zone des Naringenins eluierte man in der Kälte mit Methanol. Die Konzentrationsbestimmung bei 288 mμ ergab eine Ausbeute von 2,8 mg (63%).

Präparative Isolierung der Flavonglykoside und der Aglyka aus Petersilienfrüchten

500 g pulverisierte Petersilienfrüchte wurden mit Petroläther (60–70 °C) im Soxhlet-Apparat solange extrahiert, bis das Extraktionsmittel annähernd farblos ablief. Danach ließ man das Pulver trocknen und extrahierte mit Äthanol, bis der Alkohol keine Färbung mehr zeigte. Die vereinigten äthanolischen Extraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Äthanol befreit, der Rückstand in kochendem Wasser suspendiert und eine Viertelstunde in siedendem Zustand gehalten.

Nach der Filtration der heißen Lösung wurde eine wäßrige Lösung von neutralem Bleiacetat solange hinzugefügt, bis sich kein weiterer Niederschlag mehr bildete. Die noch heiße Glykosidlösung wurde vom Niederschlag abfiltriert. Im Filtrat wurden unter erneutem Erwärmen mit basischem Bleiacetat die Flavonglykoside als Bleisalzkomplexe gefällt, der Niederschlag bei 5000 U/min abzentrifugiert und noch feucht in Äthanol suspendiert. Zur Zerstörung der Glykosid-Bleisalzkomplexe leitete man Schwefelwasserstoffgas ein, filtrierte vom ausgefallenen Bleisulfid ab, engte die Lösung am

Rotationsverdampfer bis auf die Hälfte des Volumens ein und stellte solange in die Kühltruhe, bis das gesamte Volumen zu einer Gallerte erstarrt war.

Nach Abzentrifugieren der Gallerte und nach Abdekantieren des Überstandes wurde Äthanol in der gleichen Menge wieder hinzugefügt, die Gallerte durch Erwärmen darin gelöst, in der Kühltruhe erneut gelieren lassen und dieser Vorgang noch zwei- bis dreimal wiederholt, bis das Glykosidgemisch zu kristallisieren begann. Umkristallisation aus heißem Äthanol und Aufarbeitung der Mutterlaugen ergaben 4,4 g eines weiß-gelben kristallinen Produkts, das unter dem Mikroskop aus feinen Nadeln bestand. Schmp. 235–236°.

Die papierchromatographische Prüfung mit dem Laufmittelsystem Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) ergab, daß das Kristallinat aus zwei Flavonoid-Komponenten bestand, die im Verhältnis von ungefähr 2:1 vorlagen. Die präparative papierchromatographische Trennung führte neben dem Apiin zu einem zweiten Glykosid, nach dessen 4-stdg. Hydrolyse mit 10-proz. Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbad die Zucker Glucose und Apiose papierchromatographisch nachgewiesen werden konnten.

200 mg eines Gemisches der Aglyka wurde an einer Polyamidsäule (Durchmesser 6,5 cm, Füllhöhe 45 cm, vorgewaschenes Ultraamidpulver BASF Nr. K228 BM2) mit dem Laufmittelsystem Benzol/Methanol/Äthylmethylketon (9:4:2)¹⁷ fraktioniert und das Eluat in Fraktionen von 15 cm³ am Fraktionssammler aufgefangen. Die Einheitlichkeit der Fraktionen wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Nach Vereinigung der Fraktionen, die das Flavan enthielten, Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser konnten ca. 25 mg des Flavons erhalten werden.

Die Fraktionierung wurde mit insgesamt 800 mg Aglykagemisch an der gleichen Säule in 200 mg-Anteilen durchgeführt.

Alkaliabbau des zweiten Flavons aus Petersilie

50 mg des Flavons wurden mit 30 cm³ 50-proz. KOH 45 Min. am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten wurde unter Eiskühlung mit 50-proz. H₂SO₄ neutralisiert, vom ausgefallenen Salz abfiltriert, 3-mal mit je 30 cm³ Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung über Na₂SO₄ getrocknet. Den Äther zog man am Rotationsverdampfer ab und löste den Rückstand in 10 cm³ Methanol. Das Gemisch der Abbauprodukte wurde auf vorgewaschenem Whatman 3MM-Papier mit Benzol/Eisessig/Wasser (6:7:3) chromatographiert (Tab. 2). Die aus dem Papier eluierten Abbauprodukte reinigte man weiterhin durch Sublimation im liegenden Rohr bei 0,05 Torr.

Alkaliabbau des Apigenins

Der Abbau des Apigenins und die Isolierung der Abbauprodukte erfolgte in der gleichen Weise wie beim Abbau von Chrysoeriol beschrieben.

¹⁷ K. EGGER u. M. KEIL, Z. analyt. Chem. **210**, 201 [1965].

Messung der Radioaktivität

Die Messung von ^{14}C und Tritium erfolgte nach der Methode von SIMON und Mitarbb.¹⁸ mit einer Antikoinzidenz-Anlage (Uni ZS, Fa. Berthold, Wildbad).

¹⁸ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959].

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Dem Fonds der Chemie und der Badischen Anilin- und Sodafabrik danken wir für Sachbeihilfen. Herrn Dr. H. ACHENBACH danken wir für die Aufnahme und Interpretation des Massenspektrums.

Isolierung von Riboflavin-Mangelmутanten von *Saccharomyces cerevisiae*

O. OLTMANNS und F. LINGENS

Biochemische Abteilung des Chemischen Institutes der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. **22 b**, 751—754 [1967]; eingegangen am 16. Dezember 1966)

Riboflavin-deficient mutants of *S. cerevisiae*, not known hitherto, were isolated using a yeast extract-peptone-dextrose medium supplemented with 10 γ riboflavin/ml. After treatment with ethylmethanesulfonate, 0,4% of the surviving cells or 2% of the isolated biochemical mutants were deficient of riboflavin.

Seven of 14 riboflavin deficient mutants were tested for temperature dependence but no such dependence was found. Two mutants accumulated a green fluorescing substance. Cross-feeding tests were not successful.

Über die Biosynthese der meisten Vitamine und deren Regulation ist nur wenig bekannt. Das mag zwei Gründe haben: Einmal wurden nicht für jedes Vitamin die entsprechenden Mangelmутanten, die gewöhnlich zur Aufklärung der Biosyntheseketten benutzt werden, in hinreichender Zahl gefunden. Zum andern gelang es bei den wenigen bisher untersuchten Vitamin-Mangelmутanten nur in einzelnen Fällen, Zwischenprodukte im Akkumulat nachzuweisen.

Eine Methode zur Erzeugung einer größeren Zahl von Riboflavin-Mangelmутanten von *Saccharomyces cerevisiae* wird in dieser Arbeit beschrieben. In der folgenden Arbeit¹ wird über erste Untersuchungen an diesen Mutanten berichtet.

Material und Methoden

Stämme. Für Mutationsversuche wurde der haploide Stamm S 288 C von *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Für Riboflavinbestimmungen (durch Trübungsmessung) wurde *Lactobacillus casei* ATCC 7469, für Nicotinsäurebestimmungen *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (Difco Manual, 9. Auflage) benutzt.

Medien. Kompletmedium: 10 g Hefeextrakt (Difco), 10 g Pepton (Difco), 20 g Dextrose, 1 l deionisiertes

Wasser. Riboflavin-Kompletmedium: Kompletmedium + 10 mg Riboflavin/Liter.

Minimalmedium [g]: 10 Dextrose, 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,875 KH_2PO_4 , 0,125 K_2HPO_4 , 0,5 $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 NaCl , 0,1 CaCl_2 , [mg]: 0,5 H_3BO_3 , 0,04 $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 KJ , 0,2 $\text{FeCl}_3 + 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 $\text{MnSO}_4 + 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 $\text{ZnSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 Ammoniummolybdat, 0,1 Biotin, 1 l deionisiertes Wasser. Spurenelemente und Biotin werden in Form einer 100-fach konzentrierten Lösung zugesetzt.

Zur Verfestigung: 21 g Agar (Difco)/l Medium. Salzlösung zum Waschen: 5 g NaCl , 0,12 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 l deionisiertes Wasser.

Die Medien werden 20 Min. bei 2 atm autoklaviert.

Isolierung von Riboflavin-Mangelmутanten

Zellen des Stammes S 288 C wurden mit Methansulfonsäureäthylester bei pH 7 wie früher beschrieben² behandelt. Sie wurden dann auf Riboflavin-Komplettagar plattiert und bei 30° bebrütet. Nach 4 Tagen wurden von jeder auf Riboflavin-Kompletmedium gewachsenen Kolonie Proben auf Minimalagar und Riboflavin-Komplettagar ausgestrichen. Mutmaßliche Mangelmутanten, die nach dreitägiger Bebrütung auf Riboflavin-Komplettagar, nicht aber auf Minimalagar wuchsen, wurden in zwei weiteren solcher Strichtests auf Konstanz ihres Nährstoffbedarfes geprüft. Alle Mangelmутanten wurden dann auf Riboflavin-Minimalagar (10 γ Riboflavin/ml) ausgestrichen und, wenn sie hierauf wuchsen, im Blättchentest² überprüft.

¹ F. LINGENS, O. OLTMANNS u. A. BACHER, Z. Naturforschg. **22 b**, 755 [1967].

² F. LINGENS u. O. OLTMANNS, Z. Naturforschg. **19 b**, 1058 [1964].