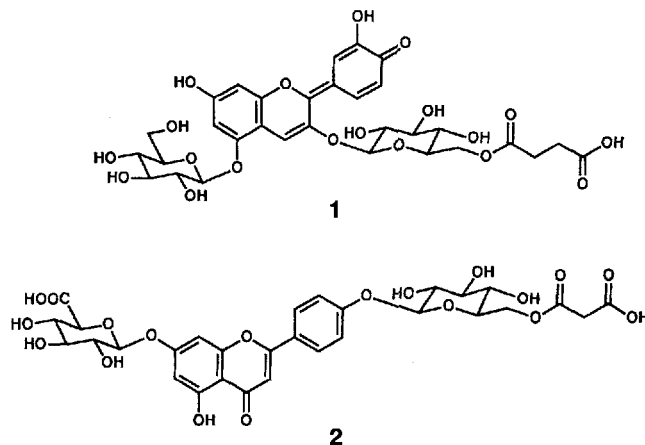


- 3473 [6158] Reflexe mit $F > p\sigma(F)$ ($p = 3$ [4]) zur Strukturlösung (Direkte Methoden) und -verfeinerung (368 [434] Parameter) verwendet, Nicht-Wasserstoffatome anisotrop, H-Atome mit einem „riding“-Modell verfeinert; $R = 0.067$ [0.062] ($R_w = 0.068$ [0.071], $w^{-1} = \sigma^2(F) + g F^2$, $g = 0.0008$ [0.0001]). Bei **4** wurde eine Extinktionskorrektur, bei **2** eine empirische Absorptionskorrektur mit dem Programm DIFABS durchgeführt. In **2** ist eine *p*-tert-Butylgruppe fehlgeordnet (s.o.f._{C31, C32, C33} = 0.62(1)). In **4** ist ein Toluolmolekül über ein Inversionszentrum fehlgeordnet. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-58059 angefordert werden. b) N. Walker, D. Stuart, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1993**, *39*, 158–166.
- [9] a) *Multiple Bonding and Low Coordination in Phosphorus Chemistry* (Hrsg.: M. Regitz, O. J. Scherer), Thieme, Stuttgart, **1990**; b) H. Heydt in [9a], S. 375–390; c) E. Niecke, D. Gudat in [9a], S. 392–403; d) G. Bertrand in [9a], S. 443–454.
- [10] Das in der *endo/endo*-Form vorliegende, zu **6** isoelektronische Bis(imino)phosphoran, $R-P(=NR)=NSiMe_3$ ($R = 2,4,6\text{-}t\text{-Bu}_3C_6H_2$) zeigt eine ^{31}P -Verschiebung von $\delta = 66$ [6].
- [11] S. O. Grim in *Phosphorus-31-NMR-Spectroscopy in Stereochemical Analysis* (Hrsg.: J. G. Verkade, L. D. Quin), VCH, Deerfield Beach, FL, **1987**, S. 645–664.
- [12] H. Schmidbaur, O. Gasser, M. Sakhawat Hussain, *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 3501–3507.
- [13] $\delta^{13}C$ (99, $^1J_{CP} = 157.9$ (CP_A), 143.4 (CP_B) Hz); $\delta^{31}P$ (27.2 (P_A), 3.1 (P_B) $^2J_{PP} = 120.8$ Hz). M. Soleilhavoup, A. Baccaredo, O. Treutler, R. Ahlrichs, M. Niegler, G. Bertrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10959–10961.

Zusammensetzung von Protocyanin, einem selbstorganisierten supramolekularen Pigment aus der Kornblume *Centaurea cyanus***

Tadao Kondo*, Minoru Ueda, Hirotohi Tamura, Kumi Yoshida, Minoru Isobe und Toshio Goto†

Aus der blauen Kornblume, *Centaurea cyanus*, gewannen Willstätter et al. anfang dieses Jahrhunderts das Cyanin^[1,2]. 1958 isolierten Bayer et al. aus der gleichen Pflanze ein blaues Pigment, das Protocyanin^[3,4], das Hayashi et al.^[5] und Asen et al.^[6–8] später kristallin erhielten. Diese drei Arbeitsgruppen schlugen für Protocyanin Metallkomplexstrukturen vor; die Berichte über Teilstrukturen widersprachen jedoch einander, was angesichts der komplexen Eigenschaften von Protocyanin und dem damaligen Stand der Technik nicht verwundert. Protocyanin wurde analog einem weiteren blauen Pigment, dem Commelinin^[9], als ein Metalloanthocyanin formuliert. Es ist nicht dialysierbar, wandert bei der Elektrophorese zur Anode, dissoziiert bei Verdünnung mit Wasser und entfärbt sich dabei rasch. Die Struktur von Commelinin haben wir vollständig aufklären können^[10]; zur Strukturbestimmung geeignetes, reines Protocyanin konnte aus den Blütenblättern der Kornblume nicht erhalten werden, da es weit weniger stabil als Commelinin ist. Die saure Dissoziation von rohem Protocyanin ergab als Bausteine das Anthocyanin Succinylcyanin **1** (Sucy) und das Malonylfla-



von **2** (Mafl)^[11]. Wir berichten nun über die Synthese des blauen Pigments der Kornblume aus diesen Bausteinen unter Zusatz von Metall-Ionen sowie über seine genaue Zusammensetzung.

Protocyanin wurde sorgfältig aus dem Extrakt aus blauen Blütenblättern der Kornblume durch Fällung und Gelpermeationschromatographie (GPC) isoliert. Das Pigment ist in Pufferlösungen bei pH 5 blau^[12], so wie es auch unter den physiologischen Bedingungen im Blütenblatt gefunden wird, und hat einen großen negativen Cotton-Effekt im Bereich des sichtbaren Lichts (Abb. 1)^[13]. Die Bausteine des Pigments wurden durch

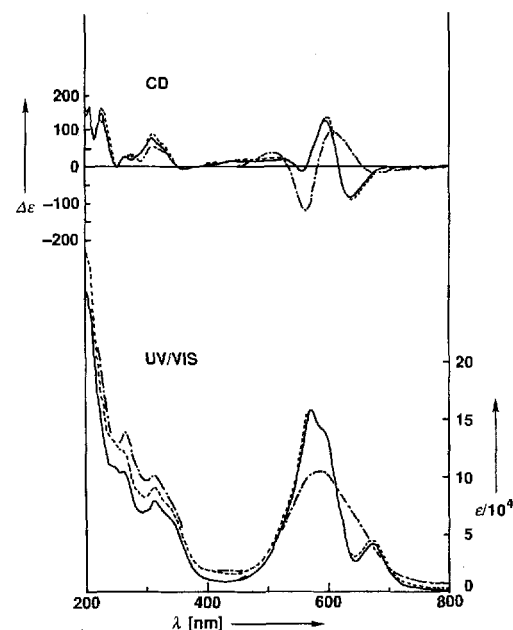


Abb. 1. UV/VIS- und CD-Spektren von natürlichem (—), rekonstituiertem (---) und Fe₂-Protocyanin (—) (5×10^{-5} M in 0.1 M Acetatpuffer (pH 5.0)).

[*] Prof. Dr. T. Kondo
Chemical Instrument Center, Nagoya University
Chikusa, Nagoya 464-01 (Japan)
Telefax: Int. + 52/781-9404

M. Ueda, Dr. H. Tamura, Prof. Dr. M. Isobe, Prof. Dr. T. Goto†
School of Agriculture, Nagoya University
Dr. K. Yoshida
School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen University

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur gefördert (Grant 02250103). Wir danken Prof. Dr. Y. Kuroda, Nagoya City University, für ESR-spektroskopische Messungen und Prof. Dr. K. Endo, Showa College of Pharmaceutical Sciences, für die Messung der Mößbauer-Spektren.

HPLC, Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie und ICP-Messungen (ICP = Anregung mit induktiv gekoppeltem Plasma) untersucht. **1** und **2** sowie Eisen- und Magnesium-Ionen wurden stets gefunden, wobei nur das Verhältnis von **1** zu **2** mit 1:1 annähernd konstant war. Um reines Protocyanin zu erhalten und dessen genaue Zusammensetzung zu bestimmen, versuchten wir es aus dem Anthocyanin- und den Flavonbaustein in Gegenwart von Metall-Ionen zu rekonstituieren. Zu der Lösung eines äquimolaren Gemisches von **1** und **2** wurden 10 Äquivalente Mg²⁺ gegeben: Die Farbe der Lösung war purpur und unterschied

sich somit von der einer Protocyaninlösung. Die Zugabe von 1/6 Äquivalent Mohrschem Salz ($\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ zu der purpurnen Lösung führte zu einem Farbumschlag nach blau, der Farbe des Naturstoffs. Das rekonstituierte Pigment gab die gleichen UV/VIS- und CD-Spektren wie das natürliche Protocyanin und bewegte sich bei der Elektrophorese gleichweit in Richtung Anode. Ein Überschuß des Eisen(II)-Salzes ($>1/6$ Äquiv.) führte zu einem dunkelblauen Pigment^[14], das auch durch Mischen von **1**, **2** und Eisen(II)-Ionen erhalten wurde. Die Rekonstitution ohne **2** ergab ein weiteres blaues Pigment^[15]. Mit Eisen(III)-alaun wurde das gleiche Pigment wie mit Mohrschem Salz gebildet. Die vier Bausteine sind dementsprechend notwendig und hinreichend für Protocyanin; makromolekulare Bausteine sind nicht beteiligt. Protocyanin, das unter Zusatz von Eisen(II) rekonstituiert worden war, gab im ESR-Spektrum (X-Band, 77 K) ein Signal bei $g = 4.26$, was auf Eisen(III)-Ionen im High-spin-Zustand ($S = 5/2$) in einer rhombischen Umgebung deutet^[16]; dieser Befund wurde durch Mößbauer-Spektroskopie bestätigt.

Das gereinigte rekonstituierte Protocyanin wurde in einer 10proz. Lösung von Trifluoressigsäure (TFA) in D_2O dissoziiert und ^1H -NMR-spektroskopisch vermessen. Das Verhältnis von **1** zu **2** wurde zu 1:1 bestimmt, was durch HPLC bestätigt wurde. Die Metall-Ionen wurden durch Atomabsorptions- und ICP-Messungen analysiert^[17]. Das Verhältnis von Eisen(III)- zu Magnesium-Ionen betrug 1:1. Quantitative HPLC ergab ein Verhältnis von Eisen(III)-Ionen zu **1** von 1:6 bis 1:8. Die Bestimmung der genauen relativen Molekülmasse von Protocyanin gelang uns durch Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) im Negativ-Ionen-Modus, die sich schon beim Commelinin als sehr leistungsfähig erwiesen hatte^[18] (Abb. 2).

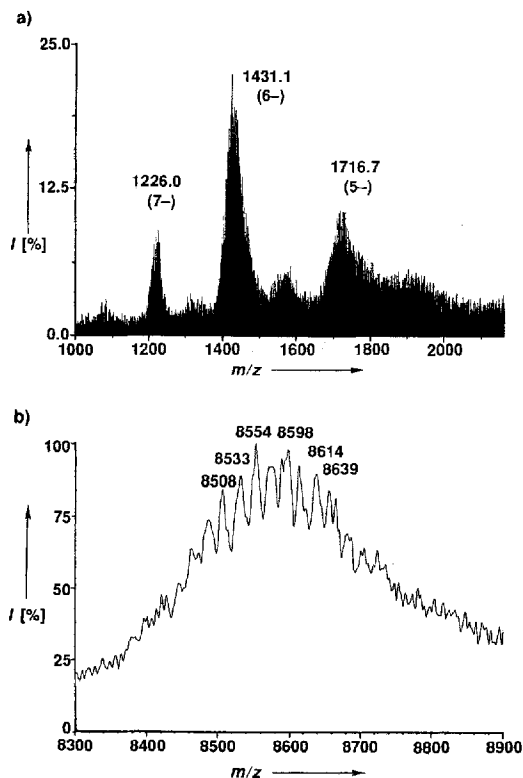


Abb. 2. a) ESI-Massenspektrum von Protocyanin (1 mg in 50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1/1)). API-III-PE-Sciex-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer in Negativ-Ionen-Modus; Potential des Interface-Sprayers -105 V; Fließgeschwindigkeit $3 \mu\text{L min}^{-1}$. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Ladung. b) Spektrum nach Überlagerung der um die Ladung bereinigten Peakgruppen aus a).

Nach Überlagerung der um die Ladung bereinigten Peakgruppen (deconvolution) wurde der Molekülpeak bei m/z 8508, eine Serie von Peaks im Abstand von 22 Masseneinheiten zwischen m/z 8500 und 8600 gefunden. Letzteres deutet darauf hin, daß die Carboxylatgruppen im Protocyanin Na^+ -Ionen gebunden haben. Die genaue Zusammensetzung von Protocyanin ergibt sich danach zu $[\text{Sucy}_6\text{Mafl}_6\text{Fe}^{3+}\text{Mg}^{2+}]$ ($\text{C}_{366}\text{H}_{384}\text{O}_{228}\text{FeMg}$, $M_r = 8511$), d. h. Protocyanin ist ein metallkomplexiertes Anthocyanin. Je sechs Moleküle **1** und **2** sowie je ein Eisen(III)- und ein Magnesium-Ion setzen sich selbstorganisierend zu einem stöchiometrischen Supramolekül zusammen. Die Struktur sollte der des Commelinins ähneln.

Experimentelles

Isolierung von Protocyanin: Frische blaue Blütenblätter von *Centaurea cyanus* (3.7 kg) wurden in flüssigem N_2 gefroren, pulverisiert und mit Wasser (1.1 L) extrahiert. Die blaue Lösung wurde sofort in EtOH filtriert und der gebildete Niederschlag abzentrifugiert. Er wurde zwei weitere Male in Wasser gelöst und in EtOH ausgefällt. Das Pigment (544 mg) wurde durch Hochleistungs-GPC (MCI-Gel, CQS-10, 700×7.0 mm, 0.1 M wäßrige NaClO_4) und über eine Sephadex-G-10-Säule gereinigt. Die blaue Fraktion wurde im Vakuum eingedunstet und getrocknet, wobei ein blaues Pulver zurückblieb (43 mg). – UV/VIS (0.1 M Acetatpuffer, pH 5.0): λ_{max} (ϵ) = 676 (4.31×10^4), 569 (1.60×10^5), 315 (8.16×10^4), 262 (1.08×10^5). Schultern bei 615 (8.85×10^4), 598 (1.37×10^5), 524 (6.00×10^4) nm; CD: λ ($\Delta\epsilon$) = 636 (-85.3), 597 ($+124.6$), 558 (-13.2) nm.

Rekonstitution von Protocyanin: 1-TFA (20 mg, 25 μmol) und 2-TFA (20 mg, 30 μmol) wurden in Wasser gelöst und mit verdünnter Ammoniaklösung neutralisiert. Die Lösung wurde eingedunstet und der Rückstand in 250 μL 0.1 M Acetatpuffer (pH 5.0) gelöst. Zu der purpurfarbenen Lösung wurden 250 μL einer 0.5 M wäßrigen $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ -Lösung (250 μmol) und dann 40 μL einer 0.1 M wäßrigen Lösung des Mohrschen Salzes (4 μmol) gegeben. Zu der nun blauen Lösung wurde EtOH (1.5 mL) zugefügt. Nach 30 min bei -30°C wurde zentrifugiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und chromatographisch an einer Sephadex-G-10-Säule gereinigt. Man erhielt 23 mg Protocyanin. – UV/VIS (0.1 M Acetatpuffer, pH 5.0): λ_{max} (ϵ) = 676 (4.57×10^4), 569 (1.63×10^5), 315 (9.34×10^4), 262 (1.28×10^5). Schultern bei 615 (9.39×10^4), 598 (1.39×10^5), 524 (6.45×10^4) nm; CD: λ ($\Delta\epsilon$) = 640 (-85.5), 597 ($+133.1$), 558 (-15.8) nm.

Eingegangen am 15. November 1993 [Z 6501]

- [1] Übersicht: T. Goto, T. Kondo, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 17; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 17.
- [2] R. Willstätter, A. E. Evcrest, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1913**, 401, 189.
- [3] E. Bayer, *Chem. Ber.* **1958**, 91, 1115.
- [4] E. Bayer, H. Egeter, A. Fink, K. Nether, K. Wegmann, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 834; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1966**, 5, 791.
- [5] a) K. Hayashi, N. Saito, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* **1960**, 36, 340; b) N. Saito, S. Mitsui, K. Hayashi, *ibid.* **1961**, 37, 393.
- [6] S. Asen, L. Jurd, *Phytochemistry* **1967**, 6, 577.
- [7] S. Asen, R. M. Horowitz, *Phytochemistry* **1974**, 13, 1219.
- [8] Y. Osawa in *Anthocyanin as Food Colors* (Hrsg.: P. Marakakis), Academic Press, New York, **1982**, S. 41–68.
- [9] K. Hayashi, Y. Abe, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* **1958**, 34, 373.
- [10] T. Kondo, K. Yoshida, A. Nakagawa, T. Kawai, H. Tamura, T. Goto, *Nature* **1992**, 358, 515.
- [11] a) H. Tamura, T. Kondo, Y. Kato, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5749; b) K. Takeda, S. Tominaga, *Bot. Mag.* **1983**, 96, 359.
- [12] Das blaue Pigment wird bei pH 5.0, Commelinin bei pH 6.5 gebildet.
- [13] Diese große negative Exciton-artige Cotton-Kurve deutet auf eine linkshändige Stapelung der Succinylcyanin-Chromophore hin, wie sie auch bei Commelinin gefunden wurde, vgl. Lit. [10].
- [14] Dieses Pigment, Fe_2 -Protocyanin, besteht aus je sechs Molekülen **1** und **2** sowie zwei Eisen-Ionen. – UV/VIS (0.1 M Acetatpuffer, pH 5.0): λ_{max} (ϵ) = 588 (1.05×10^5), 314 (1.02×10^5), 266 (1.39×10^5) nm; CD: λ ($\Delta\epsilon$) = 608 ($+73.9$), 563 (-101), 512 ($+37.0$) nm; ESI-MS: m/z : 8579 [$M + 2\text{Na}^+ - 2\text{H}^+$], M_r 8543.
- [15] λ_{max} = 688 nm, 544 nm.
- [16] a) W. T. Oosterhuis, *Struct. Bonding (Berlin)*, **1974**, 20, 59; b) L. Que, Jr., *J. Chem. Educ.* **1985**, 62, 938. Eisen(II)-Ionen könnten durch Luftsauerstoff in der Lösung zu Eisen(III)-Ionen oxidiert werden. Wegen der paramagnetischen Natur des Eisen(III)-Zentrums waren die Signale von Protocyanin im ^1H -NMR-Spektrum sehr verbreitert, so daß keine Informationen zur Struktur erhalten werden konnten.
- [17] Gef.: Mg, 0.10%; Fe, 0.30% für natürliches Protocyanin; Mg, 0.19%; Fe, 0.55% für rekonstituiertes Protocyanin; ber.: Mg, 0.28%; Fe, 0.66% für $\text{C}_{366}\text{H}_{384}\text{O}_{228}\text{FeMg}$. Die Abweichungen sind auf eingeschlossenes Lösungsmittel zurückzuführen.
- [18] T. Kondo, M. Ueda, K. Yoshida, M. Isobe, K. Titani, T. Goto, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht.