

with data reported. There were some that did not coincide but according to the mode of the synthesis, these products were considered to be correct. These compounds were synthesized in order to compare with polymethylpyridines obtained from coal tar bases.

(Received March 27, 1953)

31. Kozô Hayashi, Yukihide Abe, Tatsuo Noguchi, und Kyôko Suzushino:

Studien über Anthocyane. XXII¹⁾. Beiträge zur papier-chromatographischen Analyse der natürlichen Anthocyane und Anwendung derselben zur Untersuchung von Farbstoffen in den roten *Impatiens*-Blüten und den blutroten Pfirsich-Früchten**.

(Research Institute for Natural Resources, Tokyo*)

Zwecks Eingehens in die Erforschung der Anthocyane, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind, haben wir uns seit kurzem mit der Aufstellung von papier-chromatographischem Arbeitsgang beschäftigt, um damit die Farbstoffanalyse an den farbärmeren, sogar an schwer zugänglichen Gegenständen zu ermöglichen. Bereits fanden wir einige wertvolle Arbeiten von Bate-Smith *et al.*²⁾, wobei aber ihr Hauptziel darin liegt, die Zusammenhänge zwischen den papier-chromatographischen Beschaffenheiten und der chemischen Konfiguration genannter Farbstoffgruppe ausfindig zu machen.

Leider scheint aber das geeignete Schema des Arbeitsganges, welches im allgemeinen für die Bestimmung von pflanzlichen Anthocyanen brauchbar ist, bis heute noch nicht aufgestellt worden zu sein. Somit wollen wir einige Ergebnisse unserer bisherigen Arbeiten, die mit dieser Absicht ausgeführt wurden, unten im (I) Abschnitt zusammenfassend berichten. Sie müssen natürlich auch für unsere chemischen Weiterarbeiten gute Dienste darbieten.

Zunächst haben wir unserer papier-chromatographischen Technik zur Farbstoffanalyse gegenüber zwei pflanzliche Materialien verwendet, deren Farbstoffbestandteile noch nicht bekannt sind; d.h. die orangeroten Blüten von *Impatiens Balsamina* L. und die blutroten Früchte von *Prunus persica* Batsch. Dabei hat es sich gezeigt, dass der Hauptfarbstoff in den ersten aus Pelargonin, und derselben in den zweiten aus Chrysanthem in bestand. Dieselben Sachlagen konnten wir schliesslich auf rein chemischem Wege beweisen, worüber unten im Abschnitt II und III näher beschrieben werden.

Unter stetiger Anregung und gütiger Leitung von Ehrenprof. Y. Asahina und Prof. Sh. Hattori wurde diese Arbeit durchgeführt, wofür wir ihnen unseren besten Dank aussprechen. Dem Unterrichtsministerium danken wir für die finanzielle Unterstützung bei der Ausführung dieser Untersuchung.

Beschreibung der Versuche

I. Gang der papier-chromatographischen Analyse der Anthocyane in den Pflanzenorganen³⁾

—(a) Vorversuche mit den krystallinischen Anthocyanpräparaten: Unsere papier-chromatographische Aufarbeitung verlief ganz nach dem aufsteigenden Prinzip unter Benutzung von Tôyô Filtrierpapier, Nr. 50 (oder Nr. 2), welches sich ohne besondere Vorbehandlung gut als anwendbar erwies. Der ursprüngliche Farbstoff-flecken wurde dadurch dargelegt, dass man einen

* 4-400, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo (林 孝三, 阿部幸頼, 野口辰男, 涼野恭子).

** Mitteilung aus der Forschungsanstalt für Naturerzeugnisse, Nr. 559.

1) XXI. Mitteil.: Proc. Japan Acad., 28, 429 (1952).

2) E. C. Bate-Smith: Nature, 161, 835 (1948); E. C. Bate-Smith, R. G. Westall: Biochim. et Biophys. Acta, 4, 427 (1950).

3) Vgl. auch K. Hayashi, Y. Abe: Misc. Repts. Research Inst. Nat. Resources (Japan), 28, 1 (1952) (Japanisch).

Tropfen von Anthocyanlösung (in 1%iger methanolischer Salzsäure) auf dem Filtrierpapier beschickt (20~40 r für das Glykosid und 60~300 r für das Aglykon), und das letzte in der Luft trocknen lässt.

Für die Entwicklung benutzten wir eine Oberschicht der Solvent-Mischung von folgender Zusammensetzung:

TABELLE I Mischungsverhältnisse für die Bereitung von Entwicklungssolventien.

<i>iso</i> Amylalk.-36% HCl-H ₂ O (<i>iso</i> A·H)	5 : 1 : 1	in Vol.
<i>n</i> -Butylalk.-Eisessig-H ₂ O (Bu·A)	4 : 1 : 5	"
<i>iso</i> Butylalk.-36% HCl-H ₂ O (<i>iso</i> Bu·H)	10 : 6.5 : 11	"
Essigester-Eisessig-H ₂ O (EtAc·A)	4 : 1 : 2	"
Amylacetat-Eisessig-H ₂ O (AmAc·A)	4 : 1 : 1	"
Phenol-H ₂ O	9 : 1	in Gew.

Die erhaltenen Rf-Werte der authentischen Präparate von wichtigen Anthocyaninen und Anthocyanidinen lassen sich in Tabelle II zusammenstellen.

TABELLE II Rf-Werte von Anthocyaninen und Anthocyanidinen.
(auf Tôyô Filtrierpapier Nr. 50, bei 28°.)

Farbstoff	Entwicklungsmittel					
	<i>iso</i> A·H	Bu·A	<i>iso</i> Bu·H	AmAc·A	EtAc·A	Phenol
Pelargonidin	0.75	entfärbt	0.96	0.01	0.49	entfärbt
Cyanidin	0.75	"	0.78	0.04	0.31	"
Paeonidin	0.62	"	0.86	0.05	0.40	"
Delphinidin	0.30	"	0.46	0.02	0.20	"
Malvidin	0.41	"	0.68	0.04	0.29	"
Pelargonin: Pelargonidin+2 Glucose (3:5)*	0.05	0.39	0.43	0	0.07	0.66
Chrysanthem: Cyanidin+1 Glucose (3)	0.13	0.41	0.40	0	0.15	0.52
Idaein: Cyanidin+1 Galactose (3)	0.09	0.40	0.38	0	0.13	0.63
Cyanin: Cyanidin+2 Glucose (3:5)	0.03	0.28	0.29	0	0.05	0.46
Lycoricyanin: Cyanidin+1 Gluc. +1 Xylose (3)	0.13	0.43	0.37	0	0.12	0.51
Illicyanin: Cyanidin+1 Gluc. +1 Xylose (3)	0.10	0.40	0.40	0	0.15	0.50
Cosmocyanin: Cyanidin+1 Gluc. +1 Rhamnose (3)	0.13	0.42	0.51	0	0.15	0.53
Paeonin: Paeonidin+2 Glucose (3:5)	0.04	0.36	0.38	0	0.07	0.73
Empetrin: Delphinidin+1 Galactose (3)	0.06	0.21	0.29	0	0.08	0.45
Hyacin: Delphinidin+2 Glucose (3)	0.01	0.13	0.20	0	0.02	0.30
Uliginosin: Malvidin+1 Galactose (3)	0.10	0.40	0.41	0	0.17	0.95
Malvin: Malvidin+2 Glucose (3:5)	0.02	0.31	0.32	0	0.06	0.77
Salvianin: Pelargonin+2 Malonsäure +1 <i>p</i> -Oxyzimtsäure	0.34	0.51	0.60	0	0.29	0.68
Shisonin: Cyanin+ <i>p</i> -Oxyzimtsäure	0.28	0.53	0.83	0	0.24	0.58
Ensatin: Malvidin+2 Glucose (3) +1 <i>p</i> -Oxyzimtsäure	0.20	0.44	0.88	0	0.22	0.89

* Die Ziffer in Klammern zeigt die Stellung der Zuckerbindung am Anthocyanidinmolekül.

(b) **Allgemeines Schema der Anthocyananalyse auf pflanzlichen Rohmaterialien:** Hierzu fanden wir folgende Arbeitsweise als erfolgreich:

i) Extraktion: Ausziehen des frischen, anthocyanführenden Pflanzenmaterials (1~10 g.) mit 1%iger methanolischer Salzsäure (5~10 ccm.).

ii) Prüfung auf Anthocyanidin: Ein kleiner Teil obigen Gesamtauszuges wird mit gleichem Volumen 20%iger Salzsäure vermischt und zum Verjagen des Methanols auf dem Wasserbade auf 90~100° erhitzt. Darauf wurde die Flüssigkeit auf freier Flamme 2 Minuten zum Sieden gehalten, wobei das glykosidische Anthocyan fast vollkommen in die zuckerfreie Form überging. Aus diesem Hydrolysat wurde das Aglykon mit *iso*Amylalkohol ausgeschüttelt; von der Amylalkoholschicht lässt man den Farbstoff durch Vermischen mit Wasser und Äther (ins Gesamt 4~10 Vol.) in die

wässrige Schicht übergehen. Die abgesonderte, wässrige Farbstofflösung wird nach dem Waschen mit Petroläther, Essigester, Schwefelkohlenstoff, usw., wieder mit kleinster Menge von Amylalkohol entzogen. Diese Amylalkohollösung wird zur Darstellung von Originalflecken verwendet. Zur Entwicklung leistet *isoA·H* oder *isoBu·H* (Tabelle I) vortreffliche Dienste.

iii) Prüfung auf Anthocyanglykosid: Obiger Rohextrakt (i) wird ohne weiteres auf dem chromatographischen Papier punktiert und der erhaltene Flecken mit geeigneten Lösungsmitteln entwickelt. Nötigenfalls wird der ursprüngliche Extrakt mit Wasser verdünnt und mit Essigester, Äther, Petroläther, usw. nacheinander gewaschen. Für die Bestimmung von eigentlichen Rf-Werten sind die folgenden Operationen vorteilhaft: Auf grossem, rechteckigem Filtrierpapier (z.B. 40×40 cm.) wird eine Anthocyanlösung gerade auf der Grundlinie gestrichen und mit Hilfe von geeignetem Mittel zur Bildung von Bandchromatogramm entwickelt. Darauf wird die einzelne Farbzone sorgfältig abgeschnitten. Jede wird sodann nach absteigend-chromatographischer Vorrichtung durch langsames Herablaufen von Äther, Petroläther, Essigester, u.a. nachgewaschen, und schliesslich wird der Farbstoff mit MeOH-CH₃COOH (5% Säure) auf gleiche Weise eluiert. Mit diesem Eluat nimmt man ohne weiteres (oder nach dem Einengen durch Äther-Fällung) eine zweite chromatographische Aufarbeitung vor. Nach dieser Behandlung gibt das Anthocyan in der Regel den korrekten Rf-Wert.

iv) Prüfung auf "Co-Pigment": Zum Nachweis des Anthocyan-"Co-Pigment"-Komplexes, welcher in den Pflanzenorganen bisweilen aufzutreten pflegt, benutzten wir für jetzt unsere Erfahrungen beim sorgfältigen Erproben an verschiedenen Stadien der hydrolytischen Spaltung von den ursprünglichen Glykosiden. Zum Beispiel, in den blauen Blüten von *Ipomoea tricolor* und auch von *Pharbitis Nil* beobachtet man, dass die Abspaltung des "Copigmentes" im Laufe von einer bei 70° vorsichtig ausgeführten Salzsäure-Behandlung (ca. 10% Säure) nach 10~20 Minuten vervollständigt. Für die chromatographische Trennung von ausgebildeten zweierlei Komponenten, freies Anthocyanin und "Co-Pigment", ist die Entwicklung mit EtAc·A sowie AmAc·A sehr geeignet. In der Regel scheint der Rf-Wert einer Komplexverbindung kleiner zu sein als der des entsprechenden freien Anthocyanins.

v) Prüfung auf Esterbindung von organischen Säuren: Eine durch Wiederextraktion gereinigte Anthocyanlösung wurde wie üblich der alkalischen Verseifung unterworfen (ca. 1 Stunde in H₂-Atmosphäre); nach dem Ansäuern der Flüssigkeit wurde die in Freiheit gesetzte, organische Säure ausgeäthert und chromatographisch untersucht. Im allgemeinen ist das Bild des Fleckens von acyliertem Anthocyanin mehr oder minder ellipsoidisch in Vergleich mit dem des entsprechenden freien Glykosides.

vi) Prüfung auf Zucker: Obiges Farbstoffeluat (vgl. (iii)) wird mit Salzsäure hydrolysiert und wie üblich auf dem Papier entwickelt. Für den Nachweis des Zuckers sind die in Tabelle III angeordneten Rf-Werte nützlich. Die Zahl und Stelle der Zuckerbindung können durch sorgfältige Untersuchung von Rf-Werten der ursprünglichen Glykosiden hingewiesen werden. Eine Mischung von 3-Monoglucosid und Monogalactosid wird durch Entwicklung mit Phenol voneinander gut abgetrennt.

TABELLE III Rf-Werte der Zuckerarten auf Tôyô
Filtrierpapier Nr. 50, bei 28°.

Zucker	Entwicklungsmittel					
	<i>isoA·H</i>	Bu·A	<i>isoBu·H</i>	AmAc·A	EtAc·A	Phenol
Xylose	0.15	0.33	0.42	0.02	0.22	0.45
Arabinose	0.13	0.32	0.41	0.01	0.18	0.53
Rhamnose	0.24	0.45	0.57	0.05	0.33	0.64
Glucose	0.10	0.26	0.36	0	0.13	0.34
Galactose	0.09	0.24	0.34	0	0.11	0.36
Fructose	0.11	0.28	0.36	0.01	0.15	0.52
Sucrose	0.09	0.13	0.26	0	0.10	0.32

Mit Rücksicht auf den oben beschriebenen Bemerkungen können wir die Anthocyankomponente in den Pflanzenorganen genügend charakterisieren. Falls sich die Unstimmigkeit im Rf-Wert vorfindet, folglich die Identifizierung des einzelnen Farbstoffs dadurch kaum möglich ist, so müssen wir ihn freilich mit den Standardpräparaten hinsichtlich des Rf-Wertes sorgfältig vergleichen wozu man wenigstens einiger Vergleichspräparate, z.B. Cyanidin, Delphinidin und ihre Glykoside, benötigt.

II. Über Anthocyanin in den Blüten von *Impatiens Balsamina*—Unter den zahlreichen

4) Dieser Körper gab, nach der Reduktion mit Mg-HCl, einen mit Malvidin vereinbaren Rf-Wert.

Gartenvarietäten dieser Pflanze, haben wir die fünf als Gegenstände für unsere chromatographischen Untersuchungen benutzt. Wie aus der Tabelle IV ersichtlich, finden sich in den Blüten von gemeinen Sorten zwei Anthocyanine, d.h. das Pelargonin und vielleicht das Malvin, einheitlich oder vermischt vor. Daneben werden die gelben Begleiter (Kaempferol und ein unbekanntes Flavonoid⁴⁾) fast immer in bedeutender Menge nachgewiesen.

TABELLE IV Chromatographisch nachgewiesene Farbstoffkomponente der *Impatiens*-Blüten (entwickelt mit Bu·A bei 28°)

Versuchspflanzen		Anthocyaninkomponente				Flavonoid	
		Flecken A (Rf: 0.5)	Flecken B (Rf: 0.4) Pelargonin	Flecken C (Rf: 0.45)	Flecken D (Rf: 0.3) Malvin	Kaempferol	?
Nr.	Blütenfarbe						
1	rosa-farbig	9*	1*	0	0	+	+
2	hell scharlachrot	8	2	0	0	+	+
3	purpurrot	4	1	5	Spur	—	+
4	rotviolett	Spur	0	8	2	±	+
5	orangerot	0	9	0	0		
6	sehr schwach rosa-farbig	0	10	0	0		Cyanin 1

Anmerkungen: Flecken A: wahrscheinlich Pelargonin-Pelargonidinpentosid-Komplex: Flecken C: vielleicht Malvin-Malvidinpentosid-Komplex.

* Die Ziffer zeigt einen mutmasslichen Farbstoffgehalt, welcher aus anscheinender Farbstärke des Fleckens entnommen wurde.

Isolierung des Pelargonins—Etwa eine Handvoll von orangeroten Blüten (Nr. 5 in Tab. IV) (Frischgewicht 21 g.) wurde mit 80 ccm. kalter 1%iger methanolischer Salzsäure ausgelaugt. Der klar filtrierte Extrakt wurde mit 5 Vol. Äther vermischt; nach kurzem Stehen liess sich das Farbstoffkonzentrat am Gefässboden absetzen, welches auf grossem Filtrierpapier geschickt und im Strom von trockener Luft abgedampft wurde. Aus diesem wurde der Farbstoff wieder mit kalter 2%iger methanolischer Salzsäure herausgelöst und mit viel Äther ausgefällt, wobei das Rohanthocyanin in amorphem Zustand erhalten wurde. Dieses Produkt wurde, durch Auflösen in wenig 2%iger methanolischer Salzsäure und Zugabe von 10%iger Salzsäure (ca. 1/4 Vol.), schliesslich in schönen, karminroten Nadelbüscheln übergeführt. Ausbeute ca. 5 mg., Schmp. 182° (Zers.). Die Verteilung zwischen 0.5%iger Salzsäure und *iso*Amylalkohol ergab die Zahl 1.5, also verhielt sich der Farbstoff normal diglykosidisch. Eine alkoholische sowie wässrige Lösung des Farbstoffs waren durch einen prachtvollen, eosin-ähnlichen Fluoreszenz charakterisiert. Eisenchloridreaktion fiel ganz negativ aus. Bei der Spaltung mit siedender 20%iger Salzsäure verwandelte sich das Anthocyanin in die rotbraunen, prismatischen Krystalle oder bisweilen in die orangeroten, schwalbenschwanz-ähnlichen Gebilde, welche beide für Pelargonidin eigentümlich sind.

Ferner ergab das ursprüngliche Glukosid Rf=0.39 bei der Entwicklung mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), und Rf=0.06 mit *iso*Amylalkohol-konz. Salzsäure-Wasser (5:1:1). Auch eine mit Pelargonin gemischte Probe verhielt sich chromatographisch genau ebenso.

III. Über Anthocyanin der blutroten Pfirsich-Früchte—Eine Sorte von *Prunus persica* Batsch. (Rosaceae), die bei uns als "Tenshin-momo" benannt wird, ist durch sein tief blutrotes Fruchtfleisch ausgezeichnet. Vorläufige Prüfung nach unserer papier-chromatographischen Methode hat ergeben, dass der rote Farbstoff aus zwei Komponenten besteht. Darunter erwies sich der Hauptfarbstoff als Chrysanthem in selbst, und der Begleiter wurde als sein Derivat anerkannt, welches wahrscheinlich weiter mit einem Pentosemolekül verbunden ist. Beim papier-chromatographischen Entwickeln mit *iso*Bu·H (Tab. I) war der Flecken des zweiten Farbstoffs stets etwas höher gelagert als das Chrysanthem in selbst. Behandelt man den Farbstoff, nach dem Reinigen durch Wiederextraktion, mit Salzsäure unter milden Bedingungen, so ging er schliesslich ins Chrysanthem in über, was auf chromatographischem Wege gezeigt wurde.

Chemische Untersuchung hat ergeben, dass der Hauptfarbstoff in Wirklichkeit das Chrysanthem in ist, während der zweite sich noch nicht feststellen liess.

Präparative Darstellung des Chrysanthemins aus dem blutroten Fruchtfleisch—Aus 40 frischen Früchten gewannen wir 3.18 kg. Fruchtfleisch. Dieses wurde zerquetscht und mit 1 L. 2%iger methanolischer Salzsäure vermischt; nach einigen Stunden wurde das Ganze in einem Presssack stark gepresst, wobei eine ziemlich viskose Flüssigkeit ausfloss. Da sie gegen Filtrierpapier kaum durchlässig war, wurde der darin enthaltene Farbstoff sofort durch Zusatz von gesättigter Bleisubacetatlösung gefällt. Darauf wurde die voluminöse, graulich blaue Fällung abgenutscht, und in kalter 5%iger methanolischer Salzsäure aufgelöst. Aus dem tief roten Filtrat (ca. 350 ccm.) liess man den Farbstoff mit reinem Äther (3 Vol.) ausfallen, wobei ein dunkel roter Syrup erhalten

wurde. Der letzte wurde, nach der Behandlung mit abs. Alkohol und Äther, schliesslich in den halbfesten Zustand umgewandelt. Dann wurde die Masse in 40 ccm. kalt gesättigter Pikrinsäurelösung aufgenommen, woraus sich die Pikrinsäureverbindung bald in bräunlich roten Nadeln abschied, die etwa 0.2 g. wogen. Dieses Rohpikrat enthielt noch eine beträchtliche Menge von unlöslichen Beimengungen, welche sich leicht durch Umkrystallisieren aus Wasser abtrennen liessen. Schliesslich erhielten wir 35.5 mg. an ganz reinem Pikrat in Form von rotbraunen Nadeln, welche den Zersp. 183° besaßen, unter vorherigem Sintern und Verscharzen bei 173°.

Zur Verwandlung ins Chlorid behandelte man das obige Pikrat (19.4 mg.) mit 5%iger methanolischer Salzsäure (1 ccm.) und fällte das Chlorid mit Äther (5 Vol.). Das amorph ausgefallene Chlorid führte man, durch Aufnehmen in kleinster Menge Wasser unter Zusatz von 4%iger äthanolischer Salzsäure (ca. 3 Vol.), in den krystallinen Zustand über. Aggregate von kleinen, rotbraunen, linsenförmigen Blättchen mit leuchtendem Goldglanz. Lufttrocken 6.6 mg.

Die Substanz zog sich bei 222~222.5° plötzlich zusammen unter gleichzeitigem Verkohlen. Der Verteilungswert zwischen 0.5%iger Salzsäure und *iso*Amylalkohol wurde ermittelt als 11.1, woraus folgt, dass das betreffende Anthocyanin monoglykosidisch ist. Tief blaue Reaktion mit Eisen(III)chlorid deutet dahin, dass der Farbstoff frei von Methoxyl ist. Nach papier-chromatographischen Prüfungen fanden wir, dass es am ehesten dem Chrysanthem in zurückzuführen ist, was auch durch Chromatographieren der gemischten Probe bewiesen wurde. Derselbe Tatbestand wurde weiter durch hydrolytische Spaltung wiedergegeben. Hierzu hat man eine kleine Menge Glykosid mit siedender 20%iger Salzsäure hydrolysiert und den zuckerfreien Farbstoff als hübsche, rotbraune Nadeln erhalten, welche in allen Punkten mit authentischem Cyanidin identisch waren.

Die salzsaure Hydrolysemutterlauge, die den abgespaltenen Zucker enthielt, gab alle negative Reaktionen für Keto-hexose, Pentose, Methylpentose sowie für Uronsäure; das papier-chromatographische Studium zeigte, dass der Zucker nur aus Glucose besteht.

Auf Grund der oben angeführten Versuchsergebnisse hielten wir dafür, dass in der blutroten Frucht das Chrysanthem in (Cyanidin-3-glucosid) als Hauptfarbstoff vorkommt.

Zusammenfassung

1. Unter Benutzung von krystallinischen Anthocyanpräparaten, welche bisher von uns aus einer Anzahl von pflanzlichen Gegenständen dargestellt worden waren, wurden die Rf-Werte gegen verschiedene Entwicklungsmitteln bestimmt.
2. Ein Schema des papier-chromatographischen Arbeitsganges wurde vorgeschlagen, um damit die Bestimmung von Anthocyanbestandteilen in den Pflanzenorganen schnell und genau auszuführen.
3. Die Anthocyanin-Zusammensetzung der verschiedentlich gefärbten Blüten von *Impatiens Balsamina* wurde auf chromatographischem Wege festgestellt, wodurch man sogar aus einer Handvoll von orangeroten und auch schwach rosa-farbigen Blüten das Pelargonin krystallinisch isolieren und als solches identifizieren konnte.
4. Das Anthocyanin der blutroten Früchte von *Prunus persica* wurde auf papier-chromatographischem sowie rein chemischem Wege untersucht. Es wurde bewiesen, dass der Hauptfarbstoff nichts anderes als das Chrysanthem in ist.

(Eingegangen am 2. April, 1953)