

134. Hans-Joachim Bielig: Die Farbstoffe der Sanddornbeere.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut f. Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut f. Chemie.]
(Eingegangen am 9. Oktober 1944.)

Aus den zinnoberroten Beeren des Sanddorns (*Hippophae rhamnoides*) sind bisher zwei Farbstoffe kristallisiert erhalten worden: Von P. Bolley¹⁾ ein als Quercetin bezeichnetes Flavonol und das Carotinoid Zeaxanthin durch P. Karrer und H. Wehrli²⁾. Wie A. Winterstein und U. Ehrenberg³⁾ gezeigt haben, liegt das Zeaxanthin teilweise mit Palmitinsäure verestert als Physalien vor. Die Ausbeuten an Zeaxanthin werden zu 16.5 bis 33 mg, die an Physalien zu 40 mg je kg frische Beeren angegeben. Über die isolierte Flavonolmenge ist nichts bekannt.

Im Hinblick auf die Bedeutung, welche der Sanddornbeere neuerdings als Vitamin-C-Träger zukommt — der *l*-Ascorbinsäuregehalt kann bei Vollreife bis zu 900 mg-% betragen⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾ —, hat es nicht an Versuchen gefehlt, auch die Vorstufen des A-Vitamins in dieser Frucht nachzuweisen. In keinem Falle wurde jedoch bisher der exakte Beweis dafür erbracht, daß Provitamine A in der Sanddornbeere vorkommen. C. Griebel und G. Hess⁸⁾ weisen auf Grund der mikroskopischen Beobachtung gelbroter Chromoplasten und deren Blaufärbung mit konz. Schwefelsäure das Vorhandensein eines „carotinoidartigen Farbstoffes“ nach. B. Hörmann⁴⁾ findet auf chromatographischem Wege Carotin, „was auf Grund der orangefarbenen Farbe nahe lag“. Dieser Autor läßt aber völlig unbeachtet die Anwesenheit des Zeaxanthins und macht weder Angaben über Art und Aussehen seines Chromatogramms, noch über die Reaktionen des von ihm nachgewiesenen Farbstoffs. F. Brühne⁷⁾ hat den „Vitamin-A“-Gehalt alkoholischer Lösungen von Sanddornbeersaft mit Hilfe des von G. Kedvessy⁸⁾ für Lebertran ausgearbeiteten Verfahrens bestimmt: Titration mit Pikrinsäure bis zur Löschung der im UV-Licht beobachtbaren, dem Vitamin A zugeschriebenen Fluoreszenz. Wie alle bisher untersuchten pflanzlichen Produkte enthält aber auch die Sanddornbeere keine Spur freien oder veresterten A-Vitamins. Über eine Fluoreszenz der Provitamine A ist hingegen nichts bekannt.

Um zu ermitteln, ob über die bekannten Farbstoffe hinaus noch weitere Pigmente in der Sanddornbeere vorkommen, haben wir diese erneut untersucht. Hierbei wurde unter anderem folgendes festgestellt: 1) Das von P. Bolley¹⁾ isolierte Flavonol hat nicht die Konstitution des Quercetins, sondern stellt dessen 3'-Methyliäther, das Isorhamnetin, dar. 2) Die Carotinoidfraktion der Sanddornbeere enthält zwei in kristallisierter Form isolierte Provitamine A, nämlich Kryptoxanthin und β -Carotin. An weiteren Polyfenfarbstoffen wurden Lycopin und γ -Carotin nachgewiesen. 3) Die Farbe der Beeren wird mitbestimmt durch ein Anthocyan, welches mit dem violettroten Farbstoff der Pfingstrose, Päonin, identisch ist.

¹⁾ Dinglers polytechn. Journ. **162**, 143 [1861].

²⁾ Helv. chim. Acta **13**, 1104 [1930].

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **207**, 25 [1932].

⁴⁾ B. Hörmann, Die Sanddornbeere, Verlag d. Pflanzenwerke, München 1941.

⁵⁾ M. Löhner, Dtsch. Apotheker-Ztg. **56**, 582 [1941].

⁶⁾ C. Griebel u. G. Hess, Ztschr. Unters. Lebensmittel **79**, 469 [1940].

⁷⁾ Die deutsche Heilpflanze **9**, Nr. 11 [1943].

⁸⁾ Ber. ungar. pharmaz. Ges. [ungar.] **16**, 642 [1941]; C. 1942 II, 194.

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung und Identifizierung der Farbstoffe diente Sanddornbeerdicksaft⁹⁾. Die quantitative Bestimmung der Carotinoide geschah sowohl hierin als auch in frischen Beeren verschiedener Herkunft¹⁰⁾.

1) Die Flavonolfraktion.

Neutralisiert man, wie im Versuchsteil näher beschrieben ist, frischen Sanddornbeerdicksaft mit festem Kaliumcarbonat, wobei die Farbe von Zinnoberrot nach Braun umschlägt, und bringt man hierauf auf einen Gehalt von 80% Methanol, so lassen sich die Carotinoid- und die Anthocyanfraktion zusammen mit den festen Anteilen des Saftes leicht von der dunkelbraunen, flavonolhaltigen Methanolphase abtrennen. Letztere scheidet bei eintägigem Stehen ein hellgelbes Rohkrystallisat ab (30 g aus 2 l Saft), das aus zahlreichen zu schönen Wärcchen vereinigten mikroskopischen Nadeln besteht.

Dieses Krystallisat enthält zur Hauptmenge das saure Kaliumsalz der *l*-Äpfelsäure, welche H. Erdmann¹¹⁾ erstmals aus Sanddornbeeren als Calciumsalz isoliert und identifiziert hat. Beim Umkrystallisieren aus verdünntem Methanol haben wir aus 10 g Rohkrystallisat 6.2 g Kaliumhydrogen-*l*-malat in farblosen Stäbchen erhalten, welche in 10-proz. wäßriger Lösung die nach G. H. Schneider¹²⁾ berechnete optische Drehung $[\alpha]_D^{25}$: —6.38° aufwiesen. Das nach den Angaben von E. Fischer und F. Passmore¹³⁾ bereitete Bis-phenylhydrazid schmolz bei 221—223° (korr.) und zeigte mit demselben Derivat der *l*-Äpfelsäure keine Schmelzpunktserniedrigung.

Die gelbe Farbe wird dem Rohkrystallisat durch die 5-proz. Beimischung eines Flavonolglykosids erteilt. Erst nach dessen saurer Hydrolyse, wobei sich das Aglykon in gelben Flocken quantitativ abscheidet (750 mg aus 2 l Sanddornbeerdicksaft), fällt die Fehlingsche Reduktionsprobe positiv aus. Das über die Tetraacetylverbindung (farblose Nadeln vom Schmp. 206°, korr.) gereinigte Aglykon krystallisierte aus Dioxan in gelben, rhombischen Plättchen vom Schmp. 308—309° (korr., Zers.). Die Mischproben mit synthetischem 3.5.7.4'-Tetraacetoxy-3'-methoxy-flavon bzw. synthetischem Quercetin-3'-methyläther (Isorhamnetin)¹⁴⁾ zeigten keine Schmelzpunktserniedrigung. Im Einklang mit diesen Befunden verleiht das Isorhamnetin aus Sanddornbeeren, wie Hr. Dr. Moewus aus unserem Institut geprüft hat, den Zwitterzellen der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* ebenso die Fähigkeit, mit männlichen Gameten zu kopulieren, wie das von R. Kuhn und I. Löw¹⁵⁾ aus Crocuspollen isolierte und wie synthetisches Isorhamnetin. Bei der Spezifität dieser Gynotermonwirkung¹⁵⁾ ist an der Identität des Flavonols aus Sanddornbeeren mit Quercetin-3'-methyläther nicht zu zweifeln. Die von P. Bolley¹⁾ auf Grund einer falschen Bruttoformel ausgesprochene Gleichheit mit Quercetin wird hierdurch widerlegt. Zu den Pflanzenfamilien, in denen Isorhamnetin vorkommt¹⁶⁾, tritt damit als weitere die der Eleagnaceen.

⁹⁾ Wolfra, Gesellschaft für zahmlose Fruchtverwertung, München.

¹⁰⁾ Die noch am Strauch haftenden Beeren stammten von drei verschiedenen oberbayrischen Sammelpätzen.

¹¹⁾ B. 32, 3351 [1899]. *Ann. Chem. Phys.* 20, 166 [1888]. *Ann. Chem. Phys.* 22, 2734 [1889].

¹²⁾ B. 77, 196 [1944].

¹³⁾ R. Kuhn, F. Moewus, *Ann. Chem. Phys.* 22, 2734 [1889].

¹⁶⁾ Vergl. M. Hadders, *Die Wildpflanzen Mitteleuropas*, 1. Teil, 1. Pflanzenanalyse (Springer, Wien 1932), Bd. 11.

Hier ist es erstmals eine Frucht, welche den Farbstoff, und zwar fast ausschließlich in glykosidischer Bindung enthält. Daß der von den Botanikern gewählte Beiname des Sanddorns „rhamnoides“, auch chemisch zu Recht besteht, ist jetzt durch die Isoherung von Isorhamnetin erwiesen.

Gießt man die zur Trockne verdampfte gelbe Mutterlauge des sauren, apfelsauren Kaliums in wäßriger Lösung auf eine „schwefelsaure“ Aluminiumoxydsäule¹⁷⁾ auf, so wird diese von dem Isorhamnetinglykosid in einer scharfen, hellgelben Zone leicht passiert, während farblose Begleiter und etwas freies Flavonol vom Adsorptionsmittel zurückgehalten werden. Das auf diese Weise angereicherte Glykosid zeigte indessen keine Neigung zu kristallisieren. Es bildete in Dioxan einen vor der Quarzlampe intensiv grüngelb fluoreszierenden Borsäure-Citronensäure-Komplex¹⁸⁾, was für jene Flavonole charakteristisch ist, deren 5-ständiges Hydroxyl frei vorliegt. Unser gereinigtes Glykosid macht, wie Hr. Dr. Moewus fand, die Gameten von Chlamydomonas unter Abstoßung der Geißeln unbeweglich. Es kann demnach mit dem Isorhamnetin-diglucosid-(3,4') identisch sein, welches R. Kuhn und I. Löw¹⁴⁾ erstmals aus dem Pollen von Crocus Sir John Bright isoliert haben und das sich bei der Fluorescenzprobe und in der biologischen Wirkung gleichartig verhält.

Nach S. Rusznyak und A. Benkő¹⁹⁾ wird unter den Flavonolen, welche im Resistenztest an flavonarm ernährten Meerschweinchen und Ratten geprüft wurden, die erniedrigte Capillarresistenz der Tiere außer durch Quercetin und Quercetin-rhamnosid-(3) (Quercitrin) auch durch 7-Methoxyquercetin (Rhamnetin) wieder normal gestaltet. Es ist damit zu rechnen, daß auch dem mit Rhamnetin isomeren Isorhamnetin (3'-Methoxyquercetin) bzw. dessen Diglucosid eine permeabilitätsvermindernde Wirkung zukommen und daß die Sanddornbeere damit in die Reihe der Vitamin-P-Träger einzuordnen sein wird.

2) Die Carotinoidfraktion.

Bei der Abtrennung des Isorhamnetin-diglykosids aus Sanddornbeerdicksaft hinterbleiben die Carinoide in den festen, orangeroten Anteilen des Fruchtmarkes. Sie lassen sich daraus zusammen mit Fetten, Lipoiden und Sterinen durch Benzol extrahieren. Der Benzin-Benzol (10:1)-Auszug des in alkoholischer Kalilauge Unverseifbaren ergibt bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd nach Entwickeln mit Benzol fünf verschiedenfarbige Zonen und ein orangerotes Filtrat. Wie im Versuchsteil beschrieben ist, haben wir die drei Hauptcarinoide aus den Eluaten der zerschnittenen Säule kristallisiert gewonnen.

Der in der obersten, tiefroten Schicht vorliegende Farbstoff ist das in langgestreckten, gelben Blättchen kristallisierende Zeaxanthin (Schmp. 206°, korr.). Die Ausbeute an reinem Pigment belief sich auf 280 mg für 2 l Sanddornbeerdicksaft. Sie übertrifft, auf frische Beeren berechnet (1 l Saft ~ 3.5 kg Beeren), diejenige, welche P. Karrer und H. Wehrli²⁾ ohne chromatographische Reinigung erhalten haben.

¹⁷⁾ Das „schwefelsaure“ Aluminiumoxyd wird entsprechend dem von T. Wieland, Ztschr. physiol. Chem. **273**, 24 [1942], benutzten „salzsauren“ Aluminiumoxyd bereitet.

¹⁸⁾ C. W. Wilson, Journ. Amer. chem. Soc. **61**, 2303 [1939].

¹⁹⁾ Klin. Wschr. **20**, 1265 [1941].

Aus der gelbbraunen zweiten Zone erhielten wir 27 mg Kryptoxanthin, das aus Benzol-Methanol in rechteckigen Tafelchen vom Schmp. 164.5—166.5° (korr.) krystallisierte und sich im Mischchromatogramm mit Kryptoxanthin aus *Physalis Franchetti*²⁰⁾ einheitlich verhielt. Wie wir gefunden haben, lassen sich Kryptoxanthin und das ihm spektral äußerst ähnliche β -Carotin viel sicherer als mit der Entmischungsprobe²⁰⁾, welche nur bei recht reinen Präparaten eindeutig ausfällt, an der Aluminiumoxydsäule dadurch unterscheiden, daß β -Carotin beim Entwickeln mit Benzol-Benzin (2:1) rasch quantitativ ins Filtrat geht, während Kryptoxanthin nur äußerst langsam wandert.

Das Filtrat der Adsorption der Sanddornbeercarotinoide enthält demgemäß reines β -Carotin, welches sich nach Abtrennen farbloser Begleiter aus Benzol-Methanol in beinahe quadratischen Tafeln, die bei 181—185° (korr.) schmelzen, abscheidet. Die Ausbeute betrug 23 mg je 2 l Sanddornbeersaft; der Mischschmelzpunkt mit β -Carotin aus Möhren²¹⁾ zeigte keine Erniedrigung.

Die weiteren adsorbierten Carotinoide, welche mengenmäßig stark zurücktreten, konnten nur durch ihr Spektrum charakterisiert werden (sämtliche Messungen an Schwefelkohlenstofflösungen²²⁾). Es sind dies in der Reihenfolge abnehmender Adsorption: a) Lycopin mit max. λ 546, 506, 474 m μ (Lycopin aus Tomaten²³⁾ max. λ 548, 507.5, 477 m μ in (CS₂), b) eine vermutlich isomerisiertes Lycopin enthaltende Fraktion, die mit ihren optischen Schwerpunkten (max. λ 542, 502, 466 m μ) zwischen jener des Lycopins und des von L. Zechmeister und A. Polgár²⁴⁾ aufgefundenen Neolycopins (max. λ 536.5, 499, 466 m μ in (CS₂) steht, c) höchstwahrscheinlich γ -Carotin mit max. λ 534, 497, 461 m μ (γ -Carotin aus Möhren²⁵⁾) max. λ 533.5, 496, 463 m μ in (CS₂).

3) Quantitative Carotinoidanalyse.

Zum Vergleich der Sanddornbeere mit anderen provitamin-A-haltigen Nahrungsmitteln haben wir frische Früchte verschiedenen Standortes¹⁰⁾ sowie den zur Isolierung der Farbstoffe benutzten Sanddornbeerdicksaft⁹⁾ quantitativ auf die wichtigsten darin vorkommenden Carotinoide hin analysiert. Die Ergebnisse, welche mit den im Versuchsteil angegebenen Methoden erhalten wurden, sind in den Tafeln 1 und 2 zusammengestellt.

Aus Tafel 1 geht hervor, daß unter den Provitaminen A das Kryptoxanthin das β -Carotin um beinahe das Doppelte überwiegt. Berechnet man den Provitamin-A-Gehalt nach seiner Vitamin-A-Wirkung, wobei für β -Carotin 0.6 γ = 1 I. E. (internationale Vitamin-A-Einheit)²⁶⁾ und für Kryptoxanthin der halbe Wirkungswert²⁰⁾ (1.2 γ = 1 I. E.) einzusetzen sind, so kommt man auf eine Zahl von 67 500 I. E. je kg Beeren. Anders ausgedrückt heißt dies: 1 kg frische, reife Sanddornbeeren hat die Provitamin-A-Wirkung von 40.5 mg β -Carotin. Die Sanddornbeere stimmt damit im Provitamin-A-Gehalt mit der ihr auch in der Vitamin-C-Menge nahestehenden Hagebutte überein.

²⁰⁾ R. Kuhn u. C. Grundmann, B. **66**, 1746 (1933).

²¹⁾ H.-J. Bielig, B. **77**, 431 (1944).

²²⁾ Gittermeß-Spektroskop nach Lowe-Schuman.

²³⁾ R. Kuhn u. E. Lederer, B. **65**, 637 (1932).

²⁴⁾ L. Zechmeister u. A. Polgár, A. **543**, 248 (1940).

²⁵⁾ R. Kuhn u. Brockmann, B. **66**, 407 (1933).

²⁶⁾ C. Bomskov, Methodik der Vitaminanalyse (Thieme, Leipzig 1935), S. 63.

Tafel 1. Gehalt von reifen Sanddornbeeren¹⁰⁾ und Sanddornbeerdicksaft an Provitaminen A (I) und sonstigen Carotinoiden (II).
(Mittelwerte aus je 3 bis 4 Bestimmungen.)

Nr.	Farbstoff	mg Farbstoff je kg Frischgewicht		Mengen- verhältnis der Farbstoffe von Saft:Beeren
		Beeren	Saft	
I	Kryptoxanthin	39 ± 20%	144 ± 18%	3.69 ± 27%
	β-Carotin	21 ± 10%	59 ± 11%	2.74 ± 15%
II	Zeaxanthin	122 ± 21%	423 ± 18%	3.47 ± 28%
	Lycopin	4 ± 45%	11 ± 30%	2.75 ± 50%
	Oxydationsprodukte	48 ± 18%	225 ± 20%	4.69 ± 19%
	Mittelwerte			3.49 ± 64%

Tafel 2. Gehalt von reifen Sanddornbeeren verschiedenen Standortes¹⁰⁾ an Provitaminen A und Zeaxanthin.
(Mittelwerte aus je 2 bis 3 Bestimmungen.)

Ort der Herkunft	Farbstoff in mg-% des Frischgewichts		
	β-Carotin	Kryptoxanthin	Zeaxanthin
Kauferring, Oberbayern	2.15 ± 7%	3.3 ± 16%	13.0 ± 18%
Hart a. d. Alz.....	2.1 ± 10%	3.6 ± 19%	10.5 ± 20%
Unter-Emerting, Oberbayern ...	2.0 ± 9%	4.1 ± 21%	12.0 ± 21%

Einen Vergleich mit verschiedenen vitamin-A- und provitamin-A-reichen Nahrungsmitteln gibt Tafel 3.

Tafel 3. Vergleich der Vitamin-A-Wirksamkeit von Sanddornbeeren mit anderen Nahrungsmitteln²⁷⁾.
(Durchschnittswerte chemischer Bestimmungen.)

Nahrungsmittel	Je kg frisches Nahrungsmittel ber. als		
	mg β-Carotin	mg Vitamin A	I. E.
Sanddornbeere	40.5	—	67 500
Sanddornbeerdicksaft	131.5	—	219 000
Karotte	100	—	167 500
Spinat	80	—	136 500
Hagebutte	50	—	83 500
Heilbuttlebertran	—	15 000	45 000 000
Handelslebertran	—	300	900 000
Rinderleber	—	85	255 000
Sommerbutter	5	7	29 500
Winterbutter	1.5	2	8 500

²⁷⁾ Zusammengestellt nach: G. Lunde, Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln, Springer, Berlin 1940; H. Rudy, Vitamine u. Mangelkrankheiten, Springer, Berlin 1943, und nach eigenen Messungen des Verfassers.

1 kg Sanddornbeeren hätte danach etwas weniger als die halbe Wirksamkeit von 1 kg Karotten und wäre etwa $2\frac{1}{2}$ kg guter Sommerbutter wirkungsgleich. Sanddornbeerdicksaft würde annähernd $\frac{1}{4}$ der Vitamin-A-Wirkung derselben Menge Handelslebertran besitzen. Es muß aber nachdrücklich betont werden, daß die wie üblich in Tafel 3 zusammengestellten, auf chemischem Wege bestimmten Werte biologisch nur dann vergleichbar sind, wenn die durch die Darmwand aufgenommenen Wirkstoffmengen in allen Fällen gleich und wenn die Umwandlungsquote von β -Carotin in Vitamin A jedesmal dieselbe ist. Dies ist aber tatsächlich nicht der Fall.

Wie M. van Eekelen und W. Pannevis²⁸⁾ sowie A. I. Virtanen und M. Kreula²⁹⁾ am Menschen und K. H. Wagner und Mitarbeiter³⁰⁾ an der Ratte gezeigt haben, beträgt die Resorption von β -Carotin aus Möhren und Spinat bei sonst normaler, fetthaltiger Diät im günstigsten Fall nicht mehr als 20% der tatsächlich vorhandenen Provitamin-A-Menge. Andererseits resorbiert die Ratte in Öl gelöstes β -Carotin zu 70—95%³¹⁾, das in natürlichen Vitaminträgern, z. B. Lebertran und dessen Konzentraten, überwiegend verestert vorliegende Vitamin A³²⁾ praktisch vollständig³³⁾. Dieser Unterschied wird darauf zurückgeführt, daß die Zellwände des Pflanzenmaterials im Darm nur schwer und unvollkommen aufgeschlossen werden, und daß der natürliche resorptionsfördernde Fettgehalt von Möhren und Spinat recht gering ist (0.28—0.31%³⁴⁾ bzw. 0.3—0.5%³⁵⁾). Berücksichtigt man fernerhin, daß dem veresterten Vitamin A ein höherer Wirkungswert als dem freien Alkohol zukommt³³⁾, so ist die tatsächliche Vitamin-A-Wirkung bei den pflanzlichen Produkten bedeutend niedriger, bei den tierischen Nahrungsmitteln aber höher als die Zahl der in Tafel 3 aufgeführten I. E. angibt.

Die Sanddornbeere gehört indessen zu jenen Früchten, deren Zellwände äußerlich weich und die daher leicht zu Saft zerdrückbar sind. Die im Mark lokalisierte Fettmenge beträgt zudem mit 2% des Frischgewichts³⁶⁾ das rund Siebenfache des Fettgehalts der Möhre: Aus 2 l Sanddornbeerdicksaft vermochten wir 152 g Fettsäuren abzutrennen. Rechnet man unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse daher mit einer Resorption von 40% der vorhandenen Provitamin-A-Mengen, und setzt man den täglichen Provitamin-A-Bedarf des gesunden Erwachsenen zu 3 mg β -Carotin an³⁷⁾ — ein Wert, in welchem die Umwandlungsquote in Vitamin A bereits enthalten ist —, so dürften zur Deckung des täglichen Vitamin-A-Bedarfs allein aus dieser Quelle 185 g Sanddornbeeren oder 57 g Sanddornbeerdicksaft erforderlich sein. Dieselbe Wirkung würde man mit im Mittel 8 g Handelslebertran, 62.5 g Sommerbutter oder 150 g fein geriebenen Möhren erreichen.

²⁸⁾ Nature [London] **141**, 203 [1938].

²⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **270**, 141 [1941].

³⁰⁾ K. H. Wagner, L. Günther u. H. Schmalftuß, Vitamine und Hormone **4**, 142 [1943].

³¹⁾ K. H. Wagner, L. Günther u. L. Schürze, Vitamine und Hormone **1**, 455 [1941].

³²⁾ K. Ritsert, Vitamine und Hormone **3**, 57 [1942].

³³⁾ Th. Moll u. A. Reid, Ztschr. physiol. Chem. **260**, 9 [1939].

³⁴⁾ M. v. Schleinitz, Landwirtsch. Jahrb. **52**, 131 [1918], **1918 II**, 847.

³⁵⁾ S. Serger, Pharmaz. Ztg. **51**, 322 [1906].

³⁶⁾ W. Rutschkin, Öl u. Fett. Labors. **8**, 2, 47 [1929], **10**, 1929 II, 3195.

³⁷⁾ K. H. Wagner, Ztschr. physiol. Chem. **264**, 132 [1940].

Unter den prozentig in den verschiedenen Carotinoiden der Sanddornbeere ist das Zeaxanthin das bei weitem überwiegende. Wie aus **Tafel 1** hervorgeht, beträgt die Zeaxanthinmenge ziemlich genau das Doppelte derjenigen aller übrigen Polyenfärbstoffe zusammen. Daneben findet man reichliche Mengen stark absorbierbarer, uneinheitlicher Oxydationsprodukte. Betrachtet man das Mengenverhältnis der einzelnen Farbstoffe im Saft vergleichend zu dem in den Beeren (**Tafel 1**, letzte Spalte), so fällt auf, daß diese Oxydationsprodukte bei der Saftbereitung vor allem auf Kosten des β -Carotingehalts der Beeren zugenommen haben. Diesem Provitamin-A-Verlust könnte durch Anwendung niedriger Temperaturen und Ausschluß von Luftsauerstoff bei der Gewinnung des Saftes entgegengewirkt werden. Die geringen Schwankungen, welche Beeren verschiedenen Standorts im Carotinoidgehalt zeigen (**Tafel 2**), liegen demgegenüber innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung.

Wir haben schließlich noch den Physaliengehalt im Sanddornbeerdicksaft mit dem im Versuchsteil angegebenen Verfahren bestimmt. Umgerechnet auf Beeren wurde in guter Übereinstimmung mit der von A. Winterstein und U. Ehrenberg³⁾ tatsächlich isolierten Physalienmenge gefunden, daß etwa 20% des vorhandenen Zeaxanthins als Physalien vorliegen (250 mg in 2 l Dicksaft).

4) Die Anthocyanfraktion.

Kocht man den von den Carotinoiden befreiten, nunmehr gelbbraunen Zellrückstand des Sanddornbeersaftes mehrmals mit Wasser aus und versetzt dann die wäßrigen Auszüge mit dem gleichen Volumen Methanol, so erhält man einen tiefvioletten, anthocyanhaltigen Niederschlag (3.4 g aus 2 l Sanddornbeerdicksaft). Die nahe konstitutionelle Verwandtschaft des von uns isolierten Isorhamnetins mit dem Anthocyanidin Päonidin, welches aus ersterem bei der Reduktion mit Magnesium in alkoholischer Salzsäure entsteht, legte es nahe, in der Anthocyanfraktion der Sanddornbeere ein Päonidinglucosid, das Päonin, zu vermuten.

Wir haben daher versucht, das violette Rohprodukt in Anlehnung an die von R. Willstätter und T. J. Nolan³⁸⁾ beschriebene Darstellung des Päonins aus Pfingstrosenblüten zu reinigen. Hierbei wurde zwar nicht der reine Farbstoff, wohl aber ein daran stark angereichertes Produkt (640 mg aus 2 l Saft) erhalten, welches bei der Hydrolyse mit 20-proz. Salzsäure ein noch uneinheitliches Krystallinat mit den Eigenschaften des Päonidins abschied. Zur eindeutigen Identifizierung des Anthocyanins haben wir uns gemeinsam mit Hrn. Dr. Moewus eines neuartigen Testes an der bereits mehrfach erwähnten Grünalge Chlamydomonas bedient.

Die fermentative Spaltung von Picrocrocin zu dem Androtermon 4-Oxy- β -cyclocitral, dem sogenannten Oxyaldehyd, durch die männlichen Gameten von Chlamydomonas³⁹⁾ bedarf nämlich zu ihrem Ablauf der Anwesenheit eines Aktivators. Mutanten, welche den Aktivator nicht zu bilden vermögen, sind auch nicht befähigt, das Picrocrocin zu spalten. Wie Hr. Dr. Moewus jetzt feststellen konnte, wird diesen Mutanten aber die picrocrocin-spaltende Fähigkeit durch Zugabe eines Anthocyanins verliehen. Unter den bisher geprüften Anthocyaninen und deren Agluconen erwies sich einzig das Diglucosid Päonin, welches wir nach R. Willstätter und T. J. Nolan³⁸⁾ aus

³⁸⁾ A. 408, 136 [1915].

³⁹⁾ R. Kuhn u. I. Löw, B. 74, 219 [1941].

Päonienbluten isoliert haben, als der gesuchte Aktivator. Es dürfte demnach hier ein ähnlich spezifischer Effekt vorliegen, wie er für andere biologische Vorgänge an *Chlamydomonas* vom Crocin¹⁰⁾ und vom Isorhamnetin¹¹⁾ her bekannt ist¹¹⁾.

Da das von uns aus Sanddornbeersaft angereicherte Anthocyan dieselbe biologische Wirkung wie analysenreines Päonin besitzt, zweifeln wir nicht daran, daß der Hauptfarbstoff der Anthocyanfraktion der Sanddornbeere Päonidin-diglucosid-(3,5)¹²⁾ ist. Unseren Schätzungen nach dürfte der Päonin Gehalt allerdings höchstens die Hälfte des Isorhamnetindiglucosid-Gehalts der Beeren ausmachen.

Die Anregung zu vorliegender Arbeit ging aus von Untersuchungen des Heeres-Versuchsbetriebes für Nahrungsmittel über Bedeutung und Einsatz der Sanddornbeere in der Ernährung. Für die Bereitstellung des Materials danke ich Hrn. Dr. M. Ott sowie Hrn. Apotheker M. Löhner, München. Hrn. Dr. F. Moewus gilt mein Dank für die Ausführung der biologischen Tests, Frl. H. Greiner für ihre Mithilfe bei der Ausführung der Versuche. Der Firma Schmitz-Scholl, Mülheim-Speldorf, habe ich ebenfalls für Unterstützung zu danken.

Beschreibung der Versuche.

1) Isolierung von Isorhamnetin.

2 l kernloser Sanddornbeersaft⁹⁾ werden mit 350 g festem Kaliumcarbonat in Anteilen verrührt, wobei unter CO₂-Entwicklung das pH auf 5 ansteigt. Zu der jetzt braunroten Masse fügt man 5 l Methanol, läßt unter gelegentlichem Umschütteln 5 Stdn. stehen und gießt dann die braungelbe Methanol-lösung ab. Die festen Anteile werden hierauf mit 2,5 l warmem 80-proz. Methanol $\frac{1}{4}$ Stde. durchgerührt und dann durch Absaugen und Nachpressen möglichst vollständig von der Methanolphase getrennt. Den Filterrückstand stellt man zur Isolierung der Carotinoide im Vakuumexsiccator über Calciumchlorid beiseite. Aus den vereinigten Methanolauszügen scheiden sich bei Zimmertemp. 27,5 g im Kühlschrank weitere 2,5 g zu hellgelben Drusen vereinigte Nadelchen ab. Diese werden auf der Nutsche gesammelt (in folgendem mit „Rohkrystallisat“ bezeichnet¹²⁾).

Hydrolyse: 10 g „Rohkrystallisat“ werden in 100 cem 2-n. Schwefelsäure durch Erwärmen gerade gelöst (nicht kochen!), von einer geringen verbleibenden Trübung rasch abfiltriert und das Filtrat einige Min. gekocht. Hierbei scheidet sich Isorhamnetin quantitativ in gelben, unlöslichen Flocken ab. Man zentrifugiert, befreit das Zentrifugat durch wiederholtes Waschen mit dest. Wasser von anhaftender Säure und trocknet im Vakuumexsiccator über P₂O₅. Ausb. 250 mg Rohprodukt.

Acetylierung: 100 mg des Isorhamnetin-Rohprodukts werden mit 10 cem Acetanhydrid p. A. und 3 Tropfen Pyridin $\frac{1}{2}$ Stde. unter Rückfluß

⁹⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. D. Jochims, B. 71, 1541 [1938].

¹⁰⁾ Über die biolog. Zusammenhänge der Aktivatorwirkung wird Hr. Dr. F. Moewus demnächst in den „Jahrbüchern für Wasserbau“ Bericht¹⁾ berichten.

¹¹⁾ Zur Konstitution vgl. P. K. St. Laurent, M. M. Morton, Helv. chim. Acta 15, 1212 [1932].

¹²⁾ Den beim Abdampfen an der Luft verbleibenden Saft der Mutterlauge kann man, in Essig lösen und durch Zugabe von 50% Sanddornbeersaft durch Zufügen von Methanol krystallisieren.

erhitzt, in Eis abgekühlt und mit 100 ccm Eiswasser zersetzt. Die rohe Acetylverbindung (85 mg) krystallisiert aus absol. Alkohol in farblosen, langen Nadeln vom Schmp. 206° (korr.). Mischschmp. mit synthet. Tetraacetylisorhamnetin (Schmp. 208°, korr.)¹⁴⁾ lag bei 207° (korr.). Zur Analyse wurde bei 110°/5 mm über P₂O₅ getrocknet.

C₂₄H₃₀O₁₁ (484.2). Ber. C 59.45, H 4.17, CH₃CO 35.54. Gef. C 59.72, H 4.15, CH₃CO 31.11.

Verseifung: 50 mg Tetraacetylisorhamnetin werden mit 10 ccm 20-proz. Salzsäure 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Das ausgeschiedene und im Zentrifugenglas säurefrei gewaschene hellgelbe Isorhamnetin krystallisiert man aus Dioxan-Wasser um. 28 mg rhombische Plättchen vom Schmp. und Mischschmp. mit synthet. Isorhamnetin¹⁴⁾ 308—309° (korr., Zers.) nach Bräunung ab 285°.

C₁₆H₁₂O₇ (316.1). Ber. C 60.74, H 3.88, OCH₃ 9.81. Gef. C 60.47, H 3.96, OCH₃ 10.53.

2) Versuche zur Reinigung des Flavonolglykosides.

10 g „Rohkrystalliat“ (vergl. unter 1) werden aus 175 ccm 80-proz. Methanol umkrystallisiert: 6.2 g langgestreckte, farblose, sehr leicht wasserlösliche Stäbchen von Kaliumhydrogen-l-malat, die sich bei >150° unter Gasentwicklung bräunen und bei höherer Temp. unter Aufblähen verkohlen. Die wäbr. Lösung hat p_H 4.1. Mit β-Naphthol in konz. Schwefelsäure⁴²⁾ tritt Olivgrünfärbung ein, die auf Wasserzusatz in Hellorange mit bläulicher Fluoreszenz übergeht. Zur Analyse wurde bei 110°/5 mm über P₂O₅ getrocknet.

C₆H₅O₃K (172.14). Ber. C 27.88, H 2.93, K 22.71. Gef. C 27.53, H 3.18, K 23.05.

α_D (300 mg Sbst. in 2.7 ccm H₂O): $-0.71^\circ \pm 0.03^\circ$.

Ber. $[\alpha]_D^{20}$: $-(0.6325 \times 0.05562 \times q) = -6.35^\circ$ (nach G. H. Schneider¹²⁾,
q = g Wasser in 100 g Lösung = 90).

Gef. $[\alpha]_D^{20}$: $-(0.71 \times 100) : (11.11 \times 1) = -6.38^\circ$.

Bis-phenylhydrazid¹³⁾: 200 mg Sbst. in 2 ccm Wasser, 0.30 g Phenylhydrazin und 0.70 g 50-proz. Essigsäure 3 Stdn. im Wasserbad erwärmen. Die beim Erkalten abgeschiedenen blaßgelben Blättchen krystallisiert man aus verd. Alkohol um. Ausb. 80 mg vom Schmp. und Mischschmp. mit dem Bis-phenylhydrazid aus l-Äpfelsäure bei raschem Erhitzen 221—223° (korr.). Trocknen bei 110°/5 mm über P₂O₅.

Chromatographie: Der Abdampfrückstand (Vak., sd. Wasserbad) der gelben Mutterlauge des sauren äpfelsauren Kaliums wird in 50—75 ccm Wasser gelöst und auf eine mit wäbr. „schwefelsaurem“ Aluminiumoxyd (Merck, puriss.)¹⁷⁾ bereitete Säule (3 × 12 cm) aufgegossen. Entwickeln mit dest. Wasser. Während sich im oberen Drittel der Säule farblose, mit verd. Ammoniaklösung eluierbare Stoffe anhäufen, unterhalb deren eine geringe Menge freies Isorhamnetin in gelber Schicht festgehalten wird, geht das Flavonolglykosid in einer scharfen hellgelben Zone ins Filtrat.

Letzteres färbt sich mit einem Tropfen wäbr. Eisen(III)-chlorids tief olivgrün und reduziert Fehlingsche Lösung erst nach der sauren Hydrolyse, wobei sich Isorhamnetin abscheidet. Der Abdampfrückstand des Filtrats der Chromatographie (290 mg) konnte nicht zur Krystallisation gebracht werden. Einige mg der zähen Masse wurden mit 1 ccm wasserfreiem Dioxan erwärmt und nach C. W. Wilson¹⁸⁾ mit einer Acetonlösung von wasserfreier Borsäure und wasserfreier Citronensäure versetzt, wobei weitgehend Lösung unter Bildung des vor der Quarzlampe intensiv grüngelb fluoreszierenden Bor-Citronensäurekomplexes eintrat (freies Hydroxyl in 5-Stellung¹⁴⁾).

¹⁴⁾ E. Egriwe, Zschr. analyt. Chem. 89, 121 [1932].

Biologische Prüfung: Das chromatographisch angereicherte Flavonolglykosid aus Sanddornbeersaft macht wie das aus den Pollen von *Crocus* Sir John Bright von R. Kuhn und I. Löw⁴³⁾ isolierte Isorhamnetindiglucosid-(3,4'), die Gameten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* unbeweglich (Prüfung durch Hrn. Dr. F. Moewus) und ist möglicherweise mit diesem identisch.

3) Isolierung von β -Carotin, Kryptoxanthin und Zeaxanthin.

Der im Vakuumexsiccator zunächst über wasserfreiem Calciumchlorid, dann über Phosphorpentoxid getrocknete, dunkelorange-rote Filtratrückstand der Methanolbehandlung des Sanddornbeerlichsaftes (vergl. unter I) ist wegen seines Fettgehaltes noch etwas schmierig. Man extrahiert daraus die Carotinoide, indem man unter Einleiten von Stickstoff bei 40° 4-mal je $\frac{1}{2}$ Stde. mit je 1 l Benzol durchrührt. Die vereinigten filtrierten Benzolauszüge hinterlassen beim Abdampfen des Lösungsmittels (Vak., 60° Badtemp.) 186 g eines tiefroten Öls. Dieses wird mit 100 ccm konz. Kalilauge (900 g KOH/l) und 350 ccm Alkohol in 3 Stdn. verseift (Badtemp. 60°, Stickstoffatm.). Man löst die beim Erkalten erstarrte Verseifungslösung in 750 ccm Wasser und schüttelt 4- bis 5-mal mit je 1 l Äther-Benzol (2:1) erschöpfend aus. Die sich hierbei ausbildenden schleimigen Zwischenschichten läßt man getrennt ab und befreit sie durch Absaugen über eine 1-2 cm dicke Schicht von Kieselgur (Merck) von anhaftender Flüssigkeit, welche man in den Scheidetrichter zurückgibt⁴⁴⁾. Die vereinigten Äther-Benzol-Phasen werden 1-mal mit 2 l Wasser, dann mit 1 l 5-proz. Kalilauge und zuletzt 3-mal mit je 1,5 l Wasser gewaschen, über möglichst wenig wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert.

Der tiefrote, halb feste Abdampf rückstand des Unverseifbaren (Vak., 50° Badtemp., Stickstoffatm.) beträgt 6 g. Man löst ihn warm in 250 ccm eines Gemisches aus gleichen Anteilen Benzol und Benzin (Sdp. 70-80°), kühlt auf 0° und filtriert von ausgeschiedenen Sterinen. Das Filtrat gießt man auf eine mit Benzin bereitete Säule (4 · 50 cm) von Aluminiumoxyd (nach Brockmann, Merck). Beim Entwickeln mit 1 l Benzol erhält man die Zonen I bis V und das Filtrat VI:

Zone	Höhe (cm)	Farbe und Entmischungsprobe ⁴⁵⁾	Optische Schwerpunkte in CS ₂
I, oben	0.5	braunrot, hypophasisch	518, 484, 445 m μ (verwaschene Banden); Oxydationsprodukte
I, unten	1.5	rostrot, hypophasisch	518, 483, 451 m μ ; Zeaxanthin
II	2.5	gelbbraun, vorwiegend epiphasisch	519, 484, 451.5 m μ ; Kryptoxanthin
III	5	schwach rosa, epiphasisch	546, 506, 474 m μ ; Lycopin
IV	3	gelbrosa, epiphasisch	542, 502, 466 m μ ; isomerisiertes Lycopin ⁴⁶⁾
V	10	schwach beigerosa, epiphasisch	534, 497, 461 m μ ; γ -Carotin
VI	Filtrat	orangerot, epiphasisch	520, 485, 453 m μ ; β -Carotin

⁴⁴⁾ Nach Ansäuern der Verseifungslauge mit halbkonz. Salzsäure lassen sich durch Ausäthern 152 g eines Gemisches schön kristallisierender Fettsäuren gewinnen.

⁴⁵⁾ R. Kuhn u. H. Brockmann, *Zschr. physiol. Chem.* 206, 41, 1932.

Zone I unten: Das Alkoholeluat liefert beim Einengen 120 mg Zeaxanthin. Gelbe, langgestreckte Blättchen aus Alkohol, Schmp. 204—206° (korr.). Durch Zufügen von Benzin zur Mutterlauge steigt die Ausbeute auf 280 mg (= 26% der colorimetrisch bestimmten Menge. P. Karrer und H. Wehrli² haben ohne Chromatographie je kg Sanddornbeeren im Mittel 25 mg Zeaxanthin, entsprechend 175 mg aus 2 l Sanddornbeersaft (1 l Saft ~ 3.5 kg Beeren) erhalten.

Zone II: Elution mit methanolhaltigem Benzin. Der Abdampfrückstand (Vak., 50° Badtemp., Stickstoff) wird durch wiederholtes Auskochen mit je 10—20 ccm acetonfreiem Methanol verlustreich von farblosen Begleitern befreit. Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus 2 ccm Benzol + 2 ccm Methanol scheiden sich 27 mg (= 9.5% der colorimetrisch ermittelten Menge) Kryptoxanthin in rechteckigen Täfelchen vom Schmp. 164.5—166.5° (korr., evakuiertes Röhrchen) ab. Das Mischchromatogramm mit Kryptoxanthin aus *Physalis Franchetti*²⁰⁾ in Benzin an Calciumcarbonat (gefällt, reinst, Merck) erwies sich als einheitlich. Im Mischchromatogramm mit β -Carotin aus Benzin an Aluminiumoxyd (nach Brockmann, Merck) geht β -Carotin mit Benzol-Benzin (2:1) rasch quantitativ ins Filtrat, während die braunrote Kryptoxanthinzone nur langsam wandert (gute Unterscheidungsmethode der beiden spektral sehr ähnlichen Farbstoffe).

Filtrat VI: Wird im Vak. (50° Badtemp., Stickstoff) zur Trockne verdampft und im Zentrifugenglas unter Stickstoff 5- bis 6-mal mit je 5 ccm acetonfreiem Methanol und einmal mit 5 ccm absol. Äthanol ausgekocht. Der tiefrote, krümelige Rückstand krystallisiert aus Benzol-Methanol²¹⁾ in den charakteristischen, beinahe quadratischen Tafeln des β -Carotins. Ausb. 23 mg (= 19.5% der colorimetrisch ermittelten Menge) vom Schmp. und Mischschmp. mit β -Carotin aus Möhren²²⁾ 182—183° (korr., evakuiertes Röhrchen).

Zonen III bis V: Die hier adsorbierten Farbstoffe konnten wegen des ungünstigen Mengenverhältnisses von Farbstoff zu farblosen Begleitern nicht zur Krystallisation gebracht werden. Außer den im Schema der Säule (s. o.) angegebenen maximalen Absorptionen in CS₂ wurden nach wiederholter chromatographischer Reinigung weitere zur Identifizierung gemessen:

Lycopin	518, 482, 440 m μ in Chloroform ⁴⁷⁾
	502, 471, (441) m μ in Benzin ⁴⁸⁾
β -Carotin	503, 471, (443) m μ in Chloroform ⁴⁹⁾
	495, 460.5, 430 m μ in Benzin ⁵⁰⁾

4) Reinigung und Charakterisierung der Anthocyanfraktion.

Der zur Isolierung der Polyfenfarbstoffe mit Benzol erschöpfte Zellrückstand des Sanddornbeersaftes wird auf dem Dampfbad im Vak. von restlichem Lösungsmittel befreit und das nun braune Material 6-mal mit je 300—500 ccm Wasser ausgekocht. Die leicht getrübbten grauvioletten Filtrate, deren letztes mit überschüss. Methanol keine nennenswerte Fällung mehr geben soll, versetzt man mit dem gleichen Vol. Methanol und zentrifugiert den dunklen

⁴⁷⁾ Nach R. Karrer, E. Lehmann, B. 64, 1349 (1931).

⁴⁸⁾ Vgl. R. Karrer, P. Karrer, E. KluBmann u. R. Meier, Helv. chim. Acta 15, 502 (1932).

⁴⁹⁾ Vgl. R. Karrer, B. 64, 1349 (1931).

⁵⁰⁾ Vgl. R. Karrer, B. 64, 1349 (1931).

Niederschlag ab: Nach mehrmaligem Waschen mit Methanol und Trocknen über Phosphorperoxyd 3.4 g schwarzviolett, körniges, anthocyanhaltiges Rohprodukt.

Den rohen Farbstoff haben wir in Anlehnung an die Reindarstellung des Paonins aus Pfingstrosenblüten³⁸⁾ mit 150 ccm warmem 2% chlorwasserstoffhaltigem Methanol behandelt, von harzigen Begleitern filtriert und den tief rotvioletten Auszug mit dem doppelten Vol. Äther gefällt. Das ausgeschiedene zähflüssige Öl wird bei mehrtägigem Stehen in einem Gemisch von 10 ccm Eisessig mit 15 ccm 2-proz. methylalkohol. Salzsäure zwar wieder körnig, läßt sich aber durch Auskochen mit methylalkohol. Salzsäure nicht weiter von krystallisationsverhindernden Begleitstoffen reinigen. Beim Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. hinterbleiben 640 mg eines violettroten, leicht hygroskopischen Stoffs. Siedende 0.5-proz. Salzsäure läßt die Hauptmenge ungelöst. Aus dem rotvioletten Filtrat scheiden sich 45 mg Anthocyanin in amorphen, trocken paprikaroten Flocken ab.

Biologische Prüfung: Mutanten der Grünalge Chlamydomonas, welche kein Picroerocin zu spalten vermögen, werden durch eine wäbr. Lösung des so gereinigten Anthocyanins hierzu ebenso veranlaßt wie durch nach R. Willstätter und T. J. Nolan³⁸⁾ aus Päonienblüten isoliertes, analysenreines, spezifisch wirkendes Päonin (Päonidin-diglucosid-(3.5)³⁹⁾.

Hydrolyse: Bei der Hydrolyse des gereinigten, amorphen Anthocyanins mit 20-proz. Salzsäure (3 Min., Siedetemp.) fällt das Aglucon in uneinheitlichen Krystallen aus. Diese geben die Reaktionen des Päonidins³⁸⁾,^{49a)}: Uncharakteristische, blaßgrünliche Verfärbung mit Eisen(III)-chlorid in wäbr. oder alkohol. Lösung (Fehlen zweier benachbarter Hydroxylgruppen). Leichte Löslichkeit in verd. Schwefelsäure; löslich in verd. Sodalösung mit zuerst violetter, dann blauer Farbe (Unterschied von Pelargonidin und Syringidin).

5) Bestimmung der Carotinoide in Sanddornbeeren.

Unverletzte frische Sanddornbeeren werden zur Neutralisation der Fruchtsäuren mit festem, wasserfreiem Kaliumcarbonat im Mörser zerrieben bis das pH 7 beträgt (0.35—0.50 g K_2CO_3 für 10 g Beeren). — 5 g der dann braunroten Masse erwärmt man im Wasserbad (65°, Stickstoff) mit 50 ccm absol. Alkohol, 30 ccm Benzol und 10 ccm warm bereiteter Kalilauge (10 g Kaliumhydroxyd auf 5 ccm Wasser). Zur erkaltenden Probe fügt man 100 ccm 50-proz. Alkohol und schüttelt mit je 100 ccm eines Benzin (Sdp. 70° bis 80°)-Benzol-Gemisches (10:1) erschöpfend aus, wozu 6—8 Auszüge erforderlich sind. Die vereinigten Extrakte werden 2-mal mit je 250 ccm Wasser, 1-mal mit 350 ccm 5-proz. Kalilauge und 3-mal mit je 350 ccm Wasser gewaschen und über wenig wasserfreiem Natriumsulfat im Faltenfilter getrocknet und filtriert. An das Natriumsulfat adsorbierten Farbstoff löst man mit einigen ccm Benzol ab und fügt dieses zur Hauptmenge. Der beim Eindampfen im Vak. (60° Badtemp., Stickstoff) hinterbliebene ölige Rückstand des Unverseifbaren wird in Benzin-Benzol (10:1) gelöst und im Meßkolben auf 25 ccm aufgefüllt.

a) Bestimmung von β -Carotin: 10 ccm Farbstofflösung werden auf eine mit trockenem Benzin (Sdp. 70—80°) bereitete Säule (1 × 10 cm) von Aluminiumoxyd (nach Brockmann, Merck) aufgegossen und das β -Carotin durch Nachwaschen mit Benzol-Benzin (2:1) quantitativ ins Filtrat getrieben. Die übrigen Carotinoide bleiben an der

^{38a)} G. M. Robinson u. R. Robinson, Biochemie Journ. 25, 1687 [1931].

³⁹⁾ Prüfung durch Hrn. Dr. F. Moewus; vgl. Fußnote 41.

Säule hängen. Den Abdampfdruckstand des Filtrats (Vak., 60° Badtemp.) füllt man mit Benzin (Sdp. 70–80°) im Meßkolben auf 10 ccm auf. Colorimetrie gegen den Azobenzolstandard im Hellfuge-Colorimeter nach R. Kuhn und H. Brockmann⁴⁵⁾ oder im Pulfrich-Photometer nach H. Willstaedt und H. Behrntz-Jensen⁵¹⁾. Gesamtfehler der Bestimmung 5–10%. Bei der Berechnung ist die Menge des zur Beerenprobe zugesetzten Kaliumcarbonats (als K₂O) zu berücksichtigen.

b) Bestimmung von Zeaxanthin und Kryptoxanthin: 10 ccm Farbstofflösung gießt man auf eine mit Benzin (Sdp. 70–80°) bereitete Säule (20 · 1 cm) von Calciumcarbonat (reinst, Merck; bei 150° getr.) und entwickelt mit trockenem Benzin bis das Filtrat farblos abläuft. An der Säule von oben nach unten: Braungelbe Doppelzone von Oxydationsprodukten; gelbrote Zeaxanthinschicht. Im Filtrat: Kryptoxanthin (Lycopin, γ -Carotin), β -Carotin.

Nach Zerschneiden der Säule werden die Zonen der Oxydationsprodukte (gemeinsam) und die Zeaxanthinschicht mit Methanol eluiert und die Filtrate zur Trockne verdampft (Vak., 60° Badtemp.). Man löst die Rückstände je in 15 ccm warmem Benzin (Sdp. 70–80°), zentrifugiert von geringen, ungefärbten Schwebstoffen ab und füllt beidmalmig im Meßkolben auf je 25 ccm auf. Colorimetrie gegen den Azobenzolstandard nach R. Kuhn und H. Brockmann⁴⁵⁾. Gesamtfehler der Bestimmung 15–20%. Die Menge der Oxykörper wird unter Zugrundelegung des Zeaxanthinfaktors berechnet. Bei der Auswertung ist die Menge des zur Beerenprobe zugefügten Kaliumcarbonats (als K₂O) zu berücksichtigen.

Das Filtrat der Calciumcarbonatsäule wird eingedampft (Vak., 60° Badtemp.), der Rückstand in 5–10 ccm trockenem Benzin (Sdp. 70–80°) aufgenommen und wie bei der β -Carotinbestimmung beschrieben (vergl. 5a) an Aluminiumoxyd chromatographiert. Ist das β -Carotin vollständig ins Filtrat gegangen, so saugt man gerade trocken und trennt die obere, braunrote Kryptoxanthinschicht von der rosafarbenen Lycopin- und γ -Carotinhaltigen Zone ab. Elution mit Benzol-Methanol (1:1). Nach Absaugen vom Adsorptionsmittel wird zur Trockne verdampft (Vak., 60° Badtemp.), in 15–20 ccm Benzin (Sdp. 70–80°) gelöst, zentrifugiert und das Kryptoxanthin im Meßkolben auf 20 oder 25 ccm aufgefüllt. Colorimetrie gegen den Azobenzolstandard⁴⁵⁾ unter Zugrundelegung des von R. Kuhn und C. Grundmann²⁰⁾ angegebenen Faktors. Gesamtfehler der Bestimmung 15–20%. Berechnung unter Berücksichtigung des den Beeren zugefügten Kaliumcarbonats (als K₂O).

6) Bestimmung der Carotinoide in Sanddornbeerdicksaft: 5 g gut durchgeschüttelter Saft (d_4^{20} 1.060) werden in einer Krystallisierschale über Phosphor-pentoxid im Vakuumexsiccator bei Zimmertemp. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (60.3 bis 60.7% Trockensubstanz). Die Extraktion der Farbstoffe geschieht in der von H.-J. Biel²¹⁾ für die Ermittlung des Carotingehaltes von Möhren beschriebenen Weise. Zur Extraktion benutzt man jedoch an Stelle von Benzin, in welchem Zeaxanthin nur wenig löslich ist, Benzin (Sdp. 70–80°)-Benzol (10:1). Aufgefüllt wird ebenfalls mit Benzin-Benzol (10:1), und zwar auf 50 ccm.

Den Gehalt an β -Carotin bestimmt man nach 5a (Auffüllen zur Messung auf 10 ccm), den an den übrigen Farbstoffen nach 5b: Zeaxanthin (Auffüllen auf 25 ccm), Kryptoxanthin (Auffüllen auf 20 oder 25 ccm), Lycopin (Auffüllen auf 5 ccm). Zur Messung des Lycopins benutzt man den 10-fach konz. Azobenzolstandard⁴⁵⁾. Gesamtfehler der Bestimmung für β -Carotin 5–10%, für Lycopin 20–25%, für die übrigen Farbstoffe 15–20%.

7) Bestimmung des Physaliens im Sanddornbeerdicksaft: 5 ccm Saft werden mit festem, trockenem Kaliumcarbonat auf pH 7 gebracht (Braunfärbung) und nach R. Kuhn und H.-J. Biel⁵²⁾ zur Zerlegung von Symplexen 3 Stdn. im Zentrifugenglas mit 5 ccm Handelszephärol (L. G. Farben) geschüttelt. Man zentrifugiert (10 Min., 1000 Umdrehungen), extrahiert die überstehende Lösung und den braunroten Rückstand

⁴⁵⁾ Ztschr. Vitaminforsch. 9, 8 (1939).

⁵²⁾ B. 73, 1080 (1940).

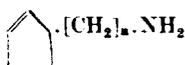
getrennt erschöpfend mit Benzol und dampft die vereinigten, gewaschenen und durch Filtrieren getrockneten Benzollösungen zur Trockne ein (Vak., 60° Badtemp.). Der in der ausreißenden Menge warmen Benzins gelöste Rückstand wird nach den Angaben von R. Kuhn und H. Brockmann⁴⁵⁾ gegen 90-proz. Methanol entmischt und das ins Methanol gegangene freie Zexanthin durch Wassereinsatz in Benzin übergeführt. Diese Benzinlösung engt man im Vak. (60° Badtemp.) ein und füllt mit Benzin auf 25 ccm im Meßkolben auf. Colorimetrie gegen Azobenzol⁴⁶⁾ als Zeaxanthin. Man zieht diese Menge von der nach 6) ermittelten Zeaxanthinmenge ab und rechnet den Rest auf Physalien⁴⁵⁾ um.

135. Ng. Ph. Buu-Hoï und Paul Cagniant: Über Aminoderivate des Chaulmoograöls.

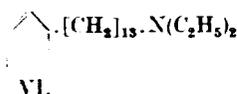
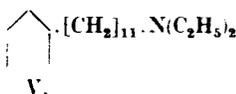
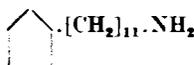
[Aus d. Organ.-chem. Laborat. d. École Polytechnique, Paris.]

(Eingegangen am 18. Juli 1944.)

Im Laufe ihrer Untersuchungen über die Pharmakologie einer Reihe von Abkömmlingen des Chaulmoograöls konnten R. Adams und seine Mitarbeiter¹⁾ zeigen, daß man bei dieser Körpergruppe die chemische Konstitution weitgehend verändern kann, ohne daß die durch Reagensglasversuche ermittelten „leprociden“ Eigenschaften dabei vollkommen verloren gehen. Das ist besonders der Fall beim *N,N*-Diäthyl-chaulmoogrylamin (VI), das diese Autoren durch Umsetzen von Chaulmoogrylbromid mit Diäthyl-



I: $n = 11$. II: $n = 13$.
III: $n = 12$.



amin hergestellt hatten. Das Molekulargewicht und die allgemeine Molekülstruktur scheinen also für die Entfaltung von „leprociden“ Eigenschaften wichtiger zu sein als die Natur der chemischen funktionellen Gruppen (Carboxyl- bzw. Säureestergruppe, u. a.). Auch die neueren Erkenntnisse unseres Arbeitskreises²⁾ sowie die Untersuchungen von Burschkies³⁾ über Abkömmlinge der vom Chaulmoograöl sich ableitenden Alkohole bestätigen diese Ansicht.

Trotz der günstigen Ergebnisse der Adamschen Reagensglasversuche liegen über die therapeutischen Wirkungen von Aminoderivaten des Chaulmoograöls noch keine Angaben vor. Rein präparativ-chemisch ist bisher eine kleine Anzahl von Vertretern dieser Körpergruppe in verschiedenen Abhandlungen beschrieben worden. Außer der Verbindung II bereiteten J. Sacks und R. Adams⁴⁾ das Chaulmoogrylamin mittels des Gabrielschen Phthalimidverfahrens. Später gewannen C. Naegeli und G. Stefanowitsch⁵⁾ das Homohydrocarypamin (III) durch Curtiussehen Abbau des Chaul-

¹⁾ Journ. Pharmacol. exp. Therapeut. **45**, 128 (1932).

²⁾ Siehe z. B. Naturwiss. **32** (1944), im Druck.

³⁾ B. **71**, 1855 [1938].

⁴⁾ Journ. Amer. Chem. Soc. **48**, 2395 (1926).

⁵⁾ Helv. chim. Acta **11**, 609 (1928).