

Zur Hydrolyse wurden 20.03 mg Pollenzucker (Parallelversuch: 19.96 mg Lactose-halbhydrat aus Milch) mit 2 ccm n H₂SO₄ im siedenden Wasserbad 3 Stdn. erhitzt und nach dem Erkalten auf 3 ccm gebracht:

Pollenzucker-Hydrolysat: $[\alpha]_D^{20} = (+0.48^0 \times 100) : (1 \times 0.668) = +72 \pm 2^0$

Milchzucker-Hydrolysat: $[\alpha]_D^{20} = (+0.46^0 \times 100) : (1 \times 0.665) = +69 \pm 2^0$.

Das mit Barytwasser genau neutralisierte Hydrolysat des Pollen-Zuckers diente noch zu folgenden Bestimmungen:

Reduktionsvermögen nach Willstätter-Schudel (Mikro): 0.533 mg Mono-saccharid-Gemisch (ber. aus der Einwaage an Disaccharid-halbhydrat) entspr. im Hypo-jodit-Verbrauch 0.525 mg Glucose.

Reduktionsvermögen nach Hagedorn-Jensen: 2.10 mg entspr. 2.10 mg Glucose.

Mikrovergärung⁶⁾: Der Pollenzucker war ebenso wie Lactose aus Milch durch die angewandte Bäcker-Hefe unvergärbar. Nach der Säurehydrolyse vergor in jedem Falle die Hälfte. Je 1 ccm Zucker-Lösung + 0.5 ccm Hefesuspension (2-proz., 2mal mit 1-proz. prim. Kaliumphosphat gewaschene Hefe) + 1 ccm 1-proz. prim. Kaliumphosphat unter Stickstoff bei 27.5^o im Warburg-Apparat (Endwerte):

Pollenzucker-Hydrolysat (1.67 mg Glucose + Galaktose) = 154 cmm CO₂

Milchzucker-Hydrolysat (1.66 mg Glucose + Galaktose) = 160 cmm CO₂.

Papierchromatographie nach Chargaff⁵⁾:

Glucose R_F = 0.425, Galaktose R_F = 0.36

Pollenzucker-Hydrolysat: R_F = 0.36 und R_F = 0.425

Milchzucker-Hydrolysat: R_F = 0.36 und R_F = 0.425.

86. Richard Kuhn und Irmentraut Löw: Über kristallisiertes Päonin aus der Chlamydomonas-Mutante Nr. 4.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 29. Juli 1949.)

Das Anthocyan der einzelligen Grünalge Chlamydomonas (Mutante Nr. 4) ist mit Päonin aus Pfingstrosen identisch.

Aus den Blütenblättern der Pfingstrose isolierten R. Willstätter und Th. J. Nolan¹⁾ ein Anthocyan, dem sie den Namen Päonin gaben. Es zerfiel bei der Hydrolyse in Päonidin (Cyanidin-3'-methyläther) und 2 Mol. Glucose. R. Robinson und A. R. Todd²⁾ haben durch Totalsynthese bewiesen, daß im Päonin das 3,5-Diglucosid des Päonidins vorliegt. Ein von F. Moewus und H. J. Bielig aufgefundener Test sprach dafür, daß in der Sanddornbeere Päonin oder ein verwandtes Glykosid des Päonidins vorkommt und es gelang H. J. Bielig³⁾, daraus das kristallisierte Aglykon (45 mg Päonidin aus 7 kg Sanddornbeeren) zu isolieren. Sonst scheint Päonin in der Natur noch nicht aufgefunden worden zu sein, während Cyanin bei höheren Pflanzen außerordentlich verbreitet ist. Über ein Vorkommen von Anthocyanen in Algen ist uns in der Literatur nichts begegnet.

⁶⁾ R. Kuhn u. I. Löw, B. 80, 406 [1947].

¹⁾ A. 408, 136 [1915].

²⁾ Journ. chem. Soc. London 1932, 2488.

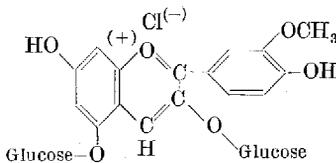
³⁾ Fiat Review, Bd. 39, Biochemie I, 97 [1947].

Bei den von F. Moewus isolierten Mutanten Nr. 3 und Nr. 4 der Grünalge *Chlamydomonas* hatten wir beobachtet⁴⁾, daß nach Vorextraktion des Chlorophylls mit Äther der Methanol-Auszug aus Nr. 3 (weibliches Klon) hellgelb gefärbt war, der Methanol-Auszug aus Nr. 4 (männliches Klon) dagegen dunkelrot. Über die Gewinnung von Isorhamnetin (Quercetin-3'-methyläther) aus der Mutante Nr. 3 haben wir inzwischen eingehend berichtet⁵⁾. Die Charakterisierung des von der Mutante Nr. 4 gebildeten Anthocyans soll hier erfolgen.

Vom salzsauren Methanol-Auszug der Alge bis zum kristallisierten Anthocyan war nur eine Reinigungsoperation erforderlich, nämlich eine Chromatographie. Für die Trennung von Cyanin und Päonin hatten P. Karrer und F. M. Strong⁶⁾ mit Leitungswasser aktiviertes Aluminiumoxyd verwendet. Wir benützten Aluminiumoxyd, das mit Essigsäure vorbehandelt war, d. h. eine „saure Säule“⁷⁾. Wenn man das Farbstoffgemisch aus Päonienblüten (Rohfällung, erhalten aus dem salzsauren Methanol-Auszug durch Versetzen mit Äther) in wäßriger Lösung durch eine solche „saure Säule“ schiebt, dann bleibt das Cyanin im obersten Teil als blauviolette Zone haften, und das Päonin läuft vorneweg ins Filtrat. Bei längerem Nachwaschen mit Wasser gehen auch Flavonolfarbstoffe ins Filtrat. Weitere Flavonole kann man mit verd. Essigsäure durchwaschen, das Cyanin schließlich mit verd. Salzsäure

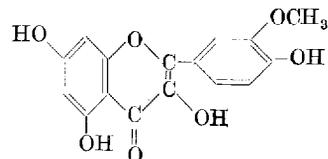
Die Chromatographie des Roh-Anthocyans aus der *Chlamydomonas*-Mutante Nr. 4 bot ein viel einheitlicheres Bild. Wir fanden weder Cyanin noch einen Flavonolfarbstoff. Aus dem mit etwas Salzsäure angesäuerten Filtrat kristallisierte nach dem Verdampfen unmittelbar Päonin aus.

Das aus heißer 0.5 *n* HCl umkristallisierte Anthocyan der Alge (53 mg) stimmte mit Päoninchlorid aus Pfingstrosen überein (Schmp. ~175°, unt. Zers., kurzes Therm., Kristallform, Debye-Scherrer-Aufnahmen, Papierchromatographie, Reduktionsvermögen der Zucker-Lösung nach saurer Hydrolyse, Identifizierung des in Freiheit gesetzten Zuckers als Glucose sowie des gebildeten Aglykons als Päonidin im Papierchromatogramm). Die Ausbeute betrug 0.3% vom Trockengewicht der Alge, während getrocknete Blütenblätter von Pfingstrosen 0.2-0.3% an Päoninchlorid lieferten.



Päoninchlorid

aus den männlichen Gameten
der Mutante Nr. 4 (0.3%)



Isorhamnetin

aus den weiblichen Gameten der
Mutante Nr. 3 (1.5%)

Hrn. Prof. Dr. P. Karrer danken wir sehr für die Überlassung eines Päonin-Präparates, das zum Vergleich diente.

⁴⁾ R. Kuhn u. I. Löw, *Naturwiss.* **34**, 374 [1947].

⁵⁾ R. Kuhn u. I. Löw, *B.* **81**, 363 [1948].

⁶⁾ *Helv. chim. Acta* **19**, 25 [1936].

⁷⁾ R. Kuhn u. Th. Wieland, *B.* **73**, 962 [1940]; Th. Wieland, *Ztschr. physiol. Chem.* **273**, 24 [1942]; F. Turba u. M. Richter, *B.* **75**, 340 [1942].

Beschreibung der Versuche.

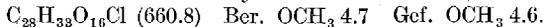
Extraktion: 17 g getrocknete Gameten der Mutante Nr. 4, die von F. Moewus auf Agar gezüchtet waren, wurden im Apparat mit trockenem Äther, der alles Chlorophyll aufnahm, erschöpfend extrahiert. Anschließend wurde zunächst mit 300 ccm und dann mit 100 ccm Methanol, das 2% HCl enthielt, über Nacht stehen gelassen. Die vereinigten tiefroten Auszüge versetzten wir mit 800 ccm trockenem Äther, wobei fast aller Farbstoff ausfiel. Das zähe Rohprodukt haben wir mit Äther gewaschen, in 50 ccm Wasser aufgenommen und vom Ungelösten abzentrifugiert.

Chromatographie: Diese wäßrige Lösung ließen wir durch eine Säule (10 cm lang, 1.5 cm Durchmesser) von Aluminiumoxyd Brockmann laufen, das mit Essigsäure vorbehandelt war⁸⁾.

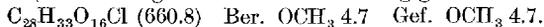
Im obersten Teil der Säule bildet sich eine violettblaue Zone; die Hauptmenge des Päonins geht mit violettstichig roter Farbe glatt ins Filtrat. Man wäscht mit Wasser nicht nur bis das Filtrat farblos kommt, sondern solange, bis das farblose Filtrat, das vermutlich Pseudobase enthält, beim Ansäuern mit Salzsäure nicht mehr rot wird. Die päoninhaltenen Filtrate wurden bei ganz schwach salzsaurer Reaktion i. Vak. (Badtemperatur 40°) unter Zugabe von etwas Octylalkohol trocken gedampft, wobei Krystallisation erfolgte.

Die violettblaue Zone wurde mit 1.5-proz. methanol. Salzsäure eluiert. Die Eisen(III)-chlorid-Reaktion ergab die Abwesenheit von Cyanin. Bei erneuter Chromatographie verhielt sich der Farbstoff der obersten Zone wie Päonin.

Krystallisation: Umkrystallisiert wurde aus 10 ccm heißer 0.5 *n* wäbr. HCl, aus der in der Kälte 37 mg Päoninchlorid in roten Nadelchen ausfielen. Die Mutterlauge wurde i. Vak. völlig verdampft und der Rückstand aus 2 ccm 0.5 *n* HCl umkrystallisiert. So erhielten wir weitere 16 mg rote Nadelchen, die erst mit wenig Wasser, dann reichlich mit Aceton gewaschen wurden. Zur Analyse haben wir bei 110°/5 Torr getrocknet.



Analyse eines aus Blütenblättern von Päonien in genau gleicher Weise dargestellten Vergleichspräparats (Ausb. 0.60 g Päoninchlorid aus 250 g getrockneten Blütenblättern):



Papierchromatographie: Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von Morpholin + Butanol + Wasser (1 : 2 : 1 Vol.) auf Filtrierpapier Nr. 819 von Macherey, Nagel & Co. Dieses Verfahren gestattet es, kleine Mengen von Cyanin und von Flavonolen in Päonin-Präparaten nachzuweisen. Das Präparat aus *Chlamydomonas* erwies sich dabei als einheitlich. Die Anthocyan-Flecken sind zunächst schwachblau; beim Trocknen der Papierstreifen an der Luft verschwinden sie völlig; beim „Räuchern“ der luftgetrockneten Papiere über konz. Salzsäure werden die Flecken leuchtend violettstichig rot. Päoninchlorid gibt scharfe runde Flecken, Cyaninchlorid wandert langsamer und gibt langgezogene Flecken. Gefunden wurde für

Päoninchlorid aus *Chlamydomonas* $R_F = 0.71$

Päoninchlorid aus Päonienblüten $R_F = 0.71$

Cyaninchlorid $R_F = 0.36$.

Nachweis und Bestimmung der Zucker-Reste: 5.21 mg Päoninchlorid aus *Chlamydomonas* wurden nach R. Willstätter und Th. J. Nolan¹⁾ 3 Min. mit 1.5 ccm 20-proz. Salzsäure gekocht. Nach dem Erkalten wurde das ausgefallene Päonidinchlorid 2mal mit je 2 ccm 20-proz. Salzsäure gewaschen und die Zucker-Lösung mit Wasser auf 10 ccm gebracht. Zum Vergleich wurden 5.18 mg Päoninchlorid aus Päonienblüten genau so hydrolysiert.

⁸⁾ Zur Vorbehandlung wird das Aluminiumoxyd mit etwa 2–3 Tln. Wasser aufgeschlämmt und mit soviel Essigsäure versetzt, daß Kongopapier deutlich gebläut wird. Hierauf wäscht man mit reichlich Wasser unter Dekantieren so oft (20–40 mal), bis die überstehende Flüssigkeit nur noch schwach milchig und gegen Lackmus nahezu neutral ist. Zur Erzielung einer guten Filtrationsgeschwindigkeit ist es wesentlich, daß die feinkörnigen Anteile des Aluminiumoxyds möglichst weitgehend entfernt werden. Man lasse daher bei jeder Waschung zwischen Anrühren und Dekantieren nicht länger als 2–3 Min. stehen.

Reduktionsvermögen nach Hagedorn-Jensen, ausgedrückt
in mg Glucose.

Hydrolysat	Päonin aus Chlamydomonas	Päonin aus Päonienblüten	ber.
1 ccm	0.26	0.27	0.24
2 ccm	0.48	0.48	0.48

Daß der reduzierende Zucker des Hydrolysats nur Glucose ist, zeigte sich bei der Papierchromatographie nach E. Chargaff. Es wurde nur 1 Fleck gefunden.

Zucker aus Chlamydomonas-Päonin	$R_F = 0.36$
Zucker aus Päonien-Päonin	$R_F = 0.36$
Glucose	$R_F = 0.36$

87. Günther Drefahl und Friedrich-Wilhelm Matschke*): Über die Monochloralglucosen und deren Uronsäuren.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Rostock.]

(Eingegangen am 20. Juni 1949.)

Die Einwirkung von Distickstofftetroxyd auf die Monochloral-Verbindungen der *d*-Glucose führt zur Bildung der γ -Lactone ihrer Uronsäuren. Hierdurch, sowie auf Grund einer weiteren Strukturuntersuchung, erweisen sich die Monochloralosen als „anomere“ Kohlenhydrate.

Die Kondensation von *d*-Glucose mit Chloral führt zu zwei Monochloral-Derivaten, die sich hinsichtlich ihrer chemischen und pharmakologischen Eigenschaften weitgehend unterscheiden. Die Verbindungen wurden von M. Hanriot¹⁾ als α -Chloralose und β -Chloralose bzw. Parachloralose bezeichnet. Für die Struktur dieser Verbindungen wurde durch A. White und R. M. Hixon²⁾ sowie W. Freudenberg und A. Vajda³⁾ die Formel einer 1.2-Trichloräthyliden-*d*-glucofuranose festgelegt, und die beiden Kohlenhydrate als α - und β -Derivate unterschieden. Ein Strukturbeweis wurde in allen Fällen jedoch nur für die β -Verbindung geführt. Die Annahme einer 1.2-Trichloräthyliden-Bindung bei beiden, nur durch α - und β -Stellung unterschiedenen Kohlenhydraten bedingt jedoch die Notwendigkeit, bei der einen Verbindung die Bildung eines Acetalringes über zwei benachbarten, trans-ständigen Oxygruppen eines Tetrahydrofuranringes anzunehmen. Diese ungewohnte Strukturordnung ließe sich durch Annahme einer 1.3-Bindung umgehen, da diese cis-ständige Oxygruppen umfassen würde.

Eine Klärung dieser Frage wurde nun von uns bei der Synthese der Uronsäuren beider Derivate erreicht. Frühere Oxydationsversuche hatten stets unter Abbau der Kohlenstoffkette zu Pentose-Derivaten, den sog. Xylochloral-

*) F.-W. Matschke, Dissertat. Rostock 1949. ¹⁾ Bull. Soc. chim. France [3] 9, 937 [1893]; 11, 37 [1894]. ²⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 55, 2438 [1933].

³⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 59, 1955 [1937].