

ERNST BAYER

Über den blauen Farbstoff der Kornblume, I

Natürliche und synthetische Anthocyan-Metallkomplexe

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe und dem Forschungs-Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof über Landau (Pfalz)

(Eingegangen am 12. März 1958)

Der cyaninhaltige blaue Farbstoff der Kornblume wurde isoliert und als Aluminium-Eisen-Komplex des Cyanins erkannt. Der nicht dialysierbare Komplex ist in saurem p_H -Bereich stabil. Die Variation der Blütenfarben wird allgemein auf Aluminium- und Eisenkomplexe zurückgeführt, da nur diese Verbindungen zwischen p_H 3.8–5.5, dem p_H der Blütenblätter, stabil sind. Die synthetisch zugänglichen Aluminium- und Eisenkomplexe des Cyanins stimmen in ihrer Farbintensität und p_H -Stabilität mit dem natürlichen Farbstoff überein und sind somit die künstlichen Modelle für den Farbstoff der Blüte.

Seit den grundlegenden Arbeiten über Anthocyane von WILLSTÄTTER und Mitarbb.¹⁾ scheint es zum gesicherten Bestand der organischen Chemie der Naturfarbstoffe zu gehören, daß die blauen, anthocyanhaltigen Blütenfarbstoffe Alkalisalze der roten Anthocyane darstellen. Bekannt ist das Beispiel der Kornblume und Rose. In beiden Blüten wird das gleiche Anthocyan, das Cyanin, aufgefunden. Aber in der Rose bewirkt das Cyanin eine rote Farbe, während die Kornblume blau ist. Analog der Vorstellung von WILLSTÄTTER¹⁾, die von P. KARRER und Mitarbb.²⁾ experimentell gestützt wurde, findet man allgemein in den Lehrbüchern der Organischen Chemie³⁻⁵⁾ und der Botanik⁶⁻⁸⁾ die Hypothese vertreten, daß in der Rose das rote Oxoniumsalz und in der Kornblume ein blaues Alkalisalz des Cyanins vorkomme.

Das Vorliegen von Alkalisalzen erfordert nun, daß in der Kornblume das Anthocyan in einem alkalischen Milieu gelöst ist, während das Oxoniumsalz in der Rose hingegen in saurem Bereich vorkommen sollte. Auf diese Tatsache haben schon R. ROBINSON und G. M. ROBINSON⁹⁾, sowie SHIBATA und Mitarbb.¹⁰⁾ hingewiesen und gezeigt, daß

1) R. WILLSTÄTTER und A. E. EVEREST, Liebigs Ann. Chem. **401**, 189 [1913].

2) P. KARRER, R. WIDMER, A. HELFENSTEIN, W. HÜRLIMAN, O. NIEVERGELT und P. MONSARRAT-THOMS, Helv. chim. Acta **10**, 742 [1927]; vgl. aber K. SHIBATA, K. HAYASHI und T. ISAKA, Acta phytochim. [Tokyo] **15**, 41 [1949].

3) L. F. FIESER und M. FIESER, Lehrbuch der Organ. Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1954, S. 960.

4) P. KARRER, Lehrbuch der Organ. Chemie, Verlag Georg Thieme, Leipzig, 12. Aufl. 1954, S. 550.

5) W. LANGENBECK, Lehrbuch der Organ. Chemie, Verlag Th. Steinkopff, Leipzig, 15. Aufl. 1955, S. 452.

6) H. FITTING, H. STERP, R. HARDER und F. FIRBAS, Lehrbuch der Botanik, Jena, 20. Aufl. 1939, S. 19.

7) K. WETZEL, Grundriß der allg. Botanik, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1940, S. 112.

8) W. MEVIUS, Miehes Taschenbuch der Botanik I; Georg Thieme, Leipzig, 14. Aufl. 1948, S. 46.

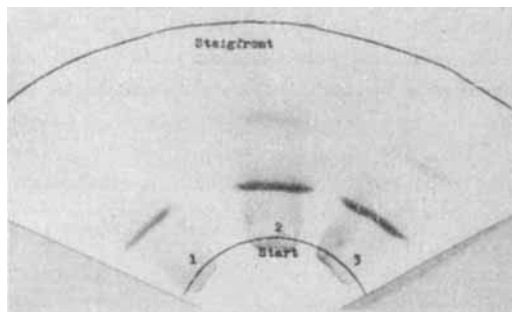
9) J. Amer. chem. Soc. **61**, 1065, 1607 [1939].

10) K. SHIBATA, Y. SHIBATA und I. KASHIWAGA, J. Amer. chem. Soc. **41**, 203 [1919]; K. SHIBATA, K. HAYASHI und T. ISAKA, Acta phytochim. [Tokyo] **25**, 17 [1949].

Blütenblätter schwach saures p_H zeigen, unabhängig von dem jeweiligen Farbton des Anthocyans. Diese Befunde veranlaßten ROBINSON⁹⁾ zu postulieren, daß in den blauen Blütenfarben noch eine Fixierung oder Stabilisierung durch eine unspezifische Bindung an Oberflächen bzw. Kopigmentierung bewirkt wird, während K. SHIBATA und K. HAYASHI¹¹⁾ annahmen, daß Erdalkaliverbindungen der Anthocyane für die blaue Farbe verantwortlich wären.

Diese unterschiedlichen Auffassungen und das gemeinsam mit WEGMANN¹²⁾ beobachtete, unterschiedliche Verhalten der roten und blauen Blütenfarbstoffe beim enzymatischen Abbau mittels Cyaninoxidase veranlaßten uns, das Problem der Variation der Blütenfarben von neuem aufzugreifen. Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Tatsache, daß Cyaninoxidase blaue, cyaninhaltige Blütenfarbstoffe nicht oder nur sehr langsam abbaut, während reines, präparativ aus Rosen gewonnenes Cyanin oder das Cyanin in Preßsäften von Rosenblättern sehr schnell von dem Enzym oxydiert wird.

Zunächst wurde an Hand umfangreichen Materials nachgeprüft, welches p_H die Preßsäfte von blauen bzw. roten Blüten zeigen. An einigen hundert verschiedenen Arten von Garten- und Feldblumen konnte, in Übereinstimmung mit SHIBATA¹⁰⁾, festgestellt werden, daß das p_H all dieser Blütenpreßsäfte zwischen 3.8 und 5.8 liegt. Zwischen blauen und roten Blüten besteht kein spezifischer Unterschied in der Wasserstoffionenkonzentration. So hat die Feldkornblume (*Centaurea cyanea*) ein p_H von 4.3, während eine gefüllte Gartenkornblume ein p_H von 4.8 zeigt. Bei den verschiedenen Rosensorten liegt das p_H zwischen 4.4 und 4.9. Aus diesen mittels der Glaselektrode (Beckman- p_H -Meter, Modell N) gemessenen p_H -Werten geht eindeutig hervor, daß weder ein Alkalisalz noch eine p_H -Differenz für den Unterschied zwischen „blauen und roten Anthocyanen“ in Kornblume und Rose verantwortlich sein können. Die Schwankungen im p_H bei den verschiedenen Entwicklungsstadien der Blüte bzw. den verschiedenen Sorten überwiegen bei weitem die Differenzen zwischen roten und blauen Blüten.



Abbild. 1

Rundfilterpapierchromatogramm des Anthocyans der Fuchsienblüten (Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043 bM, Lösungsmittel: Butanol/Essigsäure/Wasser).
1. Anthocyan des blauen Blütenblatts, 2. Anthocyan des roten Blütenblatts, 3. Gemisch beider Anthocyane

Ein sehr instruktives Beispiel stellen gewisse Fuchsien-Sorten dar. An diesen Blüten sind die oberen Blätter rot, die unteren tiefblau. Durch chromatographische Auftrennung der Anthocyane konnte eindeutig bewiesen werden, daß sowohl die blauen, als auch die roten Blütenblätter das gleiche Anthocyan enthalten (vgl. Abbild. 1). Es

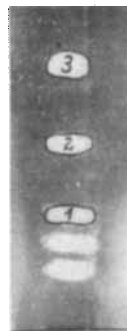
¹¹⁾ Proc. Japan Acad. **25**, 107 [1949]; Acta phytochim. [Tokyo] **15**, 219 [1949].

¹²⁾ E. BAYER und K. WEGMANN, Z. Naturforsch. **12 b**, 37 [1957].

handelt sich nach der chromatographischen Analyse um ein Cyanidin-glucosid. Die Fuchsie ist deshalb besonders interessant, weil sie das Beispiel der Rose und der Kornblume in einer Blüte vereinigt. Entsprechend unseren oben genannten Befunden, besitzen die Preßsäfte der blauen und roten Blütenblätter fast gleiches p_H , nämlich 4.7 bzw. 4.5. Die Acidität der Blütenblätter wird ganz allgemein durch das Vorkommen freier Äpfel- und Citronensäure bewirkt. Im Fall der Fuchsien findet sich außer diesen beiden noch eine weitere Säure, nach dem R_F -Wert Weinsäure, wie es das Papierchromatogramm in Abbild. 2 zeigt. Zwischen den verschiedenfarbigen Blütenblättern tritt kein Unterschied in der Säurezusammensetzung auf. Morphologisch sind die Anthocyane in den gleichen Zellteilen gelöst, so daß die unterschiedliche Farbe auch nicht auf Strukturbindung zurückgeführt werden kann.

Abbild. 2. Papierchromatogramm der Säuren aus Fuchsienblättern (Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043 bM, Lösungsmittel: Butanol/Ameisensäure/Wasser)

1 Weinsäure, 2 Citronensäure, 3 Äpfelsäure

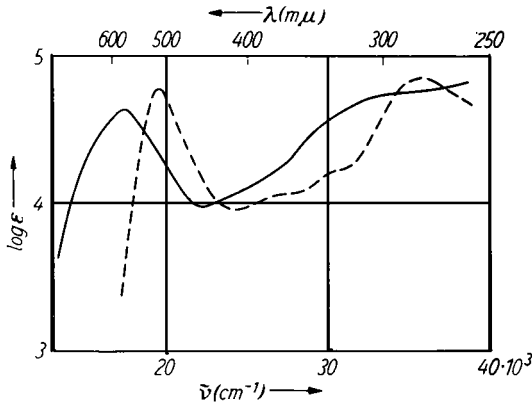


Der tiefblaue Preßsaft der cyaninhaltigen Blütenblätter ist bei der Fuchsie, wie auch bei allen anderen untersuchten Preßsäften blauer Blüten, im p_H -Bereich zwischen 3.8 und 6.0 sehr stabil. Diese Stabilität zeigt, daß es sich bei den blauen, cyaninhaltigen Pflanzenfarbstoffen nicht um Alkali- oder Erdalkalisalze handeln kann, die ja im schwach sauren Bereich nicht existenzfähig sind. Es müssen wohlcharakterisierte, das Anthocyan in einer definierten Bindungsart enthaltende Verbindungen sein. Die von den einzelnen roten Anthocyanen ableitbaren blauen Verbindungen, über deren Aufbau im folgenden berichtet werden soll, bezeichnen wir durch Voranstellung der Silbe „Proto-“ vor den jeweiligen Namen des darin enthaltenen Anthocyan. Der Farbstoff der Kornblume wird demgemäß Protocyanin genannt.

Behandelt man das Protocyanin in Preßsäften von Kornblumen mit Kationenaustauschern, so verschwindet die blaue Farbe, und es entsteht das rote Cyanin. Dies legt nahe, daß ein Kation am Aufbau maßgeblich beteiligt ist und es sich um Schwermetallkomplexe von Anthocyanen handelt, die in schwach saurem Bereich im Gegensatz zu den Alkali- und Erdalkalisalzen noch stabil sind. Mineralsäuren zerstören die blauen Blütenfarbstoffe wie auch die unten beschriebenen, synthetisch erhaltenen Schwermetallkomplexe von Anthocyanen unter Freilegung der roten Anthocyan-Oxoniumsalze. Diese Säureempfindlichkeit der blauen Verbindungen dürfte der wesentlichste Grund dafür sein, daß bei der üblicherweise mit verdünnter Mineralsäure durchgeführten Extraktion der Pflanzen immer nur die Oxoniumsalze erhalten worden sind, wodurch die Existenz der Protoanthocyane verborgen blieb.

Zur Isolierung des nativen Protocyanins werden die zerkleinerten Kornblumenblüten mit einer Presse ausgepreßt und die so erhaltenen, tintenblauen Lösungen vom p_H 4.6 mit Alkohol versetzt. Innerhalb kurzer Zeit setzen sich die blauen Flocken ab und werden von der nun farblosen Lösung abgetrennt. Die in dest. Wasser glatt lösliche blaue Verbindung wird noch mehrmals mit Alkohol ausgefällt und sodann zur Entfernung geringer Mengen Proteine mit Ammoniumsulfat versetzt.

Zur weiteren Reinigung hat uns eine sehr überraschende Entdeckung verholfen: Das Protocyanin bleibt bei der 36stdg. Dialyse gegen destilliertes Wasser im Dialysierschlauch zurück und erweist sich damit als eine Verbindung höheren Molekulargewichtes. Erst wenn die blauen Lösungen mit 0.1 *n* HCl angesäuert werden, dialysiert das entstandene Cyaninchlorid. Das Protocyanin ist nicht hitzelabil.

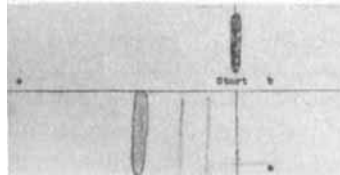


Abbild. 3. Lichtabsorptionsspektren von:
 — blauem Protocyanin aus Kornblumen in Acetatpuffer p_H 4.62;
 - - - reinem Cyaninchlorid in Salzsäure vom p_H 2.62.
 Beim Protocyanin wurde $\log \epsilon$ auf 1 Mol Cyanin bezogen (Cyaningehalt des Protocyanins 19.2%)

Das Lichtabsorptionsspektrum des blauen Protocyanins ist in Abbild. 3 im Vergleich zu rotem Cyanin aufgezeichnet. Bei der Papierelektrophorese wandert das Protocyanin in Acetatpuffer zur Anode. Auch dieser Befund spricht eindeutig gegen das Vorliegen von Alkali- oder Erdalkalisalzen. Denn in Acetatpuffer sind weder Alkali- noch Erdalkalisalze stabil. Es bildet sich aus diesen Salzen zwischen p_H 4–6 die neutrale Farb- oder die Pseudobase, welche elektrophoretisch nicht wandert, wie es Abbild. 4 veranschaulicht. Im Vergleich hierzu ist das Papierelektropherogramm

Abbild. 4

Papierelektropherogramme (mit dem Elphor) von Protocyanin (a) und reinem Cyanin (b) in Acetatpuffer p_H 4.45. Spannung: 110 V; Wanderungszeit: 6 Stdn.; Wanderungsgeschwindigkeit des Protocyanins: 0.7 cm/Stde.



des Protocyanins in Kornblumenpreßsäften abgebildet. Neben dem Protocyanin sind noch geringe Mengen zweier weiterer Proto-anthocyane zu erkennen.

In dem präparativ isolierten Protocyanin liegen nach der kolorimetrischen Cyaninbestimmung¹²⁾ 19.2% Cyanin vor, außerdem je 1 Äquivalent Eisen und Aluminium pro Mol Cyanin. Die spektralanalytische Untersuchung hat noch einen Gehalt geringer Mengen anderer Metalle ergeben, die jedoch weit unterhalb der für äquivalente Verhältnisse erforderlichen Konzentration liegen. Als komplexbildende Metalle kommen demgemäß nur Eisen und Aluminium in Frage.

Zu etwa 20% ist ein Aluminium-Eisen(III)-Cyaninkomplex am Aufbau des Protocyanins beteiligt. Die restlichen 80% stellt eine Trägersubstanz dar, ein Saccharid, mit dessen Analyse wir beschäftigt sind. Unser Protocyanin enthält noch 1.5% Stick-

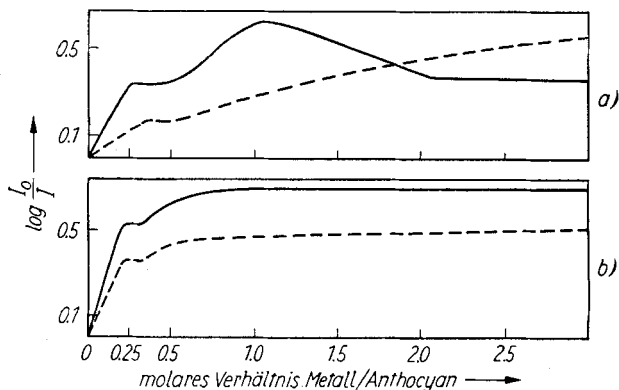
stoff. Ob dieser Stickstoffgehalt ein wesentlicher Bestandteil der höhermolekularen Trägersubstanz ist, oder von einer bisher nicht zu entfernenden, hartnäckigen Verunreinigung herrührt, bedarf noch einer weiteren Klärung.

Für den Gärtner dürfte die Erkenntnis, daß sich blaue Blütenfarben von Eisen- bzw. Aluminiumkomplexen des Cyanins ableiten, nicht sehr verwunderlich sein. Denn es sei hier erinnert, daß in der gärtnerischen Praxis rote Hortensien durch Begießen mit Aluminium- oder Eisenaunlösungen in blaue Blüten umgewandelt werden.

DIE KOMPLEXE BINDUNG VON SCHWERMETALLEN DURCH REINES CYANIN

Wenn nun Eisen- und Aluminiumkomplexe für die blauen Farben verantwortlich sind, sollten sich solche Verbindungen auch aus reinem Cyanin und den entsprechenden Metallsalzen herstellen lassen. Diese Verbindungen sollten in dem physiologischen p_{H} -Bereich der Blütenblätter, bei p_{H} 4–5, stabil sein und sowohl in ihren spektralen Eigenschaften als auch in dem Verhältnis Metall: Anthocyan mit den natürlichen blauen Farbstoffen übereinstimmen.

Es wurde daher das Komplexbildungsvermögen von Anthocyanen mit Schwermetallen allgemein untersucht und geprüft, ob Cyanin außer mit Aluminium und Eisen auch mit anderen Metallen stabile Komplexverbindungen auszubilden vermag.

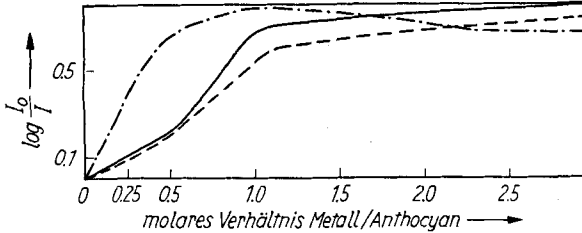


Abbild. 5. Veränderung der Extinktion von Cyanin (5a) und Cyanidin (5b) bei 590 $m\mu$ mit steigender Menge zugesetztem Aluminiumsulfat (— — —) oder Eisen(II)-sulfat (—) nach anschließender Luftsauerstoffoxydation.

Die gemessenen Lösungen ($d = 1$ cm) waren $5 \cdot 10^{-4}$ mol. an Cyanin bzw. $4 \cdot 10^{-5}$ mol. an Cyanidin in Acetatpuffer p_{H} 4.62. Die angegebenen Extinktionswerte wurden durch Differenzmessung gegen eine Lösung gleichen Cyaningehaltes bei p_{H} 4.62 erhalten

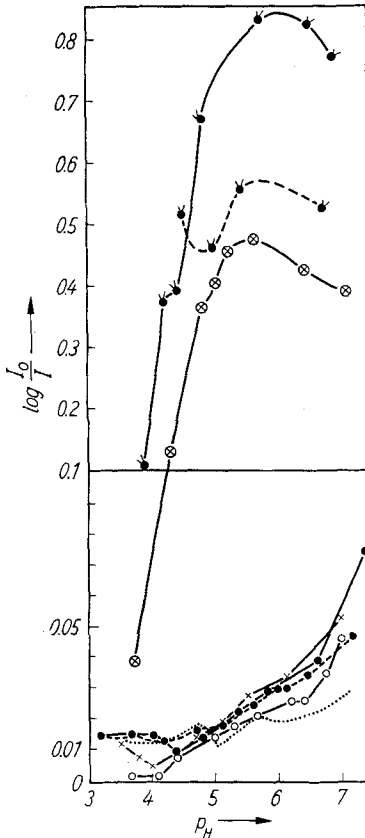
Nachdem schon die ersten Versuche ergeben hatten, daß Anthocyane mit einigen Metallen blaue Koordinationsverbindungen eingehen, wurde zunächst durch kontinuierliche Variation des Verhältnisses Anthocyan: Schwermetall und Extinktionsmessungen ermittelt, wieviel Moleküle Cyanin bzw. Cyanidin von einem Metallatom gebunden werden. Da sich Komplexe und reines Anthocyan in ihren Lichtabsorptionsmaxima im sichtbaren Bereich sehr stark unterscheiden (vgl. Abbild. 3), ist bei den molaren Verhältnissen, bei denen eine Komplexbildung erfolgt, überall ein Haltepunkt der Extinktion zu erwarten. Abbild. 5 zeigt, daß bei Aluminium und Eisen der

Einbau in Cyanin und Cyanidin stufenweise erfolgt und so verschiedene Typen von Komplexverbindungen erhalten werden können: z. B. ein Anthocyanmolekül je Metallatom oder drei Anthocyanmoleküle je Al bzw. Fe. Der letztere Typ wurde in dem natürlichen Protocyanin aufgefunden.



Abbild. 6. Veränderung der Extinktion von Cyanidin bei 590 $m\mu$ mit steigender Menge Uranyl- (---), Kobalt- (—) und Nickelacetat (---). Die methanol. Lösungen ($d = 1$ cm) wurden gegen eine methanol. Lösung gleichen Cyaningehaltes gemessen

Mit 2-wertigen Metallen bilden Cyanin und Cyanidin Verbindungen im molaren Verhältnis Metall : Anthocyan = 1:1 und 1:2. Es wurden Untersuchungen mit Kobalt, Nickel, Kupfer, Uran und Zink durchgeführt, die in Abbild. 6 wiedergegeben sind.



Alle genannten Metallkomplexe von synthetisch nach ROBINSON¹³⁾ gewonnenem Cyanidin und aus ROSEN nach WILLSTÄTTER¹⁴⁾ isoliertem Cyanin wurden auch präparativ gewonnen und sollen in einer späteren Mitteilung beschrieben werden.

Für das Problem der Variation der Blütenfarben blieb nun noch der Nachweis, daß die Eisen- und Aluminiumkomplexe zwischen p_H 4 und 5 stabil sind. Hierzu wurden die unmittelbar vor der Messung der Extinktion aus molaren Anteilen bereiteten Metallkomplexe in verschiedenen Puffern gelöst und aus dem

Abbild. 7. Stabilität verschiedener Schwermetallkomplexe und Metallsalze von Cyanin:

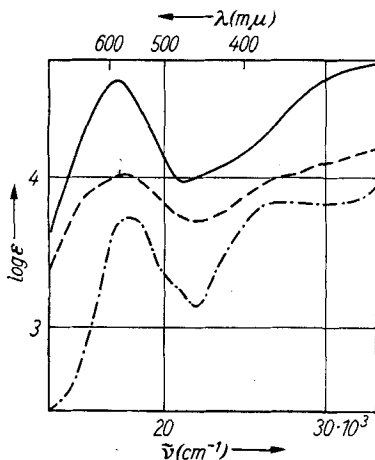
Al-(Cyanin)₃ ▼ — ▼ ; Fe(III)-(Cyanin)₃ ● — ● ;
UO₂-Cyanin ⊗ — ⊗ ; Ni-Cyanin × — × ;
Co-Cyanin ● — ● ; Ca-Cyanin ····· ;
Ba-Cyanin ● — ● ; Mg-Cyanin ○ — ○
Extinktionsmessung bei 590 $m\mu$ ($d = 1$ cm).

Die Metallverbindungen wurden durch Mischung der berechneten Mengen Metallsalz und Cyanin bereitete und die jeweiligen p_H -Werte durch Zufügen von Natronlauge eingestellt. Alle zur Messung gekommenen Lösungen sind $5 \cdot 10^{-4}$ mol. an Cyanin

¹³⁾ R. ROBINSON und R. ROBERTSON, J. chem. Soc. [London] 1928, 1526.

¹⁴⁾ R. WILLSTÄTTER und J. NOLAN, Liebigs Ann. Chem. 408, 1 [1915].

Verschwinden des charakteristischen Absorptionsmaximums des Komplexes die Stabilität bestimmt. In diese Untersuchungen wurden auch Erdalkalisalze einbezogen, da SHIBATA und HAYASHI¹¹⁾ ja angenommen hatten, daß Erdalkalikomplexe für blaue Blütenfarben verantwortlich wären. Aus Abbild. 7 ist zu entnehmen, daß weder Erdalkali-, noch Co- oder Ni-Komplexe des Cyanins im physiologischen p_H -Bereich der Blütenblätter beständig und farbintensiv sind. Lediglich die Uran-, die Eisen- und die Aluminium-Verbindung sind um p_H 4.5 stabil und sind in diesem Bereich um 2 Zehnerpotenzen farbintensiver als die anderen Schwermetallverbindungen. Es ist nach diesen Befunden nicht zu erwarten, daß außer Aluminium und Eisen noch die anderen untersuchten Metalle bei der Ausbildung der blauen Blütenfarben eine Rolle spielen, auch nicht die Erdkaliverbindungen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit unseren Befunden am Protocyanin.



Abbild. 8
Lichtabsorptionsspektren
von Protocyanin (—) sowie der Eisen (III)- (---) und Aluminium- (- · - ·) Komplexe des Cyanins

Die synthetisch hergestellten Koordinationsverbindungen reinen Cyanins mit Eisen und Aluminium stellen somit das mit dem natürlichen blauen Kornblumenfarbstoff am besten übereinstimmende Modell dar. Denn mit Ausnahme einer höhermolekularen Trägersubstanz stimmen synthetische Modelle und die natürliche Verbindung überein, wie dies auch der Vergleich der Lichtabsorptionsspektren zeigt. Der höhermolekulare Anteil aus Protocyanin hat jedoch auf die Farbeigenschaften im sichtbaren Spektralbereich keinen Einfluß. Die koordinative Bindung von Aluminium und Eisen an Cyanin erklärt somit die Variation der Blütenfarben bei Rosen und Kornblumen, ohne daß noch weitere Hilfsannahmen getroffen werden müssen. Auch andere, von uns untersuchte blaue Blütenfarbstoffe sind ebenfalls nicht dialysierbar.

Fräulein A. FINK möchte ich auch hier für die Durchführung der Experimente bestens danken. Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danke ich für die Gewährung von Sachbeihilfen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung von Protocyanin: 50 g frische Blütenblätter von Kornblumen werden unmittelbar nach der Ernte sauber abgepflückt und ausgelesen, so daß keine grünen Blätter oder Stiele in das Ausgangsmaterial gelangen. Mit einer Handpresse wird nun der Preßsaft hergestellt (etwa 10–12 ccm), welcher tintenblau ist und ein p_H von 4.6 aufweist. Zu dem zentrifugierten, klaren Preßsaft wird nun soviel Methanol zugefügt (etwa 150–300 ccm), bis eine Trübung das beginnende Ausfallen des blauen Farbstoffes anzeigt. Die Fällung wird durch Zugabe von 5–10 ccm Diäthyläther vervollständigt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur werden die ausgefallenen blauen Flocken von der nunmehr farblosen Lösung abfiltriert und im Exsikkator über Calciumchlorid (12 Torr) getrocknet. Diese Operationen von der Ernte bis zur Filtration müssen innerhalb eines Tages ausgeführt werden, da bei längerem Lagern, aber auch bei Gefriertrocknung der Blüten oder bei längerem Stehenlassen des Preßsaftes eine wesentlich schlechtere Ausbeute erhalten wird. Man kann zwar diese enzymatischen Oxydationen durch vorheriges Erhitzen der Blütenblätter unterbinden, erhält aber auch hierbei noch schlechtere Ausbeuten als bei der unmittelbaren Aufarbeitung. Aus den nach dem Auspressen noch blauen Blüten läßt sich durch Aufweichen in etwa 30 ccm Wasser und nachfolgendem Auspressen nochmals eine Fraktion Farbstoff gewinnen, die aber wesentlich mehr Begleitstoffe enthält.

Der 12 Stdn. über Calciumchlorid getrocknete Farbstoff wird in etwa 20 ccm Wasser gelöst und durch Zufügen von 200–400 ccm Methanol und 10–15 ccm Äther erneut ausgefällt und abfiltriert. Zur Abtrennung geringer Mengen Begleitproteine wird wiederum in 20 ccm Wasser aufgenommen, 4 g festes Ammoniumsulfat zugefügt und nach 4stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur von dem geringen Niederschlag abzentrifugiert. Die so erhaltene klare Lösung wird nun 24 Stdn. gegen mehrmals ausgewechseltes dest. Wasser dialysiert und danach erneut mit Methanol/Äther in der beschriebenen Weise der im Dialysierschlauch verbleibende Farbstoff ausgefällt.

Nach nochmaligem Auflösen in dest. Wasser, anschließender 12stdg. Dialyse gegen dest. Wasser und Ausfällen mit Methanol/Äther werden 90 mg blaues Protocyanin erhalten, welches zu den analytischen Untersuchungen bei 60° über P_2O_5 i. Vak. (12 Torr) getrocknet wird. Die Präparate sind auch bei mehrmonatigem Aufbewahren an Luft stabil.

Nach der kolorimetrischen Cyaninbestimmung¹²⁾ enthält dieses Präparat 19.2 % Cyanin.

Gef. Al kolorimetrisch 0.32 %, spektralanalytisch¹⁵⁾ 0.3 %

Gef. Fe kolorimetrisch 0.57 %, spektralanalytisch¹⁵⁾ 0.5 %

Ber. für je 1 Äquivalent Eisen und Aluminium je Cyanin: Fe 0.55 % Al 0.27 %

Gef. C 46.58 H 5.85 N 1.65 O 46.1¹⁵⁾

¹⁵⁾ Herrn Professor Dr. WURZSCHMITT von der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK, Ludwigshafen, danke ich sehr für die Durchführung der spektralanalytischen Metallbestimmungen und für die Sauerstoffanalyse.