

Vor Beginn einer Versuchsreihe wurde der Katalysator gründlich an der laufenden Hg-Pumpe ausgeheizt, in der Regel für etwa 48 Stdn. bei 350 bis 400°. Diese Behandlung wurde vor jedem neuen Versuch für einige Stunden wiederholt.

### 5. Ausgangsprodukte

Die reinen Gase Propin und Propadien wurden durch Hydrolyse des Magnesiumcarbids,  $Mg_2C_3$ , gewonnen<sup>12)</sup>. Mit Hilfe einer Podbielniak-Kolonnen konnte die Trennung so weit getrieben werden, daß die jeweils unerwünschte Komponente IR-spektroskopisch nicht mehr nachzuweisen war.

<sup>12)</sup> J. F. CORDES und K. WINTERSBERGER, Z. Naturforsch. 12b, 136 [1957].

ERNST BAYER

Über Anthocyan Komplexe, II

## Farbstoffe der roten, violetten und blauen Lupinenblüten

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe  
(Eingegangen am 29. Dezember 1958)

Die Farbstoffe der verschiedenfarbigen Blüten der Staudenlupine wurden isoliert und die Anthocyan Komponenten identifiziert. In den blauen Lupinen kommt ein nicht dialysierbarer Anthocyan Komplex mit Delphinidin-glykosid als Anthocyan Komponente vor. Die roten Lupinen enthalten Pelargonidin-glykoside, welche keine blauen Metallkomplexe im sauren Medium ausbilden. Violette Blüten enthalten Mischungen des blauen Anthocyan Komplexes und der Pelargonidin-glykoside. — Da Pelargonidin-glykoside keine Aluminium- und Eisenkomplexe im  $p_H$ -Bereich der Zellsäfte (4–6) bilden, wird verständlich, daß die nur Pelargonidinderivate enthaltenden Blüten nicht tiefblau sind.

In einer vorausgegangenen Mitteilung<sup>1)</sup> ist im Zusammenhang mit der Isolierung des Farbstoffes der blauen Kornblume die Komplexbildung des Cyanins mit verschiedenen Metallen untersucht worden. In Übereinstimmung mit Befunden am Farbstoff der Kornblume sind Aluminium- und Eisenionen als die Metallionen erkannt worden, welche im schwach sauren  $p_H$ -Bereich (3–7) stabile Komplexsalze ergeben.

Nach diesen Untersuchungen lag es nahe, die Unterschiede zwischen tiefblauen und roten Blüten ganz allgemein auf das Vorliegen von Metallkomplexen bei blauen Blüten zurückzuführen.

Ein hier interessierendes Wechselspiel zwischen blaßroten, violetten und blauen sowie dazwischen liegenden Farbtönen bieten die Blüten der *Staudenlupinen* (*Lupinus polyphemus*).

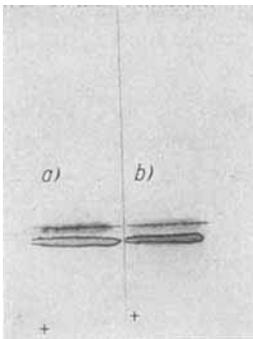
<sup>1)</sup> I. Mittel.: E. BAYER, Chem. Ber. 91, 1115 [1958].

## PROTOANTHOCYANE DER LUPINEN

In der im Versuchsteil dieser Arbeit beschriebenen Weise wurden die Preßsäfte aus den verschiedenen Varietäten der Lupinen gewonnen. Da am Beispiel der Kornblume dargelegt worden ist, daß verdünnte Mineralsäuren sowohl zu einer Abspaltung der Metallionen als auch evtl. vorhandener makromolekularer Trägersubstanzen, also zur Zerstörung des *nativen Protoanthocyan*s führen, wurden durchweg Preßsäfte als Ausgangsmaterial für die Untersuchung angewandt.

Die Preßsäfte wurden dialysiert, um festzustellen, ob auch bei Lupinen eine Bindung der Anthocyane an höhermolekulare Substanzen vorliegt. Hierbei traten die roten Preßsäfte aus roten Lupinen innerhalb von 30–60 Min. durch die permeable Membran des Dialysierschlauches (KALLE & Co) und entfärbten sich. Im Gegensatz hierzu blieb der Farbstoff der blauen Lupine im Schlauch zurück und schied sich nach sechsständiger Dialyse gegen öfter ausgewechseltes dest. Wasser als Niederschlag ab. Die Preßsäfte der violetten Lupinen wurden bei der Dialyse innerhalb einer Stunde blau und schieden nach weiterer Dialyse ebenfalls einen Niederschlag ab.

Der Farbstoff der roten Lupine ist demnach keine blaugefärbte Metallkomplexverbindung und ist auch nicht mit einer makromolekularen Trägersubstanz verknüpft. Es muß sich um das Oxoniumsalz eines Anthocyanans handeln. Die blauen Lupinen hingegen enthalten einen Anthocyankomplex höhermolekularen Aufbaus. Von einiger allgemeinerer Bedeutung für das Zustandekommen der violetten Blütenfarben erscheinen die Ergebnisse an den violetten Lupinen, in denen ein Gemisch eines roten *Anthocyan*s mit einem nicht dialysierbaren *blauen Anthocyankomplex* vorliegt. Dieser Anthocyankomplex läßt sich auch elektrophoretisch in blauen und violetten, nicht dagegen in roten Blüten nachweisen (vgl. Abbild. 1). Später wird noch gezeigt werden, daß in violetten Lupinen tatsächlich sowohl die Anthocyane der blauen als auch der roten Lupine vorkommen.



Abbild. 1  
Elektrophoretische  
Abtrennung von  
Protolupinin aus blauen (a)  
und violetten (b)  
Blüten (Elphor, 110 V;  
Laufzeit 6 Stdn. 20 Min.)  
in Acetatpuffer  $p_H = 4.62$

Es ist anzunehmen, daß diese Entstehung von violetten Farbtönen durch Mischung von blauen, höhermolekularen Anthocyankomplexen (Protoanthocyanen) und normalen roten Anthocyanansalzen in der Natur weiter verbreitet ist. Nachgewiesen haben wir dies z. B. auch für die violette, blaue und rosafarbige *Akelei* (*Aquilegia*)<sup>2)</sup>. Bei Dialyse des Preßsaffes der violetten *Akelei* färbt sich die Lösung im Dialysierschlauch

<sup>2)</sup> E. BAYER und A. FINK, unveröffentlicht.

ebenfalls innerhalb einer Stunde blau. Auch bei *Astern* (*Callistephus chinensis*) trifft Ähnliches zu <sup>2)</sup>.

Aus den Preßsäften von blauen Lupinen konnten 116 mg des äußerst stabilen blauen Farbstoffes durch Methanol/Äther-Fällung, Elektrophorese und Dialyse gewonnen werden. Die weitere Bearbeitung des Aufbaus dieser von uns als *Protolupinin* bezeichneten Verbindung soll jedoch in vorliegender Mitteilung nicht beschrieben werden. Hier soll vielmehr aufgezeigt werden, wie die Vorstellung des Vorliegens von Metallkoordinationsverbindungen, vornehmlich des Aluminiums und Eisens, mit Anthocyanen eine zwanglose Deutung der verschiedenen Farben der Lupinenblüten erlaubt, ohne daß noch weitere Hilfhypothesen angeführt werden müßten.

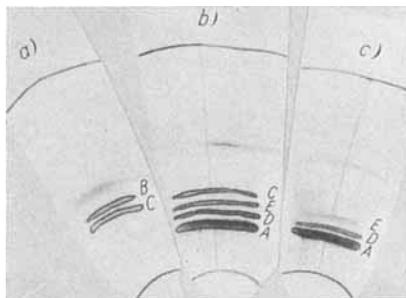
Das Vorliegen eines metallfreien roten Anthocyanosalzes in den roten Lupinen kann nun einmal dadurch erklärt werden, daß in den Blüten nicht genügend freie Al- bzw. Fe-Ionen zur Komplexbildung zur Verfügung stehen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß das Anthocyan der roten Lupinen überhaupt keine im schwach sauren Medium ( $p_H$  4.5–5.25) des Zellsaftes stabilen, blauen Al- bzw. Fe-Komplexe ausbilden kann.

Nach Bestimmung des Al- und Fe-Gehaltes (vgl. Versuchsteil) unterscheiden sich die verschiedenfarbigen Lupinenblüten nicht wesentlich in ihren kolorimetrisch ermittelten Al- bzw. Fe-Konzentrationen (0.2–0.27 % Fe bzw. 0.17–0.24 % Al), so daß man einen Mangel an komplexbildendem Metall ausscheiden darf. Es muß demnach eine Besonderheit in der Komplexbildung des Anthocyan der roten Lupinen vorliegen. Aus diesen Gründen wurden die Anthocyane genauer untersucht und identifiziert.

#### ANTHOCYANE DER VERSCHIEDENEN LUPINEN

Zur Erkennung der Anthocyane diente die Papierchromatographie, welche schon von E. C. BATE-SMITH und R. G. WESTALL<sup>3)</sup> für die Trennung der Pflanzenfarbstoffe vorgeschlagen worden ist. Scharfe Trennungen der Anthocyane werden besonders mit der im Versuchsteil beschriebenen Rundfiltermethode erzielt. Zur Freilegung der Anthocyane aus den Protoanthocyanen werden die Blüten mit kalter 0.2 n HCl ausgezogen.

Abbild. 2  
Ringchromatogramme der  
Anthocyane der roten (a),  
violetten (b) und  
blauen (c) Lupine.  
Bezifferung der  
Anthocyane A–E s. Tab. I.  
Bedingungen  
vgl. Versuchsteil



Die Anthocyane sowohl der blauen als auch der roten und violetten Lupinen erweisen sich hierbei nicht einheitlich, vielmehr lassen sich sechs verschiedene Anthocyane papierchromatographisch abtrennen (s. Abbild. 2). Die tieffarbigen, blauen und

<sup>3)</sup> Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 4, 427 [1950].

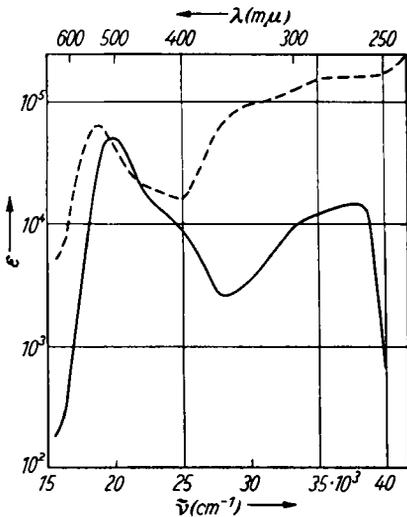
violetten Lupinen unterscheiden sich prinzipiell von den roten Lupinen durch ein beim  $R_F$ -Wert 0.19 liegendes Anthocyan A.

Andererseits enthalten die roten Lupinen ein mit dem  $R_F$ -Wert 0.39 laufendes Anthocyan B, welches den blauen und violetten Varietäten fehlt, und darüber hinaus einen Farbstoff C mit  $R_F$  0.35, welcher wohl noch in violetten, aber nicht mehr in blauen Blüten auftritt. Außer den genannten Farbstoffen finden sich noch zwei Anthocyane mit den  $R_F$ -Werten 0.24 (D) und 0.29 (E) vorwiegend in den violetten und blauen Arten (vgl. Tab. 1).

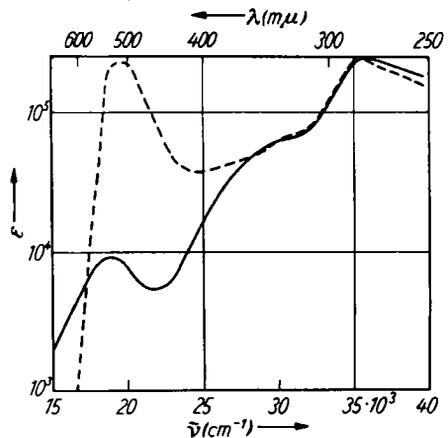
Tab. 1. Anthocyane der Lupinen

Anthocyan	$R_F$ -Wert in Butanol/ Eisessig/Wasser	rot	blau	violett
A Delphinidin-monoglucosid	0.19	—	+++	++
B Pelargonidin-monoglykosid	0.39	++	—	—
C Pelargonin	0.35	++	—	+
D Cyanidin-glykosid	0.24	—	++	+
E Unbekannt	0.29	—	—	+

Durch Elution der verschiedenen papierchromatographisch aufgetrennten Anthocyane und anschließende Messung der Spektren können an Hand der charakteristischen, in Abbild. 3 wiedergegebenen Lichtabsorptionskurven die Farbstoffe iden-



Abbild. 3. Lichtabsorptionsspektren von Pelargonin-chlorid (—) und dem Chlorid des Delphinidin-glykosides der blauen Lupine (-----) in 10-proz. Salzsäure



Abbild. 4. Lichtabsorptionsspektren von Cyanin-chlorid in wäßriger Salzsäure vom  $p_H$  2.62 (-----) und  $p_H$  4.93 (—)

tifiziert werden, und man erhält so außer den  $R_F$ -Werten ein weiteres charakteristisches Erkennungsmerkmal. Über den Einfluß der Konstitution auf die Lichtabsorptions-

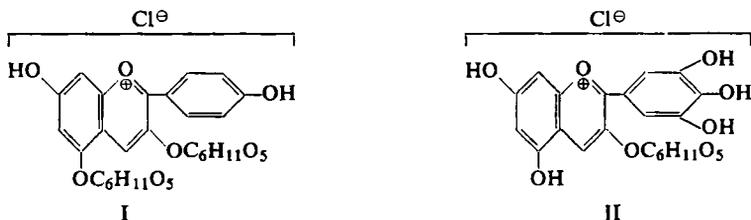
spektren von Benzopyryliumderivaten und besonders von Anthocyanen liegen umfangreiche Untersuchungen von K. HAYASHI<sup>4)</sup> vor. Bei der spektralphotometrischen Identifizierung von Benzopyryliumsalzen ist vor allem die starke Abhängigkeit des Verlaufs der Spektren von der Acidität des Mediums zu beachten, die K. HAYASHI<sup>4)</sup> nicht untersucht hat. In Abbild. 4 sind die Spektren von Cyanin bei verschiedenen Säuregraden aufgezeichnet. Die Spektren der zu vergleichenden Anthocyane wurden alle in 5 *n* HCl gemessen. Nach den *R<sub>F</sub>*-Werten und der Lichtabsorption sind die Haupt-Anthocyane der roten Lupine B und C Pelargonidin-glykoside (C = Pelargonin) und das Haupt-Anthocyan der blauen Lupine Delphinidin-glycosid. In der violetten Blüte liegen Mischungen der Anthocyane A und C, E (des Pelargonins und eines Delphinidin-glycosides) vor. Nach Hydrolyse mittels Salzsäure (vgl. Versuchsteil) konnten aus den Anthocyanen auch die entsprechenden Aglykone, das Pelargonidin und das Delphinidin, erhalten werden. Das Vorkommen der einzelnen Farbstoffe und Angaben über die kolorimetrisch bestimmten Konzentrationen an den einzelnen Anthocyanen in verschiedenfarbigen Blüten sind in Tab. 1 zusammengestellt. Es versteht sich, daß durch interspezifische Kreuzungen der Lupinen die Anthocyangehalte sowohl qualitativ als auch quantitativ variiert werden können und sich dadurch alle Farbabstufungen zwischen Rosa und Tiefblau erzeugen lassen.

Da sich Pelargonin und Delphinidin-glykosid, in ihrem langwelligen Lichtabsorptionsmaximum nur um 25  $\mu$  unterscheiden (vgl. Abbild. 3), kann der unterschiedliche Anthocyangehalt allein nicht den Unterschied zwischen roten und blauen Blüten erklären.

Wir haben deshalb das Metallbindungsvermögen des Pelargonins der roten Lupine und des Delphinidin-glycosides der blauen Lupine untersucht.

#### KOMPLEXBILDUNG VON PELARGONIDIN- UND DELPHINIDIN-GLYKOSIDEN

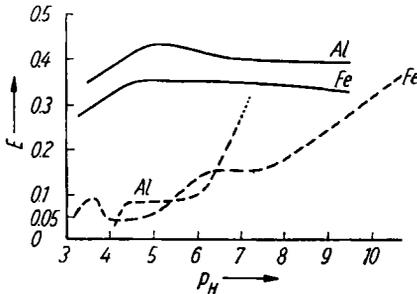
In der früher beschriebenen Weise<sup>1)</sup> haben wir die *p<sub>H</sub>*-Stabilität der Metallkomplexe des Pelargonins (I) und des Delphinidin-glycosides (II) der blauen Lupine be-



stimmt. Aus der Darstellung der *p<sub>H</sub>*-Stabilität in Abbild. 5 geht eindeutig hervor, daß Pelargonin mit Eisen und Aluminium im sauren Medium keine blauen Komplexe bildet. Das Delphinidin-glykosid vermag hingegen im *p<sub>H</sub>*-Bereich der Lupinenpreßsäfte (*p<sub>H</sub>* 4.8–5.3) tiefblaue Koordinationsverbindungen mit Fe<sup>III</sup> und Al einzugehen, die bis *p<sub>H</sub>* ~2 stabil sind.

<sup>4)</sup> Acta phytochim. [Tokyo] 7, 117, 143 [1933]; 8, 65 [1934]; 8, 179 [1935]; 9, 1 [1936]; vgl. C. 1933 II, 2008; 1934 I, 3470; 1935 I, 3271; 1935 II, 1857; 1937 I, 834.

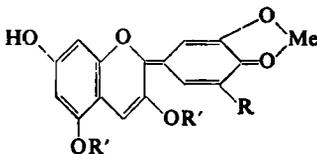
Somit lassen sich die bei Lupinenblüten auftretenden Farbphänomene erklären, wenn man annimmt, daß in dem nicht dialysierbaren, blauen Protolupinin ein Metallkomplex des daraus isolierbaren Delphinidin-glykosides vorliegt. In den roten Lupinen kann sich kein Metallkomplex ausbilden, da mit dem darin enthaltenen Pelargonin im sauren  $p_H$ -Bereich keine Metallkomplexe entstehen können. In den violetten Blüten liegen im wesentlichen rotes Pelargonin-Oxoniumsalz und blaues Protolupinin vor, die sich durch Dialyse trennen lassen.



Abbild. 5  
 $p_H$ -Stabilität der Al- und Fe-Komplexe von Pelargonin (-----) und Delphinidin-glykosid (—).  
Extinktionsmessung bei  $590 m\mu$   
(vgl. auch l. c.<sup>1)</sup> S. 1120)

Zur Ausbildung tieffarbiger Metallkomplexe sind nur diejenigen Anthocyane befähigt, die in dem in 2-Stellung an das Benzopyryliumgerüst gebundenen Phenyl in *o*-Stellung zur OH-Gruppe eine weitere zur Komplexbildung befähigte funktionelle Gruppierung aufweisen. Dies ist bei Cyanin und Delphinin<sup>5)</sup> der Fall, hingegen nicht beim Pelargonin. Ob Anthocyane mit Methoxylgruppen in *o*-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe (Päonin, Malvin) noch Metallkomplexe bilden können, bedarf weiterer Untersuchung.

Da Cyanin sich von Pelargonin nur durch ein weiteres Hydroxyl in 3-Stellung unterscheidet, ist gleichzeitig auch der Ort der Komplexbildung lokalisiert. Der Metallbindung an das Anthocyanmolekül wird demnach folgende Struktur gerecht:



Me =  $\frac{1}{3} Al^{3\oplus}$  bzw.  $\frac{1}{3} Fe^{3\oplus}$   
R' =  $C_6H_{11}O_5$   
Cyanin: R = H  
Delphinin: R = OH

Die Ausbildung der chinoiden Struktur erklärt die tiefblaue Farbe. HEILBRON<sup>6)</sup> hat eine solche chinoiden Struktur auch für die in alkalischem Medium auftretenden blauen Alkalisalze formuliert.

Aus diesen Untersuchungen über die Stabilität der Koordinationsverbindungen resultiert im übrigen ein reizvolles Postulat: Wenn die blauen Blütenfarben allgemein durch Metallkomplexe von Anthocyanen bedingt werden, sollten Blüten, die nur Pelargonidin-glykoside enthalten, keine dunkelblauen Farben aufweisen können. Der

<sup>5)</sup> Als Delphinin wird auch ein Alkaloid bezeichnet, vgl. z. B. W. SCHNEIDER, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 96, 470 [1957].

<sup>6)</sup> J. S. BUCK und J. M. HEILBRON, J. chem. Soc. [London] 121, 1203 [1922]; R. DICKINSON und J. M. HEILBRON, ebenda 127, 15 [1925].

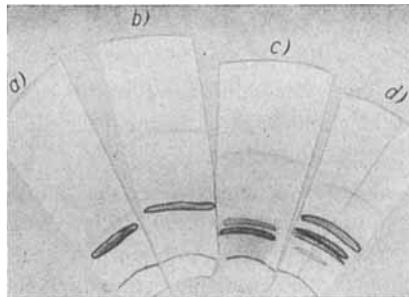
umgekehrte Schluß ist nicht zulässig, da zur Komplexbildung befähigte Anthocyane, wie es das Beispiel der Rose und Kornblume lehrt, einmal als blaue Komplexe, zum anderen als rote Anthocyanosalze vorliegen können. Letztere Erscheinung wird durch den Schwermetallstoffwechsel der Pflanze bedingt. Ein Anthocyan kann nur dann blaue Metallkomplexe bilden, wenn ihm die Pflanze genügend freie, nicht anderweitig gebundene Metallionen zur Verfügung stellen kann.

#### FARBEN VON PELARGONIDIN-GLYKOSIDE ENTHALTENDEN BLÜTEN

Neben der blauen Kornblume gibt es eine purpurröte Varietät von *Centaurea cyanea*, von der HADDERS und WEHMER<sup>7)</sup> angeben, daß sie Pelargonin enthalte. Nach unserer vorher entwickelten Vorstellung würde dieser Befund den Farbunterschied zwischen der cyaninhaltigen blauen und der roten Kornblume befriedigend deuten. Allerdings hat G. M. ROBINSON<sup>8)</sup> in einer später erschienenen Arbeit den Unterschied zwischen beiden Arten auf einen hohen Chlorogensäuregehalt in der roten Kornblume zurückgeführt, wodurch eine Kopigmentierung bewirkt würde. G. M. ROBINSON hat an dieser Stelle aber nichts über die unterschiedliche Natur der Farbstoffe berichtet. Durch Hydrolyse konnte Pelargonidin erhalten werden. Es erscheint somit nicht notwendig, eine Kopigmentierung anzunehmen. Das Papierchromatogramm eines salzsauren wäßrigen Extraktes aus roten Kornblumen ist in Abbild. 6b wiedergegeben. Das Pelargonidinderivat der Kornblume ist weder ein Pelargonidinmonoglykosid noch ein Pelargonidindiglykosid. Aus den allgemeinen Beziehungen zwischen  $R_F$ -Wert und Konstitution<sup>3,9)</sup> geht eindeutig hervor, daß im Pelargonidindiglykosid der roten Kornblume noch weitere hydrophile Gruppen vorhanden sind, vielleicht eine Bindung eines weiteren Zuckerrestes an eine Hydroxylgruppe.

Auch der rosafarbige *Rittersporn* (*Delphinium spec.*) enthält Pelargonidin-glykoside (vgl. Chromatogramm, Abbild. 6d), wie schon von P. WECKMEISTER<sup>10)</sup> festgestellt wurde. Auch hier erklärt sich der Farbunterschied zwischen dem blauen Rittersporn mit dem stark komplexbildenden Delphinin und dem roten Rittersporn mit den nicht zur Komplexbildung befähigten Pelargonidin-glykosiden im Sinne des aufgestellten Postulates.

Abbild. 6  
Ringchromatogramme der  
Anthocyane der blauen (a),  
roten (b) Kornblume,  
des blauen (c)  
und roten (d) Rittersporns.  
Chromatographie nach  
Beschreibung  
im Versuchsteil



<sup>7)</sup> M. HADDERS und C. WEHMER in G. KLEIN, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. III/2, S. 984, Julius Springer, Wien 1932.

<sup>8)</sup> J. Amer. chem. Soc. **61**, 1606 [1939].

<sup>9)</sup> R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN, Biochem. J. **38**, 224 [1944].

<sup>10)</sup> Der Züchter **24**, 224 [1954].

Als weitere von uns untersuchte Pflanzen seien genannt:

*Dahlia variabilis*, rote Varietät: Pelargonidin-glykoside; violette Art: Cyanidin-glykoside. *Pelargonium zonale*, rot: Pelargonin; blauviolett: Cyanin und Pelargonin. *Gladiolus spec.*, fuchsrot: Pelargonidin-glykoside; violettblau: Cyanin und Pelargonin.

An einigen Pflanzen ist somit sichergestellt, daß die blauen Farben durch Schwermetallkomplexe erklärt werden können und daß durch die Mischung von blauen Schwermetallkomplexen mit roten, nicht zur Komplexbildung befähigten Anthocyan-Oxoniumsalzen die Farbabstufungen zwischen Blau und Rot, wie sie uns in der Natur entgegentreten, in vitro erzeugt werden können.

Frl. A. FINK danke ich für ihre geschickte Hilfe bei den Experimenten. Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danke ich bestens für die Gewährung von Mitteln und dem FONDS DER CHEMIE für Unterstützung.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Aufarbeitung des Blütenmaterials zur Kennzeichnung der Protoanthocyane:* Zur Isolierung der Protoanthocyane (Protolupinin) werden frisch gepflückte Blütenblätter der Staudenlupine, welche von Stengeln und grünen Blatteilen vollkommen befreit sind, noch am gleichen Tag in einer Porzellankugelmühle zerkleinert. Berührung des Preßsaftes mit metallischen Geräten ist zu vermeiden, da diese durch die Komplexbildungstendenz der Anthocyane dann zu veränderten Metallgehalten in den isolierten Produkten führt. Den auf diese Weise erhaltenen Brei preßt man aus, wobei ebenfalls die Berührung mit Eisen-, Nickel- oder anderen Metallgeräten zu verhindern ist. Der blaue Preßsaft wird 10 Min. zentrifugiert (3000 U/Min.;  $r = 12$  cm). Die mit dem Beckman- $p_H$ -Meter (Modell N) gemessenen  $p_H$ -Werte der Preßsäfte verschiedenfarbiger Lupinen sind in Tab. 2 (S. 1071) zusammengestellt.

*Die Elektrophorese* (Elphor, Fa. Bender & Hobein) des Protolupinins wird mit 0.02 ccm Preßsaft in Acetatpuffer vom  $p_H$  4.62 bei 110 V (Papier Schleicher & Schüll 2043 bM gl) durchgeführt.

Zur *Dialyse* werden 10 ccm Preßsaft in einen Dialysierschlauch (Kalle & Co.) gegeben und gegen 5 l dest. Wasser, welches alle 5 Stdn. ausgewechselt wird, dialysiert. Die Farbstoffe der roten Lupine dialysieren innerhalb von 30–60 Min. quantitativ in die Außenlösung. Bei der blauen Lupine fällt nach etwa 6–10stdg. Dialyse ein blauer Niederschlag aus. Zur Isolierung des Protolupinins wird der Farbstoff zunächst mit Methanol/Äther ausgefällt und zur weiteren Reinigung der Elektrophorese und Dialyse unterworfen.

*Bestimmung des Anthocyangehaltes in den Blütenblättern:* Zur vollständigen Extraktion der Anthocyane werden zwischen 50 und 200 mg Blütenblätter in der Kälte mit 10 ccm 5 n HCl unter gelegentlichem Umschütteln 8 Stdn. behandelt, von der roten Lösung abgossen und nochmals mit 10 ccm 5 n HCl in der gleichen Weise extrahiert. Nach erneutem Abgießen wäscht man nochmals mit 2 ccm 5 n HCl nach und füllt die vereinigten Lösungen im Meßkolben auf 25 ccm auf. Die Extinktion dieser Lösungen bestimmt man bei 510  $m\mu$  (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II) und berechnet die Anthocyangehalte mittels der früher angegebenen Eichkurven<sup>11)</sup> in mg Cyanin. Die hieraus erhaltenen Anthocyangehalte der Tab. 2 sind auf das Trockengewicht bezogen, welches durch 12stdg. Trocknen des frischen Pflanzenmaterials bei 100° bestimmt wird. Bei der Extraktion mit Salzsäure werden aus den Anthocyan Komplexen die Anthocyane freigelegt. Die auf diese Weise ermittelten Anthocyangehalte lassen somit keinen Schluß auf die visuell beobachtete Tiefe der Blütenfarbe zu.

<sup>11)</sup> E. BAYER und K. WEGMANN, Z. Naturforsch. 12b, 37 [1957].

### *Bestimmung von Aluminium und Eisen*

**Aufschluß des Materials:** 0.05–0.2 g des auf Al und Fe zu untersuchenden Materials werden mit 3–6 ccm einer Mischung von 1 Vol.-Teil konz. Schwefelsäure und 1 Vol.-Teil konz. Salpetersäure in einem 50-ccm-Kjeldahl-Kolben übergossen und im Sandbad zur Trockne abgeraucht. Der Trockenrückstand wird aufeinanderfolgend 2mal mit je 5 ccm konz. Salzsäure aufgenommen und wiederum zur Trockne verdampft.

Den so gewonnenen Trockenrückstand löst man in 1 ccm konz. Salzsäure, trennt Eisen von Aluminium und bestimmt die Gehalte kolorimetrisch nach einer sich an die Methode von H. ZIMMERMANN<sup>12)</sup> anlehenden Vorschrift.

**Abtrennung des Eisens:** Die salzsaure Lösung wird mit dest. Wasser auf 60 ccm verdünnt, mit Ammoniak auf  $p_H$  0.4 eingestellt und auf genau 100 ccm aufgefüllt. Zu 20 ccm dieser Lösung fügt man in einem 30-ccm-Scheidetrichter 1 ccm 5-proz. Cupferronlösung, welche nicht älter als 3 Tage sein sollte. Zur Bildung der Komplexe läßt man mindestens 5 Min. stehen, schüttelt dann nach Zugabe von 5 ccm Chloroform den Eisen-Cupferron-Komplex aus und trennt die Phasen. Das Ausschütteln mit 5 ccm Chloroform wird noch 2mal wiederholt. Die vereinigten Chloroformlösungen dienen als Ausgangsmaterial für die Eisenbestimmung. In der wäßr. Lösung wird das Al bestimmt.

**Aluminiumbestimmung mit Alizarin-3-sulfonsaurem Natrium:** Die oben erhaltene wäßr. Lösung wird mit Ammoniak auf  $p_H$  7 gebracht und mit dest. Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Zu 10 ccm dieser Al-Lösung fügt man 1 ccm  $n/5$   $HClO_4$ , 1 ccm  $1 n$  NaOH, 2 ccm einer Lösung des Na-Salzes der Alizarin-3-sulfonsäure (0.1 g in 0.75-proz. wäßr. Essigsäure), 3 ccm Aceton und 1 ccm  $1 n$  Essigsäure. Nach 10 Min. wird die Extinktion bei  $490 m\mu$  (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II) in einer 1-ccm-Küvette gegen eine mit dest. Wasser und den gleichen Reagenzien gewonnene Vergleichslösung gemessen. An Hand von Eichkurven, die unter gleichen Bedingungen mit reinen Al-Lösungen gewonnen worden sind, lassen sich aus den erhaltenen Extinktionen die Al-Gehalte berechnen.

**Eisenbestimmung mit Sulfosalicylsäure:** Die Chloroformlösung wird zur Trockne gedampft, 3 ccm konz. Schwefelsäure/konz. Salpetersäure (1:1) zugefügt, im 10-ccm-Kjeldahl-Kolben abgeraucht, der Trockenrückstand in 10 ccm dest. Wasser aufgenommen, mit Ammoniak neutralisiert und auf 25 ccm aufgefüllt.

Zu 20 ccm dieser Lösung werden 2 ccm 20-proz. Sulfosalicylsäure, 2 ccm 25-proz. Ammoniaklösung und 1 ccm 10-proz. Ammoniumpersulfatlösung gegeben.

Innerhalb von 30 Min. bestimmt man die Extinktion bei  $430 m\mu$  und ermittelt aus den erhaltenen Werten mittels Eichkurven die in Tab. 2 angegebenen Fe-Gehalte.

### *Papierchromatographische Trennung der Anthocyane*

Scharfe Trennungen werden mittels der Rundfiltermethode erzielt<sup>13)</sup>. Zwischen 2 ebene Glasplatten ( $25 \times 25 \times 0.5$  cm) wird das gleichgroße Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 bM) gelegt. In der unteren Glasplatte befindet sich zentrisch eine Bohrung von 0.8 cm Durchmesser, durch welche der aus dem Chromatographiepapier geschnittene Docht ( $5 \times 0.5$  cm) in die direkt darunter gestellte Petri-Schale (10 cm Durchmesser) mit dem Lösungsmittel ragt. Als Lösungsmittel werden Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und Butanol/ $2 n$  HCl (1:1, organische Phase) benutzt. Wie aus Abbild. 2 zu ersehen ist, werden

<sup>12)</sup> Photometrische Metall- und Wasseranalysen, herausgegeben von der Fa. Zeiss, Oberkochen.

<sup>13)</sup> Vgl. F. CRAMER, Papierchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1958.

die zu untersuchenden Gemische etwa 2 cm vom Mittelpunkt des Papiers entfernt auf einer kreisförmigen Startlinie aufgetragen. 8 Chromatogramme finden auf einem Papier bequem Platz. Zur Freilegung der Anthocyane werden Blüten mit 0.2*n* HCl bzw. Protoanthocyane mit 0.1*n* HCl in der Kälte übergossen und die so erhaltenen Lösungen der Anthocyanosalze auf der Startlinie aufgetragen. Bei einer Laufstrecke von etwa 12 cm beträgt die Laufzeit etwa 20 Stdn. (Raumtemperatur). *R<sub>F</sub>*-Werte verschiedener Anthocyane in Butanol/Eisessig/Wasser: Delphinidin-diglucosid 0.14; Delphinidin-monoglucosid 0.19; Cyanidin-diglucosid 0.29; Pelargonidin-monoglykosid 0.39; Pelargonin 0.35.

Zur spektralphotometrischen Identifizierung werden die Papiersektoren mit den getrennten Anthocyanen ausgeschnitten, mit 2*n* HCl in der Kälte eluiert und die Lichtabsorptionsspektren gemessen (vgl. Abbild. 3).

Pelargonidinderivate sind gut erkenntlich, da sie sich durch Besprühen des Papiers mit 2-proz. methanol. Eisen(III)-chloridlösung nicht verfärben.

Cyanidinderivate werden hierbei blau, während Delphinidinderivate zunächst tiefblau werden und innerhalb 1 Stde. grau.

*Hydrolyse zum Aglykon:* Die salzsauren Extrakte aus Papierchromatogrammen bzw. aus Pflanzen direkt werden mit gleichen Volumina konz. Salzsäure versetzt; 3 Min. zum Sieden erhitzt und wieder abgekühlt. Die Aglykone fallen zum Teil aus und können in der bekannten Weise<sup>14)</sup> durch Kristallisation aus Salzsäure rein gewonnen werden. Sicherer ist in jedem Falle sowohl die Untersuchung des ausgefallenen, abzentrifugierten Niederschlages als auch der Lösung mittels der Rundfilter-Papierchromatographie. Die Chromatographie der Aglykone wird immer mit Butanol/2*n* HCl ausgeführt. *R<sub>F</sub>*-Werte: Pelargonidin 0.69; Cyanidin 0.45; Delphinidin 0.28.

Tab. 2. Anthocyanengehalte, *p<sub>H</sub>*-Werte und Al- sowie Fe-Gehalte der verschiedenfarbigen Lupinen

	blau	violett	rot
<i>p<sub>H</sub></i>	5.25	5.20	5.3
% Anthocyan	0.91	0.85	0.64
% Al	0.22	0.17	0.24
% Fe	0.25	0.19	0.27

<sup>14)</sup> Vgl. z. B. P. KARRER in G. KLEIN, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. III/2, S. 941, Julius Springer, Wien 1932.