

Torfmoosmembranochrome, 2¹⁾

Die Struktur des Sphagnorubins

Erich Vowinkel

Institut für Organische Chemie der Universität Kiel,
D-2300 Kiel, Olshausenstr. 40–60

Eingegangen am 3. Dezember 1973

Die Struktur des roten Torfmoosmembranochroms Sphagnorubin wurde aufgeklärt. Es ist die Anhydrobase eines Anthocyanidins mit einem für Flavonoide bislang unbekanntem 2-Phenylphenanthro[2,1-*b*]pyran-Ringgerüst.

Cell Wall Pigments of Peat Mosses, 2¹⁾

The Structure of Sphagnorubin

The structure of the red cell wall pigment sphagnorubin has been elucidated. It is the anhydro-base of an anthocyanidin with a 2-phenylphenanthro[2,1-*b*]pyran skeleton which is hitherto unknown for flavonoids.

Die zeitweilige Umfärbung einiger Torfmoosarten von Grün nach Rot ist auf Farbstoffe zurückzuführen, die nach stark absinkenden Nachttemperaturen²⁾ infolge von Stoffwechselstörungen gebildet werden. Im Gegensatz zu der sonst üblichen Speicherung der Pflanzenfarbstoffe im Zellsaft oder in Plastiden werden diese Pigmente in den Zellwänden abgelagert. Ihre Isolierung bereitet große Schwierigkeiten; sie sind sehr schlecht löslich und außerordentlich empfindlich.

Dadurch wurden die Arbeiten zur Aufklärung ihrer Konstitution erheblich erschwert und brachten bislang nur Teilerfolge. Aufgrund vergleichender Untersuchungen wurde eine enge Verwandtschaft zu den Anthocyanen angenommen^{3–7)}.

Weitergehende Schlüsse waren wahrscheinlich deshalb nicht möglich, weil es sich bei den untersuchten Farbstofffraktionen vermutlich um Gemische gehandelt hat. Nach unseren Ergebnissen werden nämlich bei der chromatographischen Auftrennung der Pigmente Farbstoffgemische erhalten, die nur unter diffizilen Bedingungen getrennt werden können.

1969 gelang es uns¹⁾, das Hauptpigment aus *Sphagnum magellanicum* – das Sphagnorubin – kristallin zu erhalten und seine Summenformel – $C_{23}H_{14}O_6$ – zu bestimmen.

¹⁾ 1. Mitteil.: H. Rudolph und E. Vowinkel, Z. Naturforsch. **24B**, 1211 (1969).

²⁾ H. Rudolph, Flora (Jena) **155**, 250 (1964).

³⁾ H. Paul, Mitt. kgl. Bayr. Mooskulturanst. H 2 (1908).

⁴⁾ J. Paton und P. J. Goodman, Trans. Brit. Bryolog. Soc. **2**, 561 (1955).

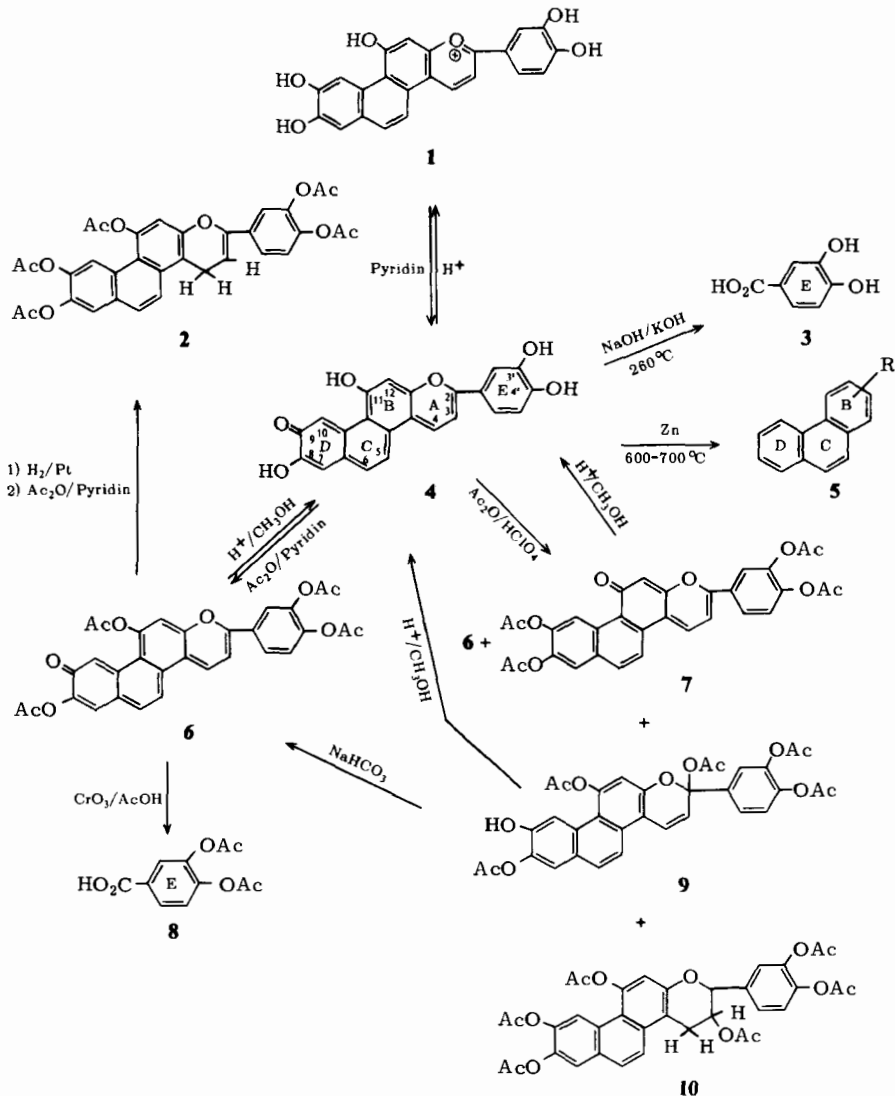
⁵⁾ G. Bendz, O. Mårtensson und L. Terenius, Acta Chem. Scand. **16**, 1183 (1962).

⁶⁾ G. Bendz, O. Mårtensson und E. Nilsson, Botaniska Notiser **120**, 344 (1967).

⁷⁾ E. Nilsson, Acta Chem. Scand. **21**, 1942 (1947).

Inzwischen haben wir die Struktur aufgeklärt⁸⁾: es handelt sich nach unseren Befunden um das 8,11-Dihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-9*H*-phenanthro[2,1-*b*]pyran-9-on (4).

Im folgenden wird über diese Untersuchungen berichtet.



Ermittlung der funktionellen Gruppen

Im IR-Spektrum des Sphagnorubins tritt zwischen 3700 und 2600 cm^{-1} eine breite Bande auf, die auf mehrere assoziierte Hydroxygruppen hindeutet. Diese sind mit Acetanhydrid in Pyridin sämtlich acylierbar. Die resultierenden roten Kristalle (Schmp.

⁸⁾ Vorgetragen auf der Chemiedozenten-Tagung 1969 in Karlsruhe.

263 – 266 °C) zeigen im Massenspektrum den Molekülpeak bei m/e 554; sie fragmentieren unter 4maliger Abspaltung von Keten und gehen dabei in das Ion des Sphagnorubins (m/e 386; Basispeak) über. Bei der Acetylierung in Pyridin wird also ein Tetraacetat (**6**) gebildet, dessen Acetylgruppen im NMR-Spektrum als 4 schwach aufgelöste Signale zwischen $\delta = 2.40$ und 2.43 auftreten. Im NMR-Spektrum des Sphagnorubins (in DMSO) erscheinen die entsprechenden 4 Hydroxygruppen als 4 separate Signale bei $\delta = 9.46$, 9.62, 9.78 und 9.92 (Abb. 4).

Von den zwei weiteren Sauerstoffatomen liegt eines in einer Carbonylgruppe vor. Diese ist, wie aus der Lage (1626 cm^{-1}) und Breite ihrer Bande im IR-Spektrum hervorgeht, cheliiert; wird die intramolekulare Wasserstoffbrücke wie im roten Tetraacetat (**6**) aufgehoben, erscheint sie scharf ausgeprägt bei größerer Wellenzahl (1642 cm^{-1}).

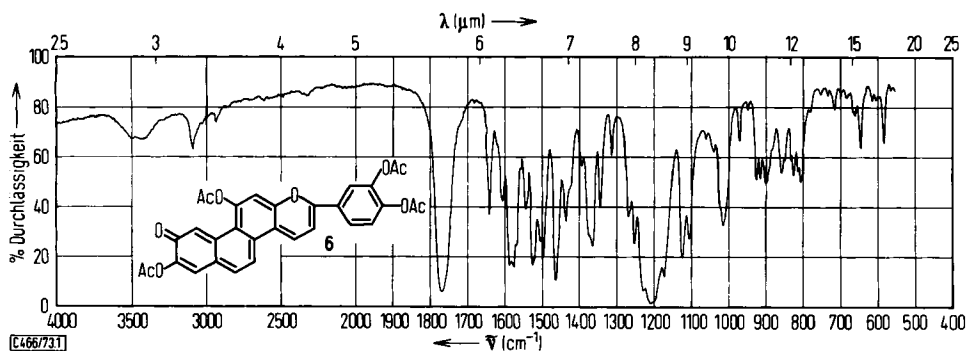


Abb. 1. IR-Spektrum des roten Tetraacetats **6** in KBr

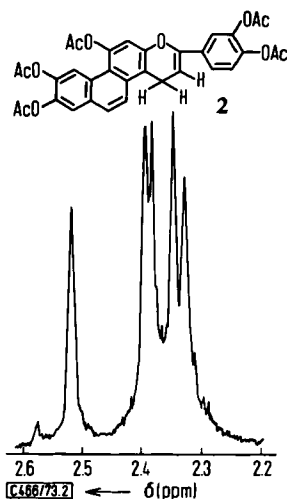


Abb. 2. Ausschnitt aus dem NMR-Spektrum des Dihydropentaacetats **2** in CDCl_3

Der chemische Nachweis der Carbonylgruppe erfolgt durch eine reduktive Acetylierung. Dazu wird das rote Tetraacetat zunächst über Platin hydriert, bis die rote Farbe verschwunden ist, und nach Abtrennen des Katalysators sofort mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$ umgesetzt. Bei der schichtchromatographischen Auftrennung an Kieselgel werden aus der ersten, im UV-Licht blau fluoreszierenden Zone zartrosa Plättchen isoliert, die bei $238 - 240^\circ\text{C}$ schmelzen und für die massenspektroskopisch die Summenformel $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$ ermittelt wird.

Das Massenspektrum zeigt eine stufenweise 5 malige Abspaltung von Keten. Im Zusammenhang mit der Summenformel geht daraus hervor, daß bei der reduktiven Acetylierung ein Dihydropentaacetat (2) gebildet wird. Bei der gegenüber dem roten Tetraacetat (6) neu hinzugekommenen fünften Acetoxygruppe handelt es sich – wie auch das NMR- ($\delta = 2.52, 2.40, 2.38, 2.35, 2.33$, Abb. 2) und das IR-Spektrum (1764 und 1753 cm^{-1}) zeigen – ebenfalls um eine Phenolacetatgruppierung; die Carbonylgruppe wird also bei der Reduktion in eine phenolische Hydroxygruppe übergeführt. Im Sphagnorubin muß dementsprechend eine Chinonmethidgruppierung vorhanden sein.

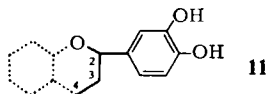
Die sechste Sauerstoff-Funktion kann nicht in die Derivatbildung einbezogen werden; sie liegt in einer Ätherbindung vor. Darauf deutet u. a. das UV-Spektrum des Sphagnorubins¹⁾ hin, das im Kurvenverlauf dem des Cyanidins sehr ähnlich ist⁹⁻¹¹⁾.

Die C – C-Verknüpfung

Die aufgrund der spektroskopischen Befunde angenommene Flavonoidstruktur des Sphagnorubins bildet den Ausgangspunkt für die Ermittlung der C – C-Verknüpfung. Mit 9 mg Farbstoff wird zunächst der bei der Aufklärung von Anthocyanidinen häufig benutzte Alkaliabbau¹²⁾ durchgeführt. Nach der papierchromatographischen Auftrennung werden bei der fraktionierten Kristallisation aus Essigester/n-Hexan als Abbauprodukt 0.2 mg Protocatechusäure (3) isoliert, die in ihren spektroskopischen und chromatographischen Eigenschaften mit authentischem Material übereinstimmt.

Da eine Estergruppierung in dem Membranochrom nach den spektroskopischen Befunden ausgeschlossen werden kann, ist 3 das Abbauprodukt eines Flavonoids. Damit wird gleichzeitig die Ätherfunktion des sechsten Sauerstoffatoms bestätigt.

Das bei der Alkalischmelze von Flavylumverbindungen gebildete Carbonsäurebruchstück, das aus dem 2-ständigen Benzolkern und dem C-Atom 2 entsteht, läßt auf eine $\text{C}_6 - \text{C}_3$ -Einheit schließen¹³⁾; entsprechend kann der Protocatechusäure bei einem analogen Zerfall des Sphagnorubins ein Phenylpropanbaustein (11) zugrunde gelegt werden.



⁹⁾ H. Rudolph, Ber. Deut. Bot. Ges. **76**, 72 (1963).

¹⁰⁾ H. Rudolph, Planta **64**, 178 (1965).

¹¹⁾ E. Nilsson, Acta Chem. Scand. **21**, 1942 (1967).

¹²⁾ R. Willstätter und H. Mallison, Liebigs Ann. Chem. **408**, 40 (1915); H. Grisebach, Z. Naturforsch. **13B**, 335 (1958).

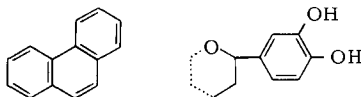
¹³⁾ K. Hayashi in The Chemistry of Flavonoid Compounds, S. 260, Pergamon Press, Oxford 1958.

Unter Berücksichtigung dieser Phenylpropan-Einheit bleiben für das zweite Bruchstück des Sphagnorubins noch 14 Kohlenstoffatome, deren Verknüpfungsmöglichkeiten aufgrund des C:H-Verhältnisses und des Fehlens aliphatischer Protonensignale im NMR-Spektrum auf aromatische Systeme beschränkt werden können. Welcher Grundkörper vorliegt, wird mit Hilfe einer Zinkstaubdestillation aus 10 mg Sphagnorubin ermittelt. Bei 600–700 C sublimiert im Wasserstoffstrom ein gelbliches Produkt, aus dem durch mehrmalige Schichtchromatographie an Kieselgel eine geringe Menge einer im UV-Licht blau fluoreszierenden Substanz abgetrennt werden kann. Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigt einen Kurvenverlauf, der weitgehend mit dem des Phenanthrens übereinstimmt. Die kurzwelligen Maxima bei 246 und 252 nm sowie 275, 282 und 294 nm haben nahezu die gleiche Lage. Die dritte langwellige Bandengruppe (354, 346, 338, 330 und 322 nm) ist um 6–8 nm bathochrom verschoben und deutet somit auf ein Gemisch von Alkylphenanthrenderivaten (**5**) hin.

Diese Annahme wird durch das Massenspektrum gestützt, in dem der Basispeak bei m/e 178 dem Molekülion des Phenanthrens und die Spitzen bei m/e 192 und 206 höheren Homologen zuzuordnen sind.

Für das Phenanthrengerüst spricht auch das UV-Spektrum des Dihydropentaacetats (**2**), das die charakteristischen Bandengruppen des Phenanthrens besitzt. Lediglich die Maxima sind bathochrom verschoben, und die Schwingungseinstruktur der langwelligen Bandengruppe ist weniger ausgeprägt, was aufgrund der Substituenten auch zu erwarten ist¹⁴). Wie das Spektrum zeigt, wird der Phenanthrenbaustein bei der Hydrierung nicht angegriffen.

Das Kohlenstoffgerüst des Sphagnorubins besteht damit aus einem Phenylpropanteil (C_9) und einem Phenanthrenteil (C_{14}), die entsprechend der Flavonoidstruktur des Membranochroms über eine C–C-Bindung und eine Sauerstoffbrücke miteinander verknüpft sind.



12

Die Konstitution des Phenylpropanbausteins

Wie aus dem Abbauprodukt **3** hervorgeht, befinden sich im Ring des Phenylpropanteils in 3- und 4-Stellung Hydroxygruppen. Diese Substitution wird durch den Chromsäureabbau des roten Tetraacetats bestätigt, bei dem u. a. Protocatechusäure-diacetat (**8**) isoliert wird.

Die Substitution im C_3 -Teil kann mit Hilfe des Dihydropentaacetats **2** festgelegt werden. Während im NMR-Spektrum des Sphagnorubins nur Signale von aromatischen und Hydroxyprotonen auftreten, findet man in dem des Dihydropentaacetats **2** Signale für Benzyl- ($\delta = 3.87$ (d, $J = 3.5$ Hz, 2H)) und Vinylprotonen ($\delta = 5.68$ (t, $J = 3.5$ Hz; 1H)), die – wie Entkopplungsversuche zeigen – benachbart sind.

¹⁴) H. Brockmann und G. Budde, Chem. Ber. **86**, 432 (1953).

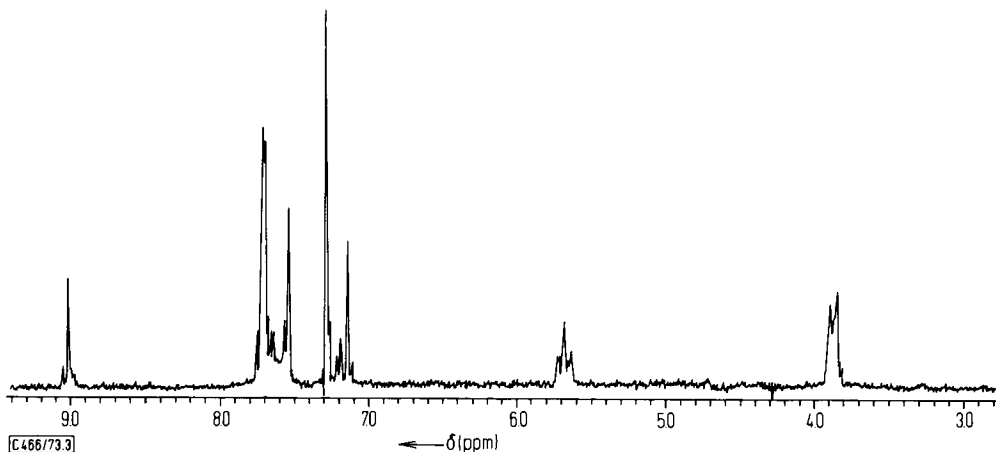
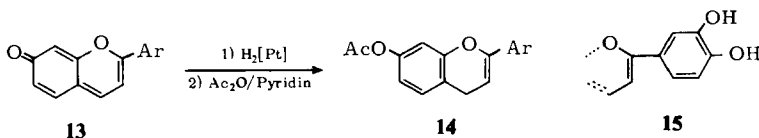


Abb. 3. Ausschnitt aus dem NMR-Spektrum des Dihydropentaacetats (2), ca. 0.5 proz. in CDCl_3 (Signal bei δ 7.28 CHCl_3)

Intensität und Aufspaltung dieser Signale deuten ebenso wie die Überführung der Carbonylgruppe in eine phenolische Hydroxygruppe darauf hin, daß hier eine chinoide Anhydrobase (13) zu einer Flaven-2-Verbindung (14) reduziert wurde¹⁵⁾.



Aus der Aufspaltung der Signale ergibt sich gleichzeitig, daß im C_3 -Teil des Phenylpropan-Bausteins mit Ausnahme des Äthersauerstoffs am C-2 keine weitere C–O-Bindung vorhanden ist. Darüber hinaus können mit der Lokalisierung des Phenylrestes an C-2 Verbindungen vom Iso- bzw. Neoflavonoid-Typ ausgeschlossen werden.

Für den C_9 -Teil ergibt sich damit die Partialstruktur 15.

Die Verknüpfung zwischen dem Phenylpropan- und Phenanthrenteil

Für die Verknüpfung des C_{14} -Teils mit dem C_9 -Teil über die Ätherbrücke (O-1) und das C-4 gibt es 7 Möglichkeiten: 16–22.

Vier dieser Ringgerüste können aufgrund des NMR-Spektrums des Sphagnorubins (Abb. 4) ausgeschlossen werden.

Man findet nämlich drei Signale für aromatische Protonen bei sehr tiefem Feld ($\delta = 9.70$, s; 8.55, d, $J = 9$ Hz; 8.13, d, $J = 9$ Hz), die außerhalb des typischen C–H-Bereiches phenolischer Verbindungen liegen und bei D_2O -Zugabe nicht verschwinden. Diese Signale müssen von nach innen gerichteten Protonen eines angular kondensierten Kohlenwasser-

¹⁵⁾ Das gilt entsprechend für Verbindungen, bei denen die Carbonylgruppe in einem anderen Ring des Phenanthrenteils liegt.

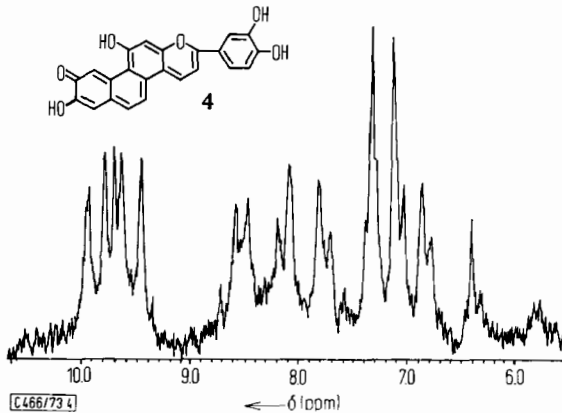
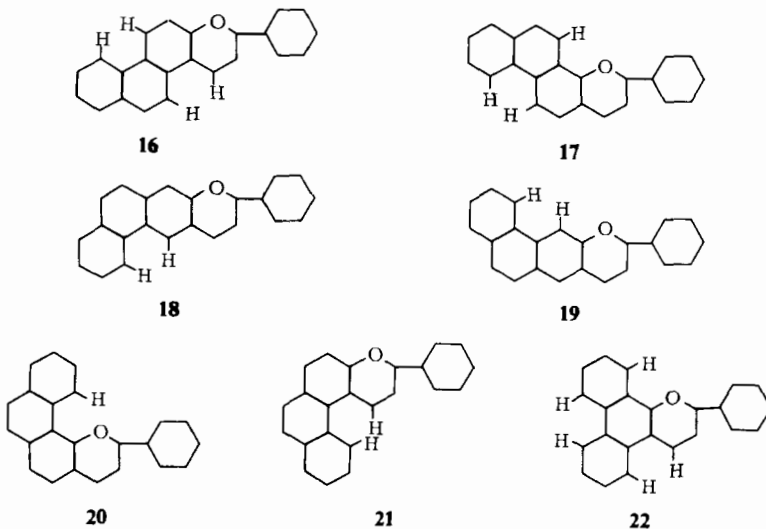


Abb. 4. NMR-Spektrum des Sphagnorubins **4**; ca. 0.1 – 0.2proz. in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

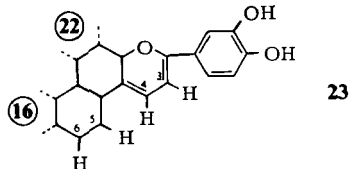
stoffs mit durchgehender Konjugation stammen¹⁶⁾. Unter dieser Voraussetzung kommen für das Sphagnorubin nur die Ringsysteme **16**, **17** oder **22** in Frage, bei denen im Tetracyclus in mindestens 3 Positionen sterische Wechselwirkungen angularer Protonen möglich sind. Von diesen kann die Verknüpfung **17** ausgeschlossen werden, da im NMR-Spektrum des Dihydropentaacetats **2** (Abb. 3) nur noch ein Singulett ($\delta = 9.01$) bei sehr tiefem Feld vorhanden ist, während alle übrigen aromatischen Protonen hier im normalen Bereich ($\delta = 7.1 - 7.8$) absorbieren. Die beiden Dubletts bei tiefem Feld – wie sie beim Sphagnorubin auftreten – sind also verschwunden. Das ist nur bei den Ringverknüpfungen **16** bzw.



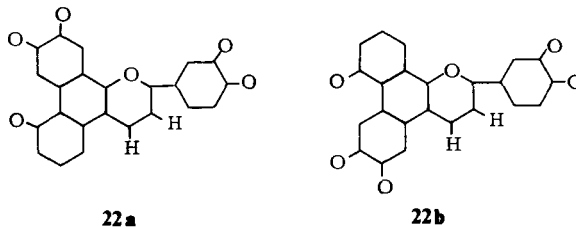
¹⁶⁾ J. A. Pople, W. G. Schneider und H. J. Bernstein, High Resolution Nuclear Magnetic Resonance, S. 250, McGraw-Hill, Inc., New York 1959. A. Zschunke, Kernmagnetische Resonanzspektroskopie in der organischen Chemie, S. 45, Akademie-Verlag, Berlin 1971.

22 möglich, bei denen mit der Einführung eines Wasserstoffatoms an C-4 das Proton an C-5 zu einem „normalen“ aromatischen Proton wird, weil dann die sterisch induzierte Ladungspolarisierung entfällt.

Die im Spektrum des Sphagnorubins auftretende *ortho*-Aufspaltung der beiden Dubletts ($J = 9$ Hz) bei tiefem Feld erlaubt gleichzeitig die Aussage, daß sich in Nachbarschaft zu den beiden entschirmten angularen Protonen an C-4 und C-5 in 3- bzw. 6-Stellung Wasserstoffatome befinden.



Eine Entscheidung zwischen den beiden verbleibenden Möglichkeiten ist NMR-spektroskopisch möglich. Im Spektrum des Dihydropentaacetats deutet das Signal bei $\delta = 9.01$ ppm aufgrund seiner Lage, Intensität und Ausbildung als scharfes Singulett auf *ein* angularen in *ortho*- und *meta*-Position substituiertes Proton hin. In der anderen angularen Position des Phenanthrenteils muß sich, da ein zweites Signal in dieser Region fehlt, ein Sauerstoffatom befinden. Damit kann auch die Verknüpfung **22** eliminiert werden, bei der aufgrund des Substitutionsmusters im Spektrum der Anhydrobase nur *ein* nicht überlagertes Dublett *ortho*-ständiger Protonen (4-H) bei tiefem Feld zu erwarten ist ¹⁷⁾.



Für das Sphagnorubin ergibt sich somit das 2-Phenylphenanthro[2,1-*b*]pyran-Gerüst **16**.

Lokalisierung der C – O-Bindungen im Phenanthrenteil

Im Ringgerüst **16** ergeben sich für die Sauerstoffatome im Phenanthrenteil folgende Kombinationsmöglichkeiten: **24** – **27**.

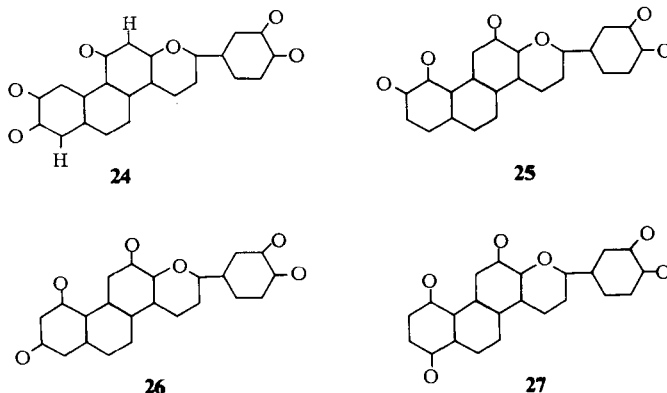
Von diesen ist die Verbindung **24** mit dem Sauerstoffatom in 11-Stellung für ein Flavonoid biogenetisch naheliegend ¹⁸⁾. Für dieses Substitutionsschema spricht das Signal bei $\delta = 6.41$ im NMR-Spektrum des roten Tetraacetats, das aufgrund seiner Ausbildung als Singulett nur mit der Struktur **24** vereinbar ist. Dieses Signal ist dem 12-H zuzuordnen, welches bei Flavylumverbindungen allgemein bei relativ hohem Feld ¹⁹⁾ absorbiert.

¹⁷⁾ Diese Konstitution erscheint auch aus biogenetischer Sicht unwahrscheinlich.

¹⁸⁾ A. J. Birch in *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, S. 618, Pergamon Press, Oxford 1962; A. J. Birch und F. W. Donovan, *Aust. J. Chem.* **6**, 360 (1953); H. Grisebach in *Biosynthesis of Flavonoids*, S. 279, Academic Press, New York und London 1965.

¹⁹⁾ E. Nilsson, *Chemica Scripta* **4**, 49 (1973).

Anhaltspunkte für die benachbarte Lage der Sauerstoffatome in 8- und 9-Stellung und für die Lokalisierung der Carbonylgruppe lieferten auch die Produkte der Acetylierung des Sphagnorubins unter sauren Bedingungen.



Acetylierung unter sauren Bedingungen

Bei der Umsetzung des Sphagnorubins **4** mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{HClO}_4$ erhielten wir 4 verschiedene Acetate, das rote Tetraacetat **6**, ein violettes Acetat (**7**), ein hellbraunes (**9**) und ein farbloses (**10**).

Auch beim violetten Acetat handelt es sich, wie aus dem NMR- und Massenspektrum hervorgeht, um ein Tetraacetat des Sphagnorubins, in dem gegenüber **6** eine Acetoxy- und die Carbonylgruppe die Plätze vertauscht haben. Es hat dementsprechend ein dem roten Tetraacetat ähnliches UV-Spektrum und geht in Methanol/Salzsäure wieder in die Ausgangsverbindung **4** über.

Das hellbraune Acetat **9** ist nach dem Massenspektrum ein Pentaacetat ($\text{M}^+ 614$), das sehr leicht 59 (CH_3COO) bzw. 60 ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) Masseneinheiten verliert und in der Folge viermal Keten abspaltet.

Außer der Acetylierung der 4 phenolischen Hydroxygruppen ist also zusätzlich ein Molekül Essigsäure addiert worden. Der Eintritt der Acetoxygruppe muß dabei im Ring A erfolgt sein, denn das UV-Spektrum von **9** ähnelt dem des Dihydropentaacetats **2**, in dem das chromophore System des Sphagnorubins ebenfalls im Ring A unterbrochen ist. Für die Lokalisierung der Acetoxygruppe in 2-Stellung spricht u. a., daß **9** mit Methanol/Salzsäure Sphagnorubin (**4**) liefert. Da das hellbraune Pentaacetat beim Schütteln seiner Methylenchloridlösung mit NaHCO_3 -Lösung in das rote Tetraacetat übergeführt werden kann, ist auch die Lage der übrigen Acetatgruppen geklärt: sie befinden sich in 3', 4', 8- und 11-Stellung; C-9 trägt eine Hydroxygruppe.

Das farblose Acetat **10** geht bei der Umsetzung mit Methanol/Salzsäure nicht wieder in das Sphagnorubin über. Sein UV-Spektrum ist dem des Dihydropentaacetats **2** sehr ähnlich; d. h. das chromophore System des Sphagnorubins ist im Ring A unterbrochen. Wie aus den sechs separaten Signalen zwischen 2.14 und 2.50 ppm im NMR-Spektrum hervorgeht, liegt hier ein Hexaacetat vor. Fünf der Singulets stammen von den phenolischen Acetylgruppen in 3', 4', 8-, 9- und 11-Stellung, das sechste Signal bei 2.14 ppm wird einer

aliphatischen Acetoxygruppe an C-3 zugeordnet. Für die Lokalisierung in 3-Stellung sprechen die NMR-Signale bei $\delta = 2.90$ (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.75 (m, 1H) und 5.87 ppm (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), die aufgrund ihrer Lage und Intensität den Protonen an C-4 (Ar-CH₂-), C-3 (H-C-OAc) und C-2 $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \end{array} \begin{array}{c} \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{Ar} \end{array} \right)$ zuzuordnen sind. Das wird durch Entkopplungsversuche bestätigt; beim Einstrahlen bei $\delta = 4.75$ ppm werden die Dubletts bei 2.90 und 5.87 ppm zu Singulets. Die Kopplungskonstante läßt vermuten, daß das Hexaacetat zur *epi*-Reihe gehört.

Für die Absorption bei $\delta = 2.50$ ppm kommt nur eine Acetoxygruppe in angularer Position in Frage, denn nur diese gelangt in den deshielding-Bereich des Ringes D und wird dadurch nach tiefem Feld verschoben²⁰⁾. Das Signal stimmt in seiner Lage mit dem Acetylsignal bei 2.49 ppm im Spektrum des 2,3,5,7-Tetraacetoxyphenanthrens²¹⁾ überein, das wir der Acetoxygruppe in 5-Stellung zuordnen.

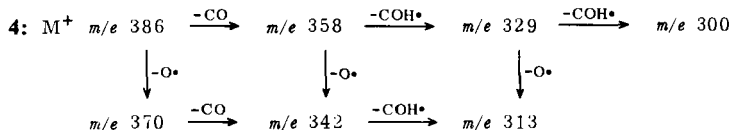
Im Massenspektrum tritt das Molekülion nicht auf; das größte Fragment ist der M - 61-Peak, der aus der Abspaltung von Essigsäure und einem Wasserstoffatom resultiert. Anschließend werden, wie die stufenweise Kettenabspaltung zeigt, fünf phenolische Acetatgruppen eliminiert.

Lokalisierung der Carbonylgruppe

Im Sphagnorubin kommen für die Lage der Carbonylgruppe die Positionen 4', 9 und 11 in Frage. Unterstellt man, daß in Analogie zu der Anhydrobase von 4',7-Dihydroxyflavyliumsalzen eine Carbonylgruppe in 4'-Stellung unwahrscheinlich ist²²⁾, so verbleibt die C-9/C-11-Alternative. Dabei macht die 1626-cm⁻¹-Bande im IR-Spektrum des Farbstoffs eine intramolekular chelierte C-9-Carbonylgruppe wahrscheinlich.

Auch beim *roten* Tetraacetat **6** handelt es sich um eine 9-Ketoverbindung. Wie aus seinem Chromsäureabbauprodukt, dem Protocatechusäurediacetat **8** hervorgeht, befindet sich die Carbonylgruppe im Phenanthrenteil. Für ihre Lokalisierung in 9-Stellung spricht die Lage von 12-H im NMR-Spektrum, die mit dem entsprechenden Sphagnorubinsignal nahezu identisch ist (6.41 bzw. 6.42 ppm).

Beim *violetten* Tetraacetat **7** treten Signale oberhalb von 7 ppm nicht auf; dieser Befund weist auf ein 11-Ketoderivat hin.



Für die Lokalisierung der Carbonylgruppe an C-9 sprechen schließlich auch die massenspektroskopischen Befunde. Beim Sphagnorubin **4** erfolgt neben der Hauptfragmentierung, die mit der Abspaltung einer C=O-Gruppe beginnt, ein weiterer weniger intensiver Zerfallsprozeß, der durch die Abspaltung von 16 Masseneinheiten, d. h. eines Sauerstoffatoms,

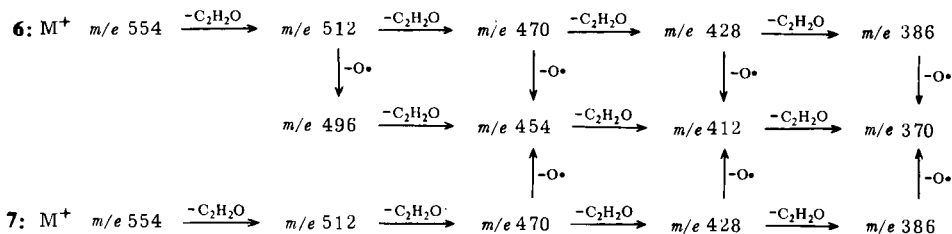
²⁰⁾ Für das Dihydropentaacetat **2** findet man für die Acetylgruppe in 11-Stellung entsprechend ein Signal bei $\delta = 2.52$ ppm.

²¹⁾ H. Erdtmann und A. Ronlan, Acta Chem. Scand. **23**, 249 (1969).

²²⁾ L. Jurd und T. A. Geissman, J. Org. Chem. **28**, 2394 (1963).

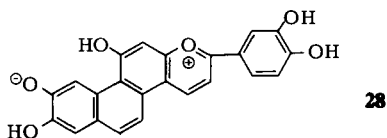
eingeleitet wird. Eine solche Fragmentierung findet man u. a. bei β -Diketonen²³⁾ und Hydroxyanthrachinonen, bei denen Hydroxy- und Carbonylgruppen intramolekular verbrückt sind²⁴⁾.

Der M - 16-Peak könnte natürlich auch von einem Begleitfarbstoff herrühren, der ein Sauerstoffatom weniger enthält. Eine solche Möglichkeit erscheint aber in Anbetracht des Fragmentierungsverhaltens des roten (6) und violetten (7) Tetraacetats wenig wahrscheinlich. Der M - 16-Peak tritt hier nicht auf. Erst nachdem beim roten Tetraacetat einmal und beim violetten zweimal Keten abgespalten worden ist, erfolgt eine Eliminierung von 16 Masseneinheiten.



Dieser Befund findet eine Erklärung, wenn man davon ausgeht, daß die Abspaltung des Sauerstoffatoms aus einer α -Hydroxy-enon-Gruppierung erfolgt. Diese Voraussetzung ist im Falle des roten Tetraacetats 6 nach einmaliger und beim violetten (7) nach zweimaliger Ketenabspaltung gegeben.

Für das Sphagnorubin ergibt sich somit die 9-Ketostruktur 4. Dabei muß aufgrund der nur schwach ausgeprägten und nach kleinen Wellenzahlen verschobenen Carbonylbande im IR-Spektrum, der geringen Löslichkeit und der großen Haftfestigkeit des Sphagnorubins an allen Adsorbentien eine mesoionische Struktur mit in Betracht gezogen werden.



In saurer Lösung geht die chinoide Anhydrobase – wie aus den unterschiedlichen UV-Spektren von 4 in DMSO und Methanol/Salzsäure ersichtlich ist¹⁾ – in das Flavylum-salz 1 über. In DMSO gleicht die Feinstruktur der langwelligen Bande mit ihren vier Maxima dem des roten Tetraacetats 6. In saurer Lösung erfolgt eine Verschmelzung zu einem Maximum größerer Intensität, das in Form und Lage dem des Cyanidinchlorids gleicht.

Dementsprechend erhält man bei der Acetylierung unter basischen oder sauren Bedingungen unterschiedliche Ergebnisse. In Pyridin liefert 4 das der 9-Ketoverbindung entsprechende rote Tetraacetat 6, mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{HClO}_4$ – d. h. über die Flavylumverbindung 1 – ein Gemisch aus zwei Tetraacetaten (6, 7), einem Pentaacetat (9) und einem Hexaacetat (10).

²³⁾ J. H. Bowie, D. H. Williams, S.-O. Lawesson und G. Schroll, J. Org. Chem. 31, 1384 (1966).

²⁴⁾ J. H. Beynon, Mass spectrometry, S. 360, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1960.

Zur Frage der Membranochromie

Wie eingangs erwähnt, sind die roten Farbstoffe der Torfmoose in die Zellwand eingelagert und nur sehr schwer zu extrahieren. Das ungewöhnlich zähe Festhalten der Pigmente könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß die Membranochrome mit den Kohlenhydraten der Zellwand eine glycosidische Bindung eingehen.

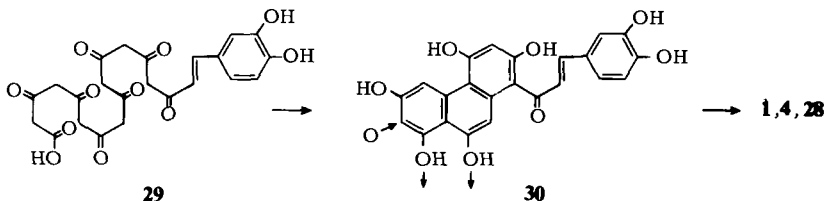
Es könnte sich dabei aber auch um eine adsorptive Bindung an die Zellwand handeln, da die Pigmente sehr polar sind. Wie aus den chromatographischen Untersuchungen bekannt ist, wird das Sphagnorubin beispielsweise von Aluminiumoxid, Kieselgel, Gips und Magnesiumsilikat außerordentlich fest adsorbiert, so daß es nicht wieder eluiert werden kann. Auch an Cellulose wird der Farbstoff extrem fest gehalten und kann nur mit sehr polaren Lösungsmitteln chromatographiert werden.

Als dritte Möglichkeit für die Speicherung der roten Farbstoffe in der Zellwand kann auch die Einlagerung als Metallchelate in Erwägung gezogen werden. Untersuchungen von Bayer²⁵⁾ haben gezeigt, daß die Anhydrobase des Cyanins mit Fe³⁺- und Al³⁺-Ionen stabile Chelatkomplexe bildet, die im Falle des Protocyanins der Kornblume an Polygalacturonsäure geknüpft sind. Da die Zellwände von *Sphagnum magellanicum* vornehmlich aus Polygalacturonsäure in einer Cellulosematrix bestehen²⁶⁾, die zudem als Ionenaustauscher²⁷⁾ in beträchtlichem Umfang Metallionen speichern können, sind die Vorbedingungen für die Ablagerung chinoider Anhydrobasen, wie es das Sphagnorubin ist, in idealer Weise erfüllt.

Wenn das Sphagnorubin im Verlaufe des Stofftransportes in die Zellwand eingewandert ist, könnte es hier von den Metallionen als Chelat gebunden werden. Dabei würde es in der Membran zu einer Ansammlung der Pigmente kommen, denn Metall-Anthocyanin-komplexe sind nach Hayashi²⁸⁾ nicht dialysierbar.

Zur Biogenese des Sphagnorubins

Das Phenyl-phenanthro-pyran-Gerüst des Sphagnorubins ist bei Flavonoiden bislang unbekannt. In Analogie zur Biogenese der Anthocyanidine¹⁸⁾ dürften die Ringe A, B und E aus einem Zimtsäurebaustein und 3 Malonyl-CoA-Einheiten gebildet werden.



²⁵⁾ E. Bayer, Chem. Ber. **91**, 1115 (1958); **92**, 1062 (1959); E. Bayer, K. Nether und H. Egeter, ebenda **93**, 2871 (1960); E. Bayer, H. Egeter, A. Fink, K. Nether und K. Wegmann, Angew. Chem. **78**, 834 (1966).

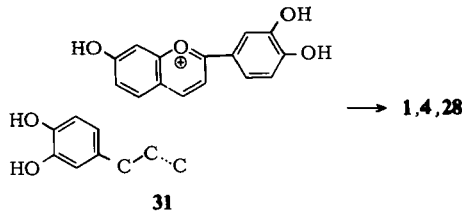
²⁶⁾ R. S. Clymo, Ann. Bot. (London) **27**, 309 (1963); J. S. Craigie und W. S. G. Maass, Ann. Bot. (London) **30**, 153 (1966).

²⁷⁾ H. Rudolph und K. Brehm, Ber. Deut. Bot. Ges. **78**, 484 (1965); K. Brehm, Planta **79**, 324 (1968); K. Brehm, Beitr. Biol. Pflanzen **47**, 91, 287 (1971).

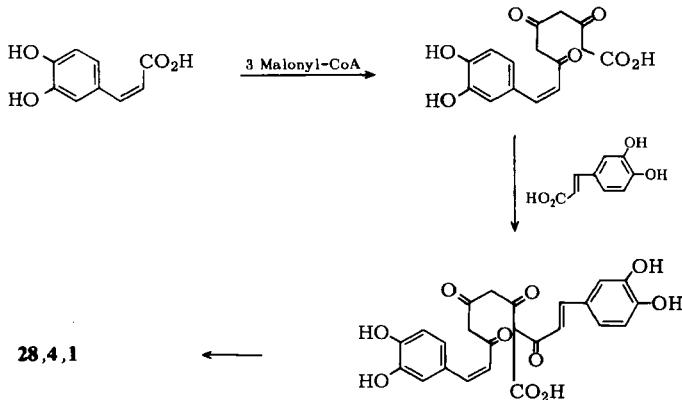
²⁸⁾ K. Hayashi in The Chemistry of Flavonoid compounds, S. 281, Pergamon Press, Oxford 1962.

Für die Biogenese der Ringe C und D seien hier drei Möglichkeiten diskutiert. Sie könnten einmal durch eine Verlängerung der β -Polyketocarbonsäurekette um 4 Acetateinheiten gebildet werden (29). Allerdings müßten dann 2 Hydroxygruppen (6-OH; 7-OH) eliminiert und eine (8-OH) neu eingeführt werden (30).

Eine andere Möglichkeit ist die Verknüpfung eines $C_6 - C_2$ - bzw. $C_6 - C_3$ -Bausteins mit einer vorgefertigten 7-Hydroxyflavylumverbindung. Bei diesem Weg würden sich die Hydroxygruppen in den Ringen C und D sofort in der richtigen Position befinden, wenn man davon ausgeht, daß der Ring D aus dem gleichen precursor hervorgeht wie der Ring E. Ihre Lage ist – bezogen auf die Seitenkette – die gleiche.



Der dritte Weg basiert auf einer ähnlichen Vorstellung. Danach würde der Primärbau- stein – bestehend aus einer Zimtsäureeinheit und drei Acetatgliedern – zunächst mit einer zweiten Zimtsäureeinheit verknüpft und dann in mehreren Schritten zur Pyrylium- verbindung cyclisiert, um schließlich in die Anhydrobase überzugehen.



Ich danke Herrn Dr. F. Caesar, Universität Mainz, (jetzt BASF) für die Aufnahme der NMR-Spektren und anregende Diskussionen, Herrn Prof. Dr. Budzikiewicz, Universität Köln, und Herrn Dr. H. M. Schiebel, Institut für Molekularbiologie Stöckheim, für die Aufnahme der Massenspektren und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die UV-Spektren wurden mit einem Zeiss RPQ 20 A-Spektrophotometer, die IR-Spektren mit einem Spektrometer 421 (Perkin-Elmer) gemessen. Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte mit einem 90 MHz KIS II (Bruker-Spectrospin) (δ -Werte bezogen auf TMS, berechnet aus DMSO, $\delta = 2.5$), die der Massenspektren mit einem MS 9 (AEI). Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Mikroheiztisch bestimmt. Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G (Merck) verwendet; als Laufmittel diente Aceton/Benzol (1 : 2).

Acetylierungen

a) 22 mg Sphagnorubin werden mit 1.5 ml Acetanhydrid und 1.5 ml absol. Pyridin 3 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird i. Hochvak. (20°C) abgedampft und der Rückstand durch dreimaliges Suspendieren in 3 ml Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Methylenchlorid/Aceton liefert 12 mg 8,11-Diacetoxy-2-(3,4-diacetoxyphenyl)-9H-phenanthro[2,1-b]pyran-9-on (rotes Tetraacetat **6**) in erdbeerrotten Nadeln vom Schmp. $263 - 266^\circ\text{C}$, R_F 0.42.

UV (CH_2Cl_2): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 560 sh (3.95), 522 (4.24), 494 (4.29), 460 sh (4.18), 354 (4.15), 336 (4.09), 315 (4.13), 291 (4.51), 247 nm sh (4.40). – IR: vgl. Abb. 1. – MS (70 eV; 260°C): $m/e = 554$ (14% M^+), 512 (22%), 496 (3%), 484 (3%), 470 (37%), 454 (3%), 442 (12%), 428 (77%), 412 (12%), 411 (16%), 387 (35%), 386 (100%), 385 (23%), 371 (5%), 370 (5%), 358 (36%), 342 (4%), 341 (4%), 329 (18%), 326 (13%), 284 (17%), 242 (47%), 137 (19%), 60 (94%). – NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO): δ 2.40 ppm s (3H, Acetyl); 2.42 ss (6H, Acetyl); 2.43 s (3H, Acetyl); 6.41 s (1H, arom.); 7.1–8.8 (8H, arom.); 9.80 s (1H, arom.).

b) 21 mg Sphagnorubin, in 1.2 ml Acetanhydrid suspendiert, werden mit einem Tropfen HClO_4 (60%) versetzt. Nach 4 h werden nochmals 0.3 ml Acetanhydrid und ein Tropfen HClO_4 (60%) zugegeben. Nach 18 h wird i. Hochvak. (20°C) eingedampft und der Rückstand durch viermaliges Suspendieren in 3 ml Wasser gewaschen. Aus dem getrockneten Rückstand werden mit Essigester/Aceton 2.7 mg rotes Tetraacetat **6** abgetrennt.

Das Essigester/Aceton-Filtrat wird eingedampft und der Rückstand in Aceton aufgenommen. Beim Einengen der Acetonlösung kristallisiert das 3,8,9,11-Tetraacetoxy-2-(3,4-diacetoxyphenyl)-2H-3,4-dihydrophenanthro[2,1-b]pyran (**10**) aus. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton liefert 2 mg **10** in farblosen Nadeln vom Schmp. $245 - 247^\circ\text{C}$. R_F 0.62.

UV (CH_2Cl_2): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 364 (3.40), 344 (3.35), 327 (3.18), 301 sh (4.34), 286 sh (4.62), 263 nm (5.02).

IR (KBr): 1765, 1706, 1598, 1500, 1462, 1420, 1367, 1279, 1205, 1134, 1106, 1013, 909 cm^{-1} .

MS (70 eV; 300°C): $m/e = 654$ (2.7%), 597 (38%), 555 (100%), 513 (73%), 471 (38%), 429 (30%), 428 (34%), 412 (15%), 411 (19%), 387 (54%), 386 (59%), 358 (22%), 329 (8%), $m^* = 515.9$ (597 \rightarrow 555), 474.2 (555 \rightarrow 513), 432.4 (513 \rightarrow 471), 390.7 (471 \rightarrow 429), 349.1 (429 \rightarrow 387), 348.1 (428 \rightarrow 386), 332.0 (386 \rightarrow 358). – NMR (CDCl_3): δ 2.14 ppm s (3H, Acetat), 2.28 s (3H, Acetat), 2.30 s (3H, Acetat), 2.34 s (3H, Acetat), 2.35 s (3H, Acetat), 2.50 (3H, Acetat), 2.90 d ($J = 5.4$ Hz, 2H, benzyl.), 4.75 m (1H, C-3), 5.87 d ($J = 5.4$ Hz, 1H, C-2), 7.1–7.8 (7H, arom.), 8.99 s (1H, arom.).

Aus dem eingeengten Acetonfiltrat werden durch Umlösen in Methylenchlorid sowie Essigester/Methylenchlorid 3 mg violettes Tetraacetat **7** (8,9-Diacetoxy-2-(3,4-diacetoxyphenyl)-11H-phenanthro[2,1-b]pyran-11-on) vom Schmp. $175 - 179^\circ\text{C}$ erhalten. R_F 0.46.

UV (CH_3OH): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 635 (3.35), 562 sh (4.11), 523 (4.28), 501 sh (4.23), 446 sh (3.97), 3.57 (3.94), 264 (4.62), 229 nm (4.59). – IR (KBr): 1768, 1623, 1600, 1526, 1484, 1368, 1333, 1193, 1118, 1081, 1010, 634 cm^{-1} . – MS (70 eV, 290°C): $m/e = 554$ (25%), M^+ , 528 (12%), 512 (39%), 486 (10%), 470 (55%), 454 (5%), 444 (11%), 429 (33%), 428 (98%), 412 (10%), 402 (15%), 387 (31%), 386 (99%), 385 (18%), 370 (8%), 358 (18%), 330 (8%), 329 (9%), 242 (18%), 154 (94%), 137 (100%), 97 (59%), 95 (56%). – NMR (CD_3NO_2): δ 2.26 ppm s (3H, Acetat), 2.29 s (3H, Acetat), 2.37 s (3H, Acetat), 2.40 s (3H, Acetat), 7.1–8.9 (9H, arom.), 9.32 s (1H, arom.).

Einengen des Methylenchlorid-Filtrats und Umlösen des Rückstandes aus Essigester liefert 2.6 mg hellbraunes Pentaacetat **9** (2,8,11-Triacetoxy-2-(3,4-diacetoxyphenyl)-9-hydroxy-2*H*-phenanthro[2,1-*b*]pyran), das bei 160–170°C einen Umwandlungspunkt zeigt und bei 265–268°C schmilzt. R_F 0.49.

UV (CH_2Cl_2): λ_{max} (log ϵ) = 520 sh (2.94), 493 (2.99), 463 (2.84), 369 (3.72), 352 (3.78), 327 (4.26), 312 (4.28), 288 sh (4.49), 271 (4.90), 230 nm (4.69). — IR (KBr): 3493, 3280, 1767, 1728, 1657, 1606, 1574, 1496, 1461, 1416, 1367, 1252, 1202, 1101, 1009, 900 cm^{-1} . — MS (70 eV, 270°C): m/e = 614 (4.5% M^+), 597 (9%), 572 (14%), 555 (59%), 554 (5%), 530 (23%), 513 (45%), 512 (14%), 488 (30%), 471 (34%), 470 (30%), 454 (11%), 446 (11%), 429 (34%), 428 (59%), 412 (25%), 387 (43%), 386 (100%), 370 (7%), 358 (45%), 329 (27%), 267 (39%), 179 (45%), 137 (91%). — NMR (DCCl_3): δ 2.14 ppm s (3H, Acetyl), 2.30 s (3H, Acetyl), 2.31 s (3H, Acetyl), 2.35 s (3H, Acetyl), 2.49 s (3H, Acetyl). ($[\text{D}_6]$ DMSO): 7.0–8.1 (9H), 9.01 (1H), 11.1 (1H).

Reduktive Acetylierung

20 mg rotes Tetraacetat **6** werden in CH_2Cl_2 gelöst und mit 3 mg Platinoxid (Adams) bei 20°C unter Normaldruck hydriert, bis die anfangs rote Farbe der Lösung in Braunrot übergegangen ist. Anschließend wird der Katalysator abgetrennt und das Methylenchlorid abgedampft. Nach Zugabe von 2 ml absol. Pyridin und 1 ml Acetanhydrid wird die Mischung über Nacht stehengelassen. Danach wird das Lösungsmittel i. Hochvak. abdestilliert und der Rückstand mit Essigester an Kieselgel P schichtchromatographisch aufgetrennt. Eluieren der im UV-Licht blau fluoreszierenden Zone (R_F 0.66) mit Essigester und Umkristallisieren des Abdampfrückstandes aus Aceton/Äthanol liefert 1.9 mg 8,9,11-Triacetoxy-2-(3,4-diacetoxyphenyl)-4*H*-phenanthro[2,1-*b*]pyran (**2**) in blaßrosa Kristallen vom Schmp. 238–240°C. R_F 0.65.

M^+ m/e 598.1490; ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$ 598.1470

UV (CH_2Cl_2): λ_{max} (log ϵ) = 555 (2.15), 516 (2.41), 490 (2.45), 457 (2.31), 363 (3.14), 346 (3.01), 329 (2.94), 303 (4.00), 284 sh (4.33), 262 nm (4.65). — IR (KBr): 1764, 1753 (sh), 1678, 1602, 1504, 1461, 1370, 1282, 1257, 1200, 1132, 1115, 1100, 1050, 1015, 890, 796 cm^{-1} . — MS (70 eV, 180°C): m/e = 598 (13%, M^+), 556 (32%), 514 (34%), 496 (50%), 472 (33%), 454 (99%), 430 (21%), 412 (97%), 411 (100%), 388 (13%), 387 (20%), 303 (14%), 279 (16%), 278 (12%), 266 (12%), 137 (10%), 136 (11%), 60 (22%), 58 (38%). — NMR (CDCl_3 , ca. 0.5proz. Lösung): δ 2.32 ppm s (3H, Acetat), 2.35 s (3H, Acetat), 2.38 s (3H, Acetat), 2.39 s (3H, Acetat), 2.52 s (3H, Acetat), 3.87 d (J = 3.5 Hz, 2H, benzyl), 5.68 t (J = 3.5 Hz, 1H, vinyl), 7.1–7.8 (7H, arom.), 9.01 s (1H, arom.).

Alkaliabbau

9 mg Sphagnorubin werden mit je 250 mg KOH- und NaOH-Pulver vermischt und luftfeucht im Platinschiffchen in einem Pyrexrohr 10 min im Wasserstoffstrom auf 250–260°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Schmelze in 5 ml Wasser gelöst und nach Ansäuern mit 5 N HCl 5 mal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen werden 4 mal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und nach dem Ansäuern mit Salzsäure 7 mal mit Äther extrahiert. Die mit gesätt. NaCl-Lösung gewaschene Ätherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft und der Rückstand in Äthanol aufgenommen. Beim Versetzen mit Äther fällt ein brauner Niederschlag aus, der durch Zentrifugieren und Dekantieren abgetrennt wird. Das eingedampfte Filtrat wird anschließend an Cellulose (S + S 2043 b mg/l) mit Butanol/Wasser/Essigester (6 : 2 : 1) chromatographiert. Aus der im UV-Licht blau fluoreszierenden Zone (R_F 0.80) werden nach der üblichen Aufarbeitung durch Umkristallisieren aus Essigester/*n*-Hexan 0.2 mg Protocatechusäure in farblosen Nadeln erhalten. IR- und UV-Spektrum sowie R_F -Werte stimmen mit authentischem Material überein.

Zinkstaubdestillation

10 mg Sphagnorubin werden mit 1.5 g Zinkstaub verrieben und in einem Pyrexrohr (\varnothing 1.6 cm; Länge 70 cm) mit 1.5 g Zinkstaub bedeckt. Die durch Glaswollepfropfen begrenzte Probe wird in

einem Röhrenofen (25 cm Länge) 30 min lang im Wasserstoffstrom zwischen 600 und 700°C gehalten. Das am Ende des Rohres auf der Glaswolle niedergeschlagene gelbliche Sublimat wird schichtchromatographisch mit Methylenchlorid an Kieselgel G aufgetrennt. Nach wiederholter Chromatographie wird **5** aus dem im UV-Licht blau fluoreszierenden Band (R_F 0.61 – 0.64) in sehr geringer Menge erhalten.

MS: m/e 206 (6%), 192 (32%), 178 (100%). – UV (CH_2Cl_2): λ_{max} = 354, 346, 338, 330, 322, 294, 282, 275, 252, 246 nm.

Chromsäureabbau

26 mg **6** in 1.7 ml Eisessig werden mit 60 mg CrO_3 unter Rühren 25 h auf 100°C erhitzt. Der Abdampfrückstand wird in gesätt. NaCl-Lösung aufgenommen und mit Essigester ausgeschüttelt. Aus der Essigesterphase werden die Säuren durch Extraktion mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, Ansäuern mit Salzsäure und Ausschütteln mit Essigester abgetrennt. Nach dem Eindampfen werden aus dem Rückstand durch fraktionierte Kristallisation aus Essigester/n-Hexan 1.5 mg Protocatechusäure-diacetat (**8**) und 1.2 mg gelbliche Kristalle (vermutlich eine aromatische Polycarbonsäure) erhalten. **8** ist mit authentischem Material identisch.

[466/73]