

5. Reindarstellung von Anthocyanen durch chromatographische Analyse

von P. Karrer und F. M. Strong.

(10. XII. 35.)

Schon vor 3 Jahren hat *A. Axelrod*¹⁾ auf Veranlassung des einen von uns versucht, Anthocyane im Chromatogramm zu trennen. Jenen Versuchen war indessen kein grosser Erfolg beschieden gewesen, offenbar infolge unrichtiger Wahl der Adsorptionsmittel (Fullererde und Bariumsulfat). Heute können wir an einem ersten Beispiel zeigen, dass die Chromatographie auch zur Isolierung und Reindarstellung von Anthocyanen gute Dienste leisten kann.

In den Blüten der rotblühenden Paeonie haben *Willstätter* und *Nolan*²⁾ das Paeonin aufgefunden, dessen Konstitution durch Arbeiten der Schule *R. Robinson*'s sowie durch solche aus unserem Institut aufgeklärt worden ist³⁾. Diese krystallisierten Paeoninpräparate haben sich indessen jetzt als nicht ganz einheitlich erwiesen. Sie enthalten etwas Cyanin, das sich vom Paeonin im Chromatogramm trennen liess.

Als Adsorbens verwendeten wir Aluminiumoxyd, welches nach dem Vorschlag von *P. Ruggli*⁴⁾ vorher mit Leitungswasser bespült worden war. Doch erwies es sich in unserem Fall als notwendig, eine nur leicht mit Kalk beschlagene Adsorptionsmasse zu gebrauchen, da anderenfalls die Anthocyane im Chromatogramm zu fest haften.

Auch wenn ein einheitliches Anthocyan chromatographiert wird, sieht die Adsorptionssäule keineswegs homogen aus; man bemerkt vielmehr rote, blaue, eventuell blaugrüne Zonen. Dies hängt damit zusammen, dass sich an dem leicht basischen Adsorbens aus dem Oxoniumsalz des Farbstoffes teilweise Farbbasen, Carbinolbasen und Phenolbetaine bilden, die bekanntlich andere Nuancen als die Anthocyan-oxoniumsalze besitzen. Eine Aufteilung der Adsorptionssäule in die verschieden farbigen Zonen führt daher nicht ohne weiteres zu verschiedenen Pigmenten.

Im untersuchten Fall der Paeonienfarbstoffe hat sich das Cyanin, das eine freie OH-Gruppe mehr enthält als Paeonin, in der obersten Zone des Chromatogramms angesammelt, während sich Paeonin bedeutend leichter auswaschen liess.

¹⁾ *A. Axelrod*, Diss. Zürich 1933.

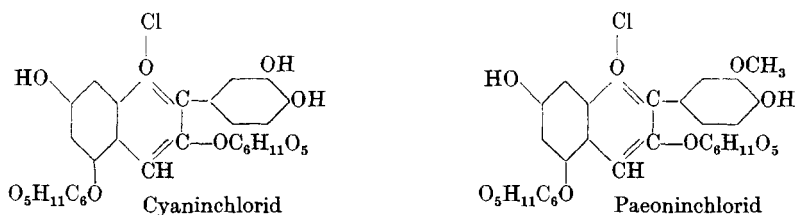
²⁾ *A.* **408**, 136 (1915).

³⁾ *Nolan, Pratt, Robinson*, Soc. **1926**, 1968. — *P. Karrer, Widmer*, *Helv.* **10**, 8 (1927). — *Murakami, Robinson*, Soc. **1928**, 1537. — *Robinson, Todd*, Soc. **1932**, 2488.

⁴⁾ *Helv.* **18**, 624 (1935).

Das reine, Cyanin-freie Paeonin gleicht den bisher beschriebenen Paeoninpräparaten weitgehend. Nur in Bezug auf die Eisen(III)-chloridreaktion zeigt sich zwischen den früheren und den neuen, reinen Präparaten eine Diskrepanz. *Willstätter* und *Nolan* finden, dass Paeonin in alkoholischer Lösung beim Zusatz von Ferrichlorid seine Farbe kaum ändert, wohl aber beim Verdünnen dieser Lösung mit Wasser, wobei die Nuance in Violett umschlägt. Diese Eisen-(III)chloridreaktion muss indessen dem beigemengten Cyanin zugeschrieben werden, denn reines, im Chromatogramm gereinigtes Paeonin verändert auch in Wasser bei Zusatz von Eisen(III)chlorid seine Lösungsfarbe nicht.

Das gleichzeitige Vorkommen von Paeonin und Cyanin in derselben Blüte ist von Interesse, da die beiden Pigmente im Verhältnis von Nor-Verbindung und Methyläther stehen, und daher



wohl genetische Beziehungen zwischen ihnen existieren. Zugleich treffen wir hier ein neues Beispiel von Uneinheitlichkeit bei Anthocyanen, auf die der eine von uns (*P. K.*) schon vor Jahren nachdrücklich hinwies¹⁾. Wir beabsichtigen, auch andere natürliche Anthocyanmische, deren Trennung bisher noch nicht möglich war (z. B. die Pigmente der Heidelbeere und schwarzen Malve) im Chromatogramm zu untersuchen.

Experimenteller Teil.

Chromatographische Reinigung von Roh-Paeonin.

Das Paeoninchlorid wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von *Willstätter* und *Nolan*²⁾ dargestellt.

Wir lösten 1,5 g des Roh-Paeonins in 200 cm³ warmem Wasser, filtrierten die Lösung und adsorbierten hierauf in einer Säule von aktiviertem Aluminiumoxyd. Die Entwicklung des Chromatogramms geschah durch Nachspülen mit Wasser. Der oberste Teil der Adsorptionssäule zeigte ein purpur gefärbtes Band (I), hierauf folgte eine breitere hellblaue Zone (II); eine beträchtliche Menge des Farbstoffs wurde durch das Nachwaschen mit Wasser durch die Adsorptionsschicht hindurchgetrieben und befand sich somit in der durchgelaufenen Flüssigkeit (III). Wir setzten das Nachwaschen

¹⁾ Helv. 10, 5 (1927).

²⁾ A. 408, 137 (1915).

mit Wasser so lange fort, bis die unten auslaufende Flüssigkeit farblos erschien.

Die Adsorptionsschichten I und II wurden getrennt wiederholt mit warmem Wasser, dem etwas verdünnte Salzsäure zugesetzt war, eluiert. Während die Ablösung des Pigments aus Zone II auf diese Weise vollständig gelang, blieb das Adsorbens der Zone I auch nach 10—12 Elutionen immer noch hellblau gefärbt. Wir konzentrierten die Eluate der Zone I im Vakuum auf ca. 20 cm³. Dabei schied sich der Farbstoff in Form eines dunkelroten, flockigen Niederschlags aus, der abfiltriert und mit Wasser, Aceton und Äther nachgewaschen wurde.

Hierauf lösten wir diese Farbstoff-fraktion wiederum in Wasser und wiederholten die Adsorption in einer Aluminiumoxydkolonnen in gleicher Weise. Die Erscheinungen bei der Entwicklung des Chromatogramms waren dieselben wie vorher; die entsprechenden Fraktionen werden als Ia, IIa und IIIa bezeichnet. Die nach der Konzentration des Eluates von Zone Ia erhaltene Farbstoff-fällung kochten wir 10—15 Sekunden mit 20 cm³ 0,5-n. Salzsäure auf, wobei Lösung eintrat. Nach rasch vorgenommener Filtration blieb das Filtrat bei 0° stehen. Dabei schied sich das Anthocyanchlorid krystallisiert aus. Eine Analyse zeigte indessen, dass die Verbindung noch nicht einheitlich war; sie enthielt noch über 2% Methoxyl.

Daher wurde eine dritte chromatographische Reinigung angeschlossen, die wie die vorhergehende verlief. Die drei Fraktionen werden als Ib (oben), IIb (2. Schicht) und IIIb (Filtrat) bezeichnet.

Nach der Konzentration des Eluates Ib im Vakuum fiel das Anthocyan in dunkelroten Krystallen aus. Abfiltriert und getrocknet betrug sein Gewicht 110 mg. Wir versuchten zuerst, die Substanz aus 0,5-n. Salzsäure umzukrystallisieren, doch blieb der grösste Teil dabei ungelöst. Daher kochten wir den unlöslichen Anteil mit 10 cm³ Wasser auf, in welchem er in Lösung ging, filtrierten die Flüssigkeit und setzten zum Filtrat 0,6 cm³ konzentrierte Chlorwasserstoffsäure. Beim Stehen im Eisschrank krystallisierte reines Cyaninchlorid aus. Ausbeute 76 mg. Die Verbindung war vollkommen frei von Methoxyl.

Analyse der bei 105° im Vakuum getrockneten Substanz:

C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ Cl	Ber. C	50,08	H	4,83	Cl	5,48%
	Gef. „	49,58	„	4,62	„	5,11%

Zur Identifizierung mit Cyanin haben wir unser Präparat mit einem Cyaninchloridpräparat aus roten Rosen kolorimetrisch verglichen und zwar bei p_H 5,29, 5,91, 6,47, 6,81, 7,38 und 8,04: In allen Aciditätsbereichen stimmte die Nuance der beiden Präparate vollständig überein. Auch die Absorptionsspektren von Cyanin aus Rosen und solchem aus Paeonien liessen keine Differenz erkennen. An der Identität der beiden Farbstoffe ist somit nicht zu zweifeln.

Isolierung des Paeonins. Wir vereinigten die Filtrate III und IIIa und konzentrierten sie im Vakuum bei 30° auf 20 cm³. Der ausgefallene krystalline Niederschlag wurde abfiltriert und aus 50 cm³ 0,5-n. Salzsäure unter kurzem Aufkochen umkrystallisiert. So erhielt man das Pigment in feinen, roten Nadeln, welche nach dem Waschen mit Wasser, Aceton und Äther an der Luft getrocknet wurden. Ausbeute 0,55 g. Vergleicht man es in Bezug auf Farbenreaktionen mit Roh-Paeonin, so fällt vor allem auf, dass es weder in Alkohol noch in Wasser nach Zusatz von Eisen(III)chlorid irgend eine Farbänderung zeigt, während die rote Lösung des Roh-Päonins nach Eisen(III)chlorid-Zusatz nach violett umschlägt. Zusatz von wenig Natriumcarbonat zur wässerigen Lösung von reinem Paeonin bewirkt Farbumschlag nach blaugrün, Natriumacetat verschiebt die rote Nuance nach violett.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

6. Notizen über Vorkommen von Carotinoiden in Pflanzen

von P. Karrer, F. Rübel und F. M. Strong.

(10. XII. 35.)

Passiflora coerulea.

*Courchet*¹⁾ hat das Vorkommen von Carotinoiden im Arillus dieser Pflanze wahrscheinlich gemacht. Wir waren in der Lage, die tief roten Samen dieser Frucht zu untersuchen²⁾. Ihr Pigment ist fast reines Lycopin, das sich leicht in krystallisierter und reiner Form daraus darstellen liess. Bemerkenswert ist der sehr hohe Farbstoffgehalt dieser pflanzlichen Organe.

Die Samen frischer Passiflorafrüchte wurden, nachdem sie zwecks Entfernung der Schleimbestandteile einen Tag lang unter Alkohol aufbewahrt worden waren, zweimal je eine Stunde mit Chloroform ausgekocht. Die filtrierten und getrockneten, tief rot aussehenden Chloroformauszüge haben wir im Vakuum zur Trockene verdampft, den Rückstand zunächst mit Petroläther, in dem er sich fast unlöslich erwies, gewaschen und hierauf mehrmals mit Ligroin (Sdp. 60—80°) ausgekocht. Nach dem Konzentrieren der Ligroin-extrakte auf 30 cm³ krystallisierte reines Lycopin aus (0,5 g), Smp. 173°. Absorptionsmaxima in Schwefelkohlenstoff 548, 507 m μ .

C ₁₀ H ₅₆	Ber. C 89,55	H 10,45%
	Gef. „ 89,04	„ 10,63%

¹⁾ Ann. Sci. nat. bot. Ser. VII, 7, 263 (1888).

²⁾ Die Früchte verdanken wir Hrn. Dr. v. Krauss in Ronco (Tessin).