

TRENNUNG VON ANTHOCYANGEMISCHEN DURCH KOMPLEXBILDUNG AN ALUMINIUMOXID

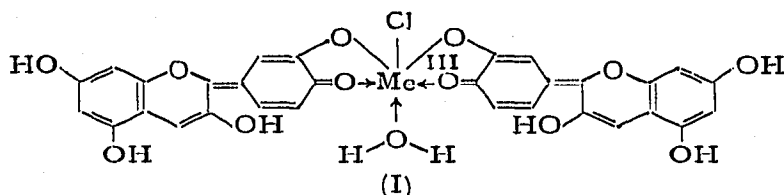
LEONHARD BIRKOFER, CHRISTELMARGOT KAISER UND MANFRED DONIKE

Institut für Organische Chemie der Universität Köln (Deutschland)

(Eingegangen den 21. Oktober 1965)

Im Verlauf unserer Untersuchungen¹⁻³ über acylierte Anthocyane ergab sich das Problem, grössere Mengen der mittels Kationenaustauscher gewonnenen Anthocyanmische² aufzutrennen.

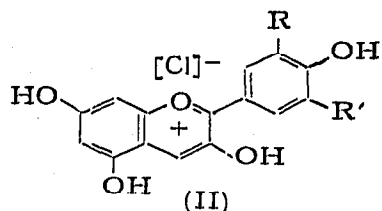
Die Isolierung der Einzelpigmente durch präparative Papierchromatographie ist nicht nur zeitraubend, sondern auch recht kostspielig. Die Verteilungschromatographische Trennung über Zellulose⁴ bzw. Kieselgelsäulen⁵ gelingt nicht immer befriedigend und erfordert erheblichen Aufwand, speziell bei der Vorbereitung der Säulen⁶. KARRER UND STRONG⁷ verwendeten Aluminiumoxid für die Gewinnung von Anthocyanen; andere Autoren⁸ halten dieses Adsorbens jedoch für unwirksam. Da die chromatographischen Verfahren kein befriedigendes Ergebnis versprachen, versuchten wir, ob die Komplexbildung mit Metallionen, die als Farbreaktion zum Nachweis von *ortho*-ständigen Hydroxylgruppen im Seitenphenylring des Anthocyan schon lange bekannt ist⁹, zum Ziel führt. Wie BAYER¹⁰ bei der Untersuchung der Eisen- und Aluminiumkomplexe des Cyanidins feststellte, weisen sie bei etwa pH 5.0 nicht nur die grösste Farbtintensität, sondern auch eine geringe Löslichkeit auf. Er schlägt im Falle des Cyanidins Formel I vor, bei der 2 Moleküle Cyanidin mit einem Me⁺⁺⁺-Ion^{11, 12} verknüpft sind.



Pelargonidin (IIa) vermag nach den Untersuchungen von BAYER¹¹ keine schwer löslichen Komplexe zu bilden. Offen jedoch war die Frage, ob ein zur Hydroxylgruppe vicinaler Methoxylrest zur Komplexbildung befähigt ist. Wie wir fanden, bilden Päonidin (II d) und Malvidin (II f) bei pH 5.0 auch keine stabilen Eisen- oder Aluminiumkomplexe.

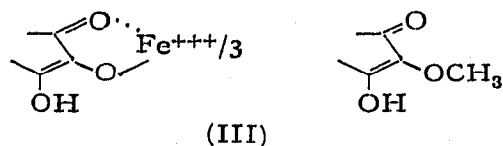
Das gleiche Verhalten ist bei der Komplexbildung von Reduktonen (III) beschrieben¹³, bei denen durch Methylierung des mittelständigen Hydroxyls die Fähigkeit zur Chelatbildung verloren geht.

Demnach ist für die Entstehung eines stabilen Komplexes der Anthocyanidine Voraussetzung, dass sie im Seitenphenylring mindestens zwei vicinale Hydroxyl-



- IIa: R=R'=H Pelargonidin; I Ib: R=OH, R'=H Cyanidin;
 IIc: R=R'=OH Delphinidin; I Id: R=OCH₃, R'=H Päonidin;
 IIe: R=OCH₃, R'=OH Petunidin; I If: R=R'=OCH₃ Malvidin.

gruppen besitzen, also sich von Cyanidin (II b), Delphinidin (II c) und Petunidin (II e) ableiten.



Auf Grund dieser Erkenntnisse bot sich die Möglichkeit, Anthocyanmische in komplex- und nicht komplexbildende Komponenten zu zerlegen. Zur Trennung stellten wir anionotropes Aluminiumoxid durch Zugabe von Natronlauge auf pH 5.0 ein und gaben auf das so vorbehandelte und in eine Säule gefüllte Adsorbens eine auf den gleichen pH-Wert eingestellte Anthocyanlösung. Durch Elution mit Wasser, Methanol oder Äthanol liessen sich die nicht komplexbildenden Anthocyane quantitativ entfernen (Fig. 1). Nachfolgend konnten die adsorbierten Pigmente durch Zusatz von 1% Salzsäure zu dem Elutionsmittel unter Zerstörung des Komplexes abgelöst werden.

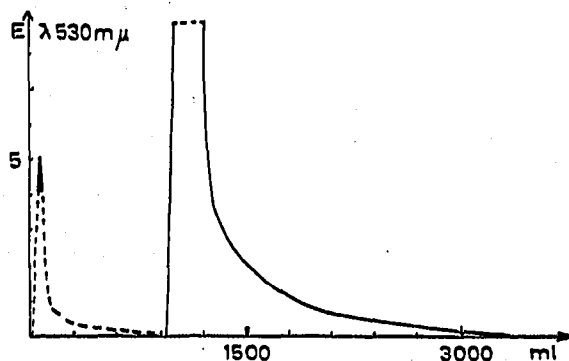


Fig. 1. Trennung von 100 mg Mischkristallen aus der Petuniensorte A 6. --- Elutionskurve des Negreteins mit Methanol (90%), — Elutionskurve des Petanins mit Methanol (90%), das 1% HCl enthält. Negretein = Malvidin-3-[4-(*p*-cumaroyl)-rhamnosyl (1 → 6)-glucosido]-5-glucosid; Petanin = Petunidin-3-[4-(*p*-cumaroyl)-rhamnosyl (1 → 6)-glucosido]-5-glucosid.

Die systematische Variation der Wasserstoffionenkonzentration der Aluminiumoxid-Suspension ergab, dass zur Trennung von komplex- und nicht komplexbildenden Anthocyanen der pH-Bereich von 4.5 bis 5.2 am günstigsten ist. Bei einem pH-Wert von 5.5 und grösser konnte z.B. das Malvidinderivat Negretein nicht mehr mit den oben erwähnten neutralen Lösungsmitteln eluiert werden, da es wahrscheinlich als

Anion adsorbiert wird. Bei Erniedrigung des pH-Wertes begannen ab pH 4.0 die Anthocyan Komplexe in zunehmendem Masse zu wandern. Dies führte zu einer unvollständigen Trennung, wenn die Aluminiumoxidschicht in der Säule nicht entsprechend vergrößert wurde. Wesentlich für uns war, dass sich auch acylierte Anthocyane bei diesem Verfahren nicht verändert hatten, insbesondere keine Abspaltung von Säuren auftrat. Ferner spielte das prozentuale Verhältnis von komplex- zu nicht komplexbildenden Anthocyanen keine Rolle.

Tabelle I zeigt die allgemeine Anwendbarkeit der Methode für die Trennung von Anthocyanen bei verschiedenen Pflanzen.

TABELLE I

ANTHOCYANTRENNUNG AN ALUMINIUMOXID

Pflanzen	Aglyka (%)	
	Komplexbildend	Nicht komplex- bildend
<i>Petunia hybrida</i> A 6	Petunidin (86) Delphinidin (1)	Malvidin (13)
<i>Petunia hybrida</i> P 14	Petunidin (10)	Malvidin (90)
<i>Petunia hybrida</i> V 79 a	Petunidin (3) Cyanidin (3) Delphinidin (2)	Päonidin (90) Malvidin (2)
<i>Petunia hybrida</i> V 78 a	Petunidin (30) Delphinidin (40)	Malvidin (30)
<i>Tulipa</i> spec. (Tulpen)	Cyanidin (50)	Pelargonidin (50)
<i>Fragaria hybrida</i> (Erdbeeren)	Cyanidin (2)	Pelargonidin (98)
<i>Raphanus sativus</i> (Radieschen)	Cyanidin (1)	Pelargonidin (99)

In diesem Zusammenhang lag die Vermutung nahe, dass auch die gute Trennung von Anthocyanen auf einer Kieselgel-Dünnschicht¹⁴ im Laufmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser¹⁵ auf der Wechselwirkung der Pigmente mit den im Kieselgel vorhandenen komplexbildenden Eisen- oder Aluminiumionen beruht. Nach unseren Befunden besitzt eisen- und aluminium-ionenfreies Kieselgel tatsächlich keine Trennfähigkeit mehr für Anthocyane einer Glykosidklasse. Der gleiche Effekt zeigt sich, wenn man den pH-Wert des Laufmittels durch Zugabe von Salzsäure erniedrigt und damit die Komplexbildung verhindert.

EXPERIMENTELLES

1. Lösungsmittel

Als Elutionsmittel können Wasser, Methanol oder Äthanol dienen. Wir verwendeten meist Methanol (90 %), da nach Entfernung des Methanols im Rotationsverdampfer die Acylanthocyane aus der wässrigen Lösung ausfallen.

2. Bereitung der Aluminiumoxidsäule

100 ml Aluminiumoxid Fluka (sauer, Typ 504 C, Aktivität I nach BROCKMANN) werden in 200 ml Wasser suspendiert. Das Wasser wird nach 10 Min. abdekantiert und durch mehrmaliges Aufschlänmen durch Methanol (90 %) ersetzt. Den pH-Wert

der überstehenden Lösung bringt man durch tropfenweises Zugeben von 2 *N* Natronlauge auf pH 5.0 (gemessen mit einer Glaselektrode). Erst nach mehreren Stunden tritt Konstanz des pH-Wertes ein, da das Aluminiumoxid Austauschereigenschaften besitzt.

Von dem so vorbereiteten Aluminiumoxid wird in eine Säule (20 mm Ø) auf eine Schicht Seesand so viel mit Methanol (90 %) eingeschlämmt, dass eine 10 cm hohe Schicht entsteht. Die Säule wird dann mit 1 l Methanol (90 %) gewaschen.

3. *Trennung von in Lösung vorliegenden Anthocyanen*

Liegen die Anthocyane in saurer Lösung vor, so wird nach Zugabe von 5 ml Aluminiumoxid (sauer) der pH-Wert unter Rühren und fortlaufender Messung durch Zutropfen von 2 *N* Natronlauge auf 5.0 eingestellt. Wenn die überstehende Lösung fast farblos ist, so reicht die Menge des Aluminiumoxids aus, um die komplexbildenden Anthocyane zu binden. Andernfalls muss noch mehr Aluminiumoxid zugefügt werden.

Diese Suspension füllt man auf eine wie unter (2) bereite Säule und wäscht so lange mit Methanol (90 %), bis beim Eintropfen in vorgelegte Salzsäure (im allgemeinen 1 ml konz. Salzsäure) keine Rotfärbung mehr auftritt.

4. *Trennung von Anthocyan-Mischkristallen*

Zur Trennung von Mischkristallen in die Einzelpigmente werden über der nach (2) bereiteten Säule ca. 10 ml des zum Waschen benutzten Methanols (90 %) belassen. Hierzu kann man bis zu 300 mg kristallines Anthocyanmischgemisch geben. Nach dem Lösen der Kristalle in der überstehenden Flüssigkeit wirbelt man durch Rühren mit einem Glasstab etwa 3 cm der sich darunter befindenden Aluminiumoxidschicht auf. Sogleich wird auf dem Aluminiumoxid die blaue Farbe des Komplexes sichtbar. Nach dem Einsickern des überstehenden Methanols kann mit dem Auswaschen der Nichtkomplexbildner begonnen werden.

5. *Ablösen der Komplexe von der Aluminiumoxidsäule*

Die auf Aluminiumoxid als Komplexe fixierten Pigmente lassen sich mit salzsaurem Methanol ablösen. Im allgemeinen ist 1 % Salzsäure ausreichend, obwohl niedrigere und höhere Konzentrationen verwendbar sind.

Im Falle der Petuniensorte A 6 verbleibt auch nach längerer Elution mit Methanol (90 %), das 1 % Salzsäure enthält, ein Pigment auf der Säule, das erst durch 2 *N* Salzsäure entfernbar ist. Durch spektroskopische und chromatographische Bestimmungen konnte das Aglykon als Delphinidin erkannt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Anthocyane, die Päonidin oder Malvidin als Aglyka enthalten, bilden ebensowenig wie Pelargonidin-glykoside bei pH 5.0 stabile Aluminiumkomplexe. Daher ist eine schnelle und einfache Trennung von den komplexbildenden Pigmenten (Cyanidin-, Petunidin- und Delphinidin-glykoside) an einer Aluminiumoxidsäule in präparativem Masstab möglich. Bei günstiger Zusammensetzung eines Anthocyanmischgemisches führt die Methode zu chromatographisch reinen, kristallinen Verbindungen. Im Gegensatz zur Verteilungschromatographie können hierbei unbegrenzte Mengen getrennt werden.

SUMMARY

Anthocyanins containing peonidin or malvidin as aglycones, are like pelargonidin-glycosides not able to form stable aluminium complexes at pH 5.0. Therefore a rapid and simple separation of the complex-forming pigments (cyanidin-, petunidin- and delphinidin-glycosides) can be achieved on alumina on a preparative scale. With favourable compositions of anthocyanin mixtures the method yields chromatographically pure and crystalline compounds. In contrast to liquid-liquid partition chromatography, unlimited amounts of material can be separated.

LITERATUR

- 1 L. BIRKOFER UND C. KAISER, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 337.
- 2 L. BIRKOFER, C. KAISER, W. KOCH, M. DONIKE UND D. WOLF, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 631.
- 3 L. BIRKOFER, C. KAISER, M. DONIKE UND W. KOCH, *Z. Naturforsch.*, 20b (1965) 424.
- 4 B. V. CHANDLER UND K. A. HARPER, *Nature*, 181 (1958) 131.
- 5 KUANG C. LI UND A. C. WAGENKNECHT, *Nature*, 182 (1958) 657.
- 6 W. DIEMAIR, W. POSTEL UND H. SENGEWALD, *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.*, 120 (1963) 173.
- 7 P. KARRER UND F. M. STRONG, *Helv. Chim. Acta*, 19 (1936) 25.
- 8 M. K. SEIKEL, in T. A. GEISSMAN, *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Pergamon, Oxford, London, New York, Paris, 1962, S. 37.
- 9 G. M. ROBINSON UND R. ROBINSON, *Biochem. J.*, 25 (1931) 1687.
- 10 E. BAYER, *Chem. Ber.*, 91 (1958) 1115.
- 11 E. BAYER, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1062.
- 12 E. BAYER, K. NETHER UND H. EGETER, *Chem. Ber.*, 93 (1960) 2871.
- 13 F. ARNDT, L. LOEWE UND E. AYÇA, *Chem. Ber.*, 84 (1951) 333; 85 (1952) 1150.
- 14 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- 15 D. HESS UND C. MEYER, *Z. Naturforsch.*, 17b (1962) 853.