

Komplexbildung und Blütenfarben

VON PROF. DR. ERNST BAYER^[*]; MITBEARBEITET VON DR. H. EGETER^[1],
A. FINK, DIPL.-CHEM. K. NETHER^[2] UND K. WEGMANN
CHEMISCHES INSTITUT, UNIVERSITÄT TÜBINGEN

Der Farbstoff der blauen Kornblume, Protocyanin, ist ein Komplex von hohem Molekulargewicht. Eisen(III)- und Aluminium-Ionen bilden mit der Anhydrobase des Cyanins tiefblaue Chelate, die im physiologischen pH-Bereich beständig sind. Solche Komplexe sind auch synthetisch hergestellt worden. Alkalisalze spielen bei blauen Blütenfarben keine Rolle. Die Bildung blauer Komplexe kann durch Maskierung der Metallionen mit stärkeren Komplexbildnern, z.B. Flavonolen, verhindert werden. Auf der Grundlage der Komplexbildung von Anthocyanen läßt sich die Variation der Blütenfarben in breitem Umfang erklären. Bei Delphinidinglykosiden ist die Farbbase oder Anhydrobase auch bei schwach saurem pH beständig.

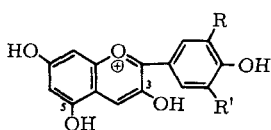
Überraschend wenige Farbstofftypen erzeugen die Vielfalt der Blütenfarben. Neben den auf wenige Pflanzengruppen beschränkten Betacyanen und den für gelbe und orangefarbene Blüten wichtigen Carotinoiden sind hauptsächlich die Anthocyane für das Farbspiel zwischen orange und tiefblau verantwortlich. Anthocyane sind Glykoside der Anthocyanidine.

In der Natur kommen hauptsächlich die Aglykone (1) bis (6) vor, und zwar in Form ihrer Glykoside mit Zuckern an den OH-Gruppen, die an den C-Atomen 3 und 5 stehen. Die Lichtabsorptionsspektren der Aglykone und ihrer Glykoside unterscheiden sich in der Lage ihres längstwelligen Maximums lediglich um maximal 38 m μ .^[3] Dieser Unterschied reicht nicht aus, um alle Farbnuancen in der Natur zu erklären. Es hat deshalb seit den klassischen Arbeiten von Willstätter mehrere Hypothesen zur Deutung der Blütenfarben gegeben.

So hat schon Richard Willstätter^[4] bei der Untersuchung der roten Rose und der blauen Kornblume ein Beispiel dafür gefunden, daß sowohl blaue als auch

rote Blüten das gleiche Anthocyan enthalten können. Aus Blüten von Rosen und Kornblumen hat Willstätter den gleichen Farbstoff, das Cyanin, ein 3,5-Diglucosid des Cyanidins (2) isoliert. Er versuchte^[4], diese Erscheinung damit zu erklären, daß die roten Oxoniumsalze der Anthocyane, die im sauren pH-Bereich beständig sind, im alkalischen Medium (pH > 8) in blaugüne Salze übergehen. Daraus hat R. Willstätter geschlossen, daß in der Kornblume und allgemein in blauen Blüten bei alkalischem pH Alkalisalze von Anthocyanen vorliegen müssen, während in roten Blüten die nur im sauren Medium (pH < 4) beständigen Oxoniumsalze vorliegen sollten. Diese Ansicht ist dann wie ein gesicherter Befund in die Lehrbücher der Organischen Chemie und der Botanik übernommen und darin in einigen Fällen sogar noch in jüngster Zeit wiedergegeben worden^[5-8].

Wenig einleuchtend an dieser Hypothese war das alkalische Milieu in den Blütenblättern. Es ist seit langem bekannt, daß Blütenblätter infolge des Vorkommens von Dicarbonsäuren des Citronensäurecyclus ein schwach saures pH zeigen, in dem Phenolate nicht beständig sein können. Auf diese Tatsache haben 1919 K. Shibata et al.^[9] sowie später G. M. und R. Robinson^[10] hingewiesen. Robinson et al.^[10] nahmen daher an, daß in den blauen Blüten die Anthocyane noch eine Fixierung oder Stabilisierung durch kolloidale Bindung oder „Copigmentierung“ mit anderen Inhaltsstoffen erfahren würden, während Shibata und Hayashi^[9,11] postulierten, daß Erdalkaliverbindungen der Anthocyane für die blaue Farbe verantwortlich seien.



- (1) R = R': H
(2) R: OH; R': H
(3) R = R': OH
(4) R: OCH₃; R': H
(5) R: OCH₃; R': OH
(6) R = R': OCH₃

| Verb. | Name | λ_{\max} (m μ) [a] |
|-------|--------------|------------------------------------|
| (1) | Pelargonidin | 520 |
| (2) | Cyanidin | 535 |
| (3) | Delphinidin | 544 |
| (4) | Päonidin | 532 |
| (5) | Petunidin | 543 |
| (6) | Malvidin | 542 |

[a] in 0,01-proz. methanolischer HCl.

[*] Nach einem Vortrag beim Symposium "Chemistry of Plant Pigments", Universität Aberdeen, 24. September 1965.

[1] H. Egeter, Diplomarbeit, Technische Hochschule Karlsruhe, 1960; Dissertation, Technische Hochschule Karlsruhe, 1962.

[2] K. Nether, Diplomarbeit, Technische Hochschule Karlsruhe, 1959.

[3] J. B. Harborne, Biochem. J. 70, 22 (1958); vgl. auch E. Bayer u. W. Voelter in: Handbuch der Lebensmittelchemie. Springer, Berlin 1965, Bd. I, S. 701.

[4] R. Willstätter u. A. E. Everest, Liebigs Ann. Chem. 401, 189 (1913).

[5] L. F. u. M. Fieser: Organische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim 1965, S. 1468 u. 1469.

[6] K. Freudenberg u. H. Plieninger: Organische Chemie. 10. Auflage, Quelle u. Meyer, Heidelberg 1963, S. 232.

[7] F. Klages: Einführung in die Organische Chemie. 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1965, S. 419.

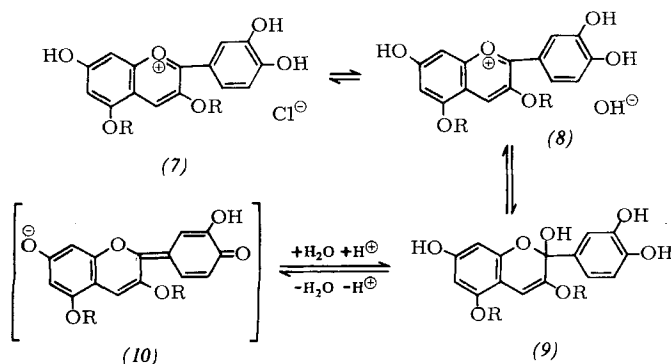
[8] H. Walter: Einführung in die Phytologie. 4. Auflage, Eugen Ulmer, Stuttgart 1962, Teil I, S. 48.

[9] K. Shibata, Y. Shibata u. I. Kashiwaga, J. Amer. chem. Soc. 41, 203 (1919).

[10] R. Robinson u. G. M. Robinson, J. Amer. chem. Soc. 61, 1065, 1606 (1939).

[11] K. Shibata, K. Hayashi u. T. Isaka, Acta phytochim. (Tokio) 25, 17 (1949).

Zwei Beobachtungen führten uns zur Überprüfung der Ursachen für die Blaufärbung von Blüten durch Anthocyane: Wenn man Preßsäfte blauer Blüten, z.B. von Kornblumen (*Centaurea cyanea*) herstellt, haben diese einen pH-Wert zwischen 3,8 und 5,0. In diesem sauren Medium bleibt die blaue Farbe beständig, obgleich kein reines Anthocyan in diesem Bereich eine blaue Farbe aufweist. Nach den Untersuchungen von H. Kuhn und W. Sperling^[12] tritt beim Cyanin erst im alkalischen Medium (pH > 8) ein blaues, mesomerie-stabilisiertes Anion (10) auf. Bei pH ≈ 4 geht das Oxoniumsalz (7) des Cyanins über die unbeständige Farbbase (8) in eine schwach gelbliche Pseudobase (9) über. Die Beständigkeit des blauen Farbstoffs der Kornblume im sauren Medium widerlegt also Willstätters Alkalisalzhypothese.



Auch eine andere Beobachtung zeigt, daß im blauen Farbstoff der Kornblume ein besonderer Bindungszustand vorliegt und nicht einfach ein Alkalisalz des Cyanins: So ist gemeinsam mit K. Wegmann^[13] aus *Coleus hybridus* ein anthocyan-abbauendes Enzym, die Cyaninoxidase, isoliert worden. Dieses Enzym kommt in den grünen Blatteilen vor und fehlt in den roten Blatteilen. Möglicherweise läßt sich das Auftreten von Blutvarietäten im Pflanzenreich durch den mutativen Wegfall dieses Enzyms deuten^[13,14]. Die Cyaninoxidase greift nur Anthocyane an, die am Phenylrest mindestens zwei freie, benachbarte Hydroxygruppen tragen, d.h. die Glykoside des Cyanidins (2), Delphinidins (3) und Petunidins (5).

Cyanin wird nun im pH-Bereich 5 bis 9, also im Existenzbereich der Alkalisalze, von Cyaninoxidase abgebaut (Abb. 1). Nicht abgebaut wird hingegen der

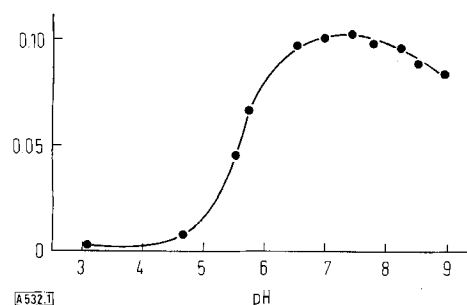


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Aktivität von Cyaninoxidase beim Abbau von Cyanin. Aktivitätsbestimmung nach [13]. Ordinate: Enzymaktivität [mg abgebautes Cyanin/mg Trockensubstanz des Enzympräparates].

[12] H. Kuhn u. W. Sperling, *Experientia* 16, 237 (1960).

[13] E. Bayer u. K. Wegmann, *Z. Naturforsch.* 12b, 37 (1957).

[14] K. Paech u. F. Eberhardt, *Z. Naturforsch.* 7b, 664 (1952).

blaue Kornblumenfarbstoff, obgleich er Cyanin enthält. Daraus läßt sich schließen, daß das Cyanin im Kornblumenfarbstoff in einer speziellen Bindung vorliegen muß, an der die benachbarten Hydroxygruppen im Phenylrest beteiligt sind.

Isolierung und Eigenschaften des nativen Kornblumenfarbstoffes

Eine Lösung des Problems konnte nur die Isolierung des nativen Farbstoffs der Kornblume bringen. Wir haben diesen Farbstoff Protocyanin genannt. Der Name Cyanin (Κυάνεος = blau) ist von Willstätter ursprünglich von der Farbe der Kornblume hergeleitet worden, obgleich das dann isolierte Cyaninchlorid der rote Farbstoff der Rose war.

Bei der Isolierung des Protocyanins aus Gartenkornblumen (*Centaurea cyanea polyphema*) muß die Verwendung starker Säuren vermieden werden, da sonst der Farbstoff zerstört wird. Diese Säurelabilität der blauen Verbindungen dürfte der Grund dafür sein, daß bei der früher üblicherweise mit verdünnter Mineralsäure durchgeführten Extraktion der Blüten immer nur die Oxoniumsalze erhalten worden sind, wodurch die Existenz der Protoanthocyane verborgen blieb.

Zwei überraschende Eigenschaften erleichterten uns die Isolierung des Protocyanins: Der Farbstoff ist nicht dialysierbar, und er wandert im elektrischen Feld bei pH = 4,6 zur Anode, d. h. er kann elektrophoretisch von begleitenden Anthocyanen abgetrennt werden. Cyanin wandert in Acetatpuffer bei pH = 4,6 nicht, wie das Papierelektropherogramm in Abbildung 2 zeigt. Auch

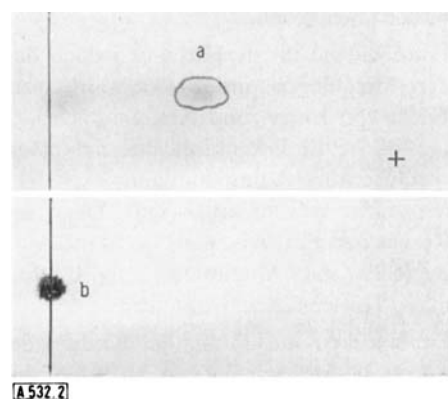


Abb. 2. Papierelektropherogramm von Protocyanin (a) und reinem Cyanin (b) in 0,2 M Acetatpuffer (pH = 4,45). Spannung 110 V; Wanderungszeit: 6 Std. Wanderungsgeschwindigkeit des Protocyanins: 0,7 cm/Std.

dieser Befund spricht gegen das Vorliegen von Alkali- oder Erdalkalisalzen. Die Elektrophorese ist allgemein ein einfaches Verfahren zum Nachweis blauer, komplexer Anthocyanverbindungen, denn unter den angegebenen Bedingungen wandern von den Blütenfarbstoffen lediglich noch die von A. Dreiding et al.^[15] aufgefundenen Betacyane. Da diese jedoch gelb bis rot sind, können sie leicht von den Protoanthocyanen unterschieden werden. Zur Isolierung des Protocyanins

[15] T. J. Mabry, H. Wyler, G. Sassu, H. Mercier, I. Parikh u. A. S. Dreiding, *Helv. chim. Acta* 45, 640 (1962).

werden zerkleinerte Kornblumenblüten ausgepreßt und die tintenblauen Lösungen (pH = 4,6) mit Alkohol versetzt. Die sich innerhalb kurzer Zeit absetzenden blauen Flocken werden von der fast farblosen Lösung abgetrennt. Die in destilliertem Wasser lösliche, blaue Substanz wird mehrmals mit Alkohol umgefällt. Zur Entfernung geringer Mengen Proteine wird die Lösung dann mit Ammoniumsulfat gesättigt. Nach erneuter Fällung mit Alkohol dialysiert man zur Entfernung niedermolekularer Anteile 36 Std. gegen destilliertes Wasser und reinigt das Präparat anschließend durch trägerfreie präparative Elektrophorese. Die Isolierungsoperationen lassen sich abkürzen, wenn man zur Trennung an Sephadexsäulen chromatographiert. Auf diese Weise wird elektrophoretisch einheitliches Protocyanin in tiefblauen Plättchen erhalten. Aus dem Trennverhalten an Sephadexsäulen kann auf ein Molekulargewicht von etwa 20000 bei pH = 6 geschlossen werden. Bei pH = 4,0 wird in der analytischen Ultrazentrifuge eine Diffusionskonstante von $D_{20} = 11,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ bestimmt.

Protocyanin enthält 19,2 % Cyanin und zusammen 1 Äquivalent^[*] Eisen(III) und Aluminium(III) pro mol Cyanin^[16]. Andere Metallionen kommen nach der Spektralanalyse in unseren Präparaten nur in Spuren vor. Protocyanin ist auch in der Hitze beständig. Die hochmolekulare Substanz, die etwa 80 % des Protocyanins ausmacht, ist somit kein Protein. Es handelt sich vielmehr um ein Polysaccharid, das neben Arabinose und Glucose hauptsächlich Galakturonsäuren enthält. Die makromolekulare Komponente ist danach eine pektinähnliche Substanz. Mit diesem Befund wird die Hypothese von G. M. und R. Robinson^[10] bewiesen, daß die Anthocyane an hochmolekulare „Trägerstoffe“ gebunden sein können^[**].

Entscheidend für die Farbe ist jedoch das Vorkommen der Metallionen im Protocyanin, wahrscheinlich in Form von Eisen- und Aluminiumchelaten. Für Gärtner dürfte die Erkenntnis, daß sich blaue Blütenfarben von Eisen- und Aluminiumkomplexen des Cyanins ableiten, nicht verwunderlich sein. Denn es ist ein altes Rezept der gärtnerischen Praxis, rote Hortensien durch Begießen mit Aluminium- oder Eisenaunlösung in blaue Hortensien umzuwandeln.

Zur weiteren Aufklärung der Bindung der Metallionen waren die Herstellung von Modellkomplexen und ein Vergleich ihrer Eigenschaften mit denen des Protocyanins notwendig.

Chelatbildung der Anthocyane

Anthocyane mit mindestens zwei Hydroxygruppen im Phenylrest können qualitativ durch Reaktion mit Eisen(III)-Salzen an der dabei auftretenden Blaufärbung erkannt werden. Durch die Methode der kontinuier-

[*] Während im Protocyanin der Gartenkornblume das Verhältnis Fe:Al etwa 2:1 beträgt, kommt im Protocyanin der Feldkornblume hauptsächlich Fe neben wenig Al vor.

[16] E. Bayer, Chem. Ber. 91, 1115 (1958).

[**] Anmerkung bei der Korrektur: In einer kürzlich zugänglich gewordenen Arbeit haben auch N. Saito u. K. Hayashi (Sci.

lichen Variation^[17] kann nun festgestellt werden, bei welchen molaren Verhältnissen Anthocyan:Metallion Komplexbildung eintritt. Spektroskopische Messungen haben ergeben, daß sich sowohl mit Aluminium- als auch mit Eisen(III)-Ionen verschiedene Komplextypen bilden, und zwar jeweils beim Verhältnis Metallion:Anthocyan = 1:1, 1:2 und 1:3^[16]. Mit zweiwertigen Ionen der Übergangsmetalle bilden sich keine intensiv farbigen Chelate, und auch präparativ kann kein Komplex isoliert werden. Falls die synthetischen und natürlichen Komplexe übereinstimmen, müssen die synthetischen Komplexe mit Eisen- und Aluminiumionen gleichfalls bei pH = 4 bis 6 beständig sein und eine intensive Farbe haben.

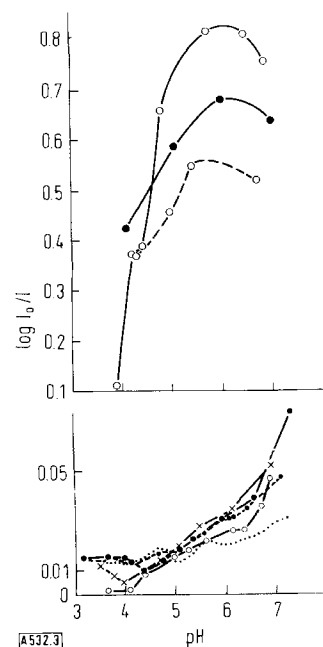


Abb. 3. Oben: pH-Stabilität der Eisen(III)- und Aluminiumkomplexe des Cyanins (o--o bzw. o--o) und des Protocyanins (●--●). Unten: Verhalten des Cyanins in Gegenwart der Acetate von Nickel(II) (x--x), Kobalt(II) (●--●), Calcium (.....), Barium (●--●) und Magnesium (o--o).

Die Konzentration des Protocyanins betrug 0,97 mg in 1 ml 0,2 M Acetatpuffer. Cyanin wurde mit den Metallsalzen im Molverhältnis 1:2 gemischt. Die Gemische wurden in 0,2 M Acetatpuffer aufgenommen, so daß die Cyanin-Konzentration $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ war. Ordinate: Extinktion bei 590 mμ.

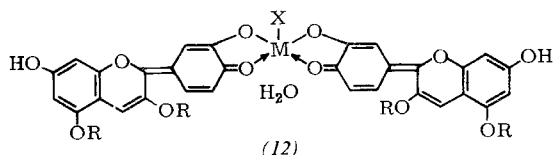
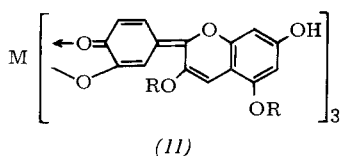
Abbildung 3 zeigt die Absorption der synthetischen Metallkomplexe bei 590 mμ und bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zur Absorption des Protocyanins. Daneben sind Messungen an Komplexen mit zweiwertigen Ionen des Kobalts, Nickels, Calciums, Magnesiums und Bariums wiedergegeben. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß weder Erdalkali- noch Kobalt- oder Nickelkomplexe des Cyanins bei pH = 4 bis 6 beständig und blau sind. Ihre Extinktionen sind vielmehr um nahezu zwei Zehnerpotenzen geringer, d.h. ein blauer Komplex wird nicht gebildet. Das gilt auch für die zweiwertigen Ionen anderer Übergangselemente. Die synthetischen Eisen(III)- und Aluminiumkomplexe weisen dagegen eine tiefe Farbe auf und zeigen ein dem

Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku Sect. B 12, 39 (1965)) das Vorkommen der makromolekularen Komponente im Protocyanin der Feldkornblume bestätigt.

[17] P. Job, Ann. Chim. Phys. 9, 113 (1928).

Protocyanin vergleichbares Verhalten bei Variation des pH-Wertes (vgl. Abbildung 3). Neben Eisen(III) und Aluminium bilden auch Sn(IV), Ti(III), Cr(III) und UO_2^{2+} tiefblaue Chelate, die bei pH = 4 bis 7 stabil sind. Zinn, Titan, Chrom und Uran kommen aber in Pflanzen nur als Spurenelemente vor. Es ist daher nicht zu erwarten, daß außer Aluminium und Eisen noch andere Metalle für die Bildung blauer Blütenfarben eine Rolle spielen.

Die Komplexverbindungen von Cyanin und Cyanidin mit Eisen und Aluminium sind auch präparativ dargestellt worden^[18]. Relativ leicht erhält man die Tri-cyanidino-eisen(III)- oder -aluminium-Komplexe (11a) sowie die Dicyanidino-eisen(III)- oder -aluminium-Komplexe (12a). Beim Cyanin bildet sich bevorzugt der 2:1-Komplex, der außerdem noch ein Anion enthält. Analyse und Konstitutionsaufklärung zeigen, daß sich die Komplexe von der Anhydrobase des Anthocyans ableiten. Die Komplexbildung tritt an den Hydroxygruppen am Phenylrest ein, denn Anthocyane, die keine zwei benachbarten Hydroxygruppen am Phenylrest haben, bilden keine Komplexe. Dieser Befund stimmt



M: Al^{3+} , Fe^{3+} (11a), R: $-\text{H}$ (11b), R: Glucosyl
X: OH^- , Cl^- (12a), R: $-\text{H}$ (12b), R: Glucosyl

mit den oben erwähnten Beobachtungen beim enzymatischen Abbau des Protocyanins überein. Da im natürlichen Protocyanin das Verhältnis Metallion: Cyanin 1:2 beträgt, ist Verbindung (12b) das synthetische

Aceton. Schwarzblaues Chloro-dicyano-eisen(III) fällt aus, wird abgesaugt und mit sehr wenig Methanol gewaschen. Die Substanz ist in Wasser mit tieferer Farbe sehr gut löslich. Ausbeute: 25 mg.

R. Kuhn^[19] hat nach unseren Vorschriften den Aluminiumkomplex (12a) als Farblack in einem einfachen Demonstrationsversuch hergestellt:

Zu 32 mg Cyanidinchlorid in 800 ml Methanol gibt man 100 ml einer dicken Aufschlämmung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ in Methanol. Nach dem Umschütteln setzt sich der kornblumenblaue Aluminiumkomplex ab, und die überstehende Lösung wird farblos. Das $\text{Al}(\text{OH})_3$ ist aus einer heißen wässrigen Lösung von Aluminiumsulfat

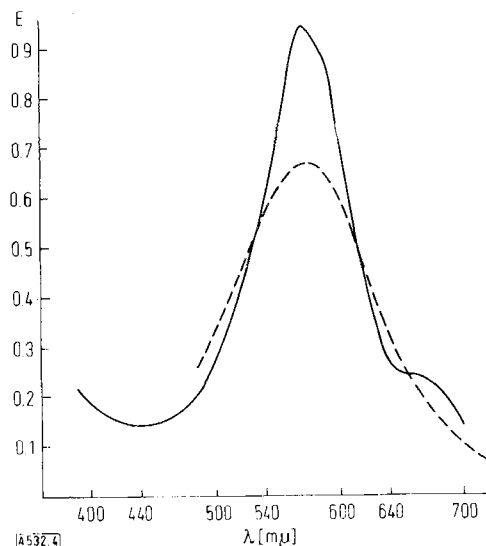
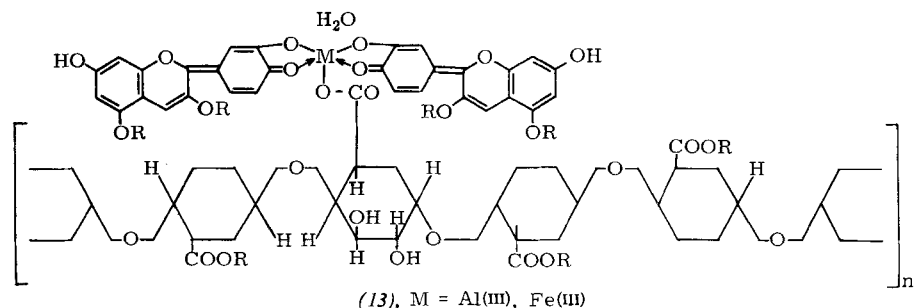


Abb. 4. Lichtabsorptionsspektren des Protocyanins (1,25 mg/ml) — und des Dicyanino-aluminium-Komplexes (0,4 mg/ml) --- in 0,2 M Acetatpuffer, pH = 6,1.

mit konzentriertem Ammoniak zu fällen und mit Wasser bis zur neutralen Reaktion zu waschen. Dann bleibt die Farbe des Al-Komplexes viele Stunden bestehen. Der synthetische Komplex (12b) unterscheidet sich vom natürlichen Protocyanin durch das Fehlen der



Modell für den Kornblumenfarbstoff. In einfacher, für einen Vorlesungsversuch geeigneter Weise läßt sich der Eisenkomplex wie folgt darstellen:

Zu einer Lösung von 65 mg Cyaninchlorid in 50 ml 0,1 N HCl werden 16,2 mg wasserfreies Eisen(III)-chlorid in 2 ml Wasser und genau 52 ml 0,1 N NaOH gegeben. Zur blauen Lösung fügt man etwa 150 ml

[18] E. Bayer, K. Nether u. H. Egeter, Chem. Ber. 93, 2871 (1960).

makromolekulare Komponente. Trotzdem stimmen die Lichtabsorptionsspektren beider Komplexe gut überein (Abbildung 4). Die wenig intensive Schulter des Protocyanins bei 640 mμ ist auch bei den Modellkomplexen, bei denen die Bande bei 570 mμ stark verbreitert ist, angedeutet. Die Polygalakturonsäure dürfte mit ihren Carboxylgruppen koordinativ am Eisenatom an Stelle des Restes X in Formel (12) gebunden sein, so

[19] R. Kuhn, Naturwissenschaften 49, 1 (1962), zit. S. 6.

daß sich die Struktur (13) (Molekulargewicht von etwa 20000) ergeben würde. Tatsächlich kann man aus Äpfelpektin, Cyanin und Eisen(III)- oder Aluminiumchlorid einen tiefblauen, chloridfreien Komplex erhalten.

Unseres Wissens ist das Protocyanin das erste natürlich vorkommende Metallchelate, das an Stelle von Protein ein Polysaccharid als makromolekularen Träger enthält. Neben die Chromoproteide und Metallproteide tritt somit die Klasse der Chromosaccharide.

Die Möglichkeit der Existenz von blauen Rosen

Nach den Untersuchungen beim Kornblumenfarbstoff ist das Auftreten von blauen Blütenfarben durch Komplexbildung zu erklären, während bei roten Blütenfarben die Oxoniumsalze vorliegen. Es sollte demnach theoretisch möglich sein, die von Rosenzüchtern vergeblich gesuchte kornblumenblaue Rose zu erzeugen, indem man das Cyanin der Rose zur Chelatbildung veranlaßt. Bei den Hortensien genügt ja bereits das Begießen der roten Varietät mit Alaunlösung, um den Farbumschlag von rot nach blau zu bewirken. Das Verfahren versagt bei Rosen. Der Blauumschlag in den Blütenblättern von Hortensien geht mit der Zunahme des Aluminiumgehalts einher, wie Tabelle 1 zeigt. Bei Rosen nimmt dagegen der Aluminiumgehalt in den

Tabelle 1. Eisen- und Aluminium-Gehalt der Blütenblätter von Hortensien und Rosen

| | Normale Pflanzen | | Einstellen von Schnittblumen in Alaunlösung (24 Std.) [a] | | Begießen der Pflanzen mit Alaunlösung (7 Tage) [a] | |
|-----------|------------------|--------|---|--------|--|--------|
| | Al | Fe | Al | Fe | Al | Fe |
| Hortensie | 0,17 % | 0,12 % | 0,52 % | 0,20 % | 0,35 % | 0,15 % |
| Rose | 0,41 % | 0,12 % | 0,59 % | 0,14 % | 0,43 % | 0,11 % |

[a] Verwendet wurden 0,1-proz. wäßrige Lösungen von Aluminiumalaun oder Eisenalaun.

Blütenblättern bei gleicher Behandlungsweise nicht zu. Rosen besitzen somit einen „Sperrriegel“, der die übermäßige Konzentration von Metallionen in Blütenblättern verhindert. Aber schon der ohne zusätzliche Anreicherung bereits vorhandene Gehalt an Aluminium und Eisen von 0,12 bis 0,4 % sollte prinzipiell zur Bildung von Cyanin-Komplexen ausreichen. Warum tritt dies nicht ein?

Man könnte dieser Frage ausweichen, indem man postuliert, daß Metallionen und Anthocyan-Oxoniumsalze in verschiedenen, voneinander getrennten Zellbereichen vorkommen. Es wäre aber auch denkbar, daß Al und Fe in den Blütenblättern nicht frei vorliegen, sondern bereits komplex gebunden sind. Wenn andere Komplexbildner stabilere Komplexe bilden, wäre das Ausbleiben der Blaufärbung verständlich. Wir haben nun in Rosen nach solchen Komplexbildnern gesucht. Wir dachten dabei vor allem an die Säuren des Citronensäurecyclus und an phenolische Inhaltsstoffe.

Citrat bildet mit Eisen stabilere Komplexe als Cyanin, was sich am Ausbleiben der Blaufärbung beim Zu-

sammengeben von Cyaninchlorid und Eisen(III)-chlorid in citrat-haltigem Acetatpuffer vom pH = 4,6 zeigen läßt. In den von uns untersuchten Blüten verschiedener Rosensorten waren jedoch keine nennenswerten Mengen Citronensäure nachweisbar. Es mag aber unter den vielen Rosensorten auch solche mit merklichem Citronensäuregehalt geben. Karrer^[20] hat z.B. über das Vorkommen von 2 % Citronensäure in einer Rosensorte berichtet. Die Dicarbonsäuren des Citronensäurecyclus bilden weniger stabile Eisen-Komplexe als das Cyanin.

Es ist seit langem bekannt, daß neben den Anthocyanen in Blütenblättern Glykoside von Flavonolen vorkommen. G. M. und R. Robinson^[10,21] und auch P. Karrer^[20] haben schon angenommen, daß diese Begleitstoffe für die Farbnuancierung eine Rolle spielen könnten. G. M. und R. Robinson^[21] haben bei ihrer „Copolymerisations“-Hypothese besonders auch Flavonole erwähnt, allerdings ohne weitere Untersuchungen auszuführen. P. Karrer^[20] konnte in roten Rosen ein Glykosid des Quercetins (14) nachweisen, machte jedoch keine näheren Angaben über die Zuckerkomponente. Wir konnten das Vorkommen von Quercetinglucosiden in verschiedenen Rosenarten bestätigen. Außerdem fanden wir in roten Rosenblättern auch Glucoside des Kämpferols (15).

Tatsächlich unterbleibt in Gegenwart von Quercitrin die Bildung von Anthocyanchelaten mit Al^{3+} und Fe^{3+} , und aus natürlichem Protocyanin lassen sich die bereits eingebauten Metallionen durch Zugabe von Quercitrin verdrängen, wie die Abnahme der blauen Farbe bei Zugabe steigender Mengen Quercitrin in Abbildung 5

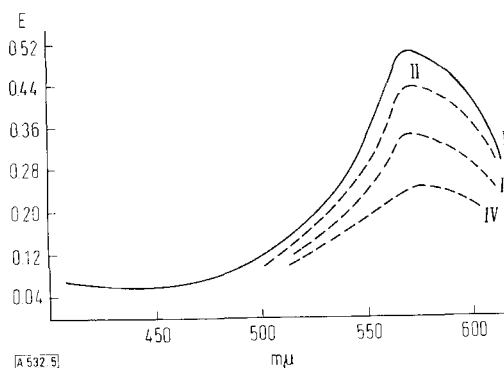
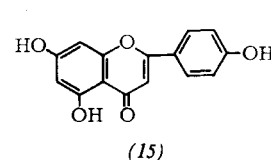
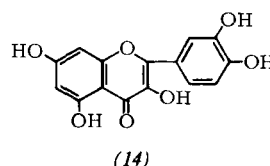


Abb. 5. Austausch von Metallionen zwischen blauem Protocyanin (I) und Quercitrin in Acetatpuffer, pH = 4,5. Cyaningehalt: $3,7 \times 10^{-4}$ M. Kurven: II: Zugabe von $3,7 \times 10^{-4}$ M Quercitrin; III: $1,11 \times 10^{-3}$ M Quercitrin; IV: $1,85 \times 10^{-3}$ M Quercitrin.



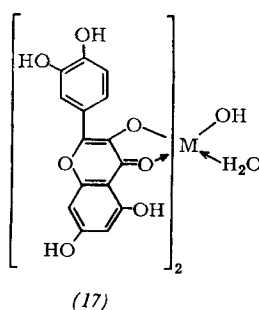
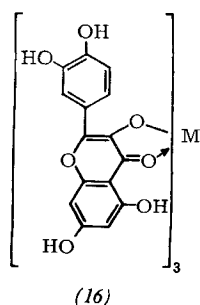
zeigt. Die Metallionen werden vom Flavonolglykosid gebunden, und es bildet sich die Pseudobase (9). Flavonolglykoside könnten also die Aluminium- und

[20] P. Karrer u. K. Schwarz, *Helv. chim. Acta* 11, 916 (1928).

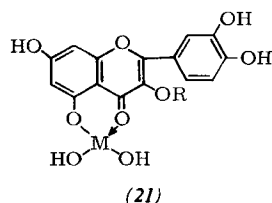
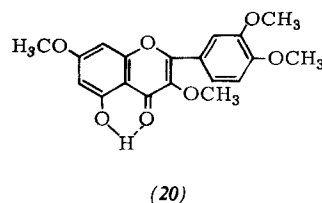
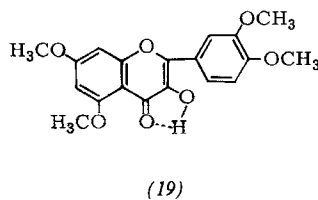
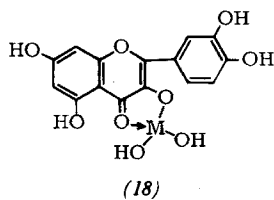
[21] R. u. G. M. Robinson, *Biochem. J.* 25, 1687 (1931); 26, 1663 (1932).

Eisen-Ionen auch in der Rose maskieren, und der Weg zu blauen Rosen müßte demnach in der Züchtung von Pflanzen ohne Flavone und Citronensäure zu suchen sein.

Die im Vergleich mit den Anthocyanen stärkere Komplexbildungstendenz der Flavonole ist auf die Hydroxyketogruppierung zurückzuführen. L. Hörhammer und R. Hänsel^[22,23] haben die Zusammensetzung der Flavonolchelate mit der Methode der kontinuierlichen Variation nach P. Job^[17] eingehend untersucht. Sie konnten nachweisen, daß Flavonole mit freier Hydroxygruppe in 3-Stellung sowohl 1:1- als auch 2:1-Chelate bilden, während man aus Flavonolen mit einem an C-3 glykosidisch gebundenen Zuckerrest nur 1:1-Komplexe erhält. Wir haben die Al- und Fe-Chelate des Kämpferols, Quercetins und Quercitrins isoliert und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von L. Hörhammer und R. Hänsel^[22,23] bei den Aglykonen drei Komplextypen (16)–(18) und bei den 3-Glykosiden nur den 1:1-Komplex (21) erhalten. Die sterische Behinderung durch den Zuckerrest in Nachbarstellung zur Carbonylfunktion führt bei den 3-Glykosiden nur noch zur Anlagerung eines Flavons an das Zentralatom. Den gleichen Effekt hat schon eine Methylgruppe.



So ergibt das 3-Hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavon (19) genau wie Quercetin drei Komplextypen, während sich vom 5-Hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavon (20), wie von den 3-Glykosiden Rutin (21), R = C₁₂H₂₁O₉, und Quercitrin (21), R = C₆H₁₁O₄, nur der 1:1-Typ isolieren läßt.



[22] L. Hörhammer u. R. Hänsel, Arch. Pharm. 285, 438 (1952); 288, 315 (1955).

[23] L. Hörhammer u. R. Hänsel, Z. analyt. Chem. 148, 251 (1955).

Es erhebt sich nun die Frage, ob die Variation der Blütenfarben allgemein durch Chelatbildung erklärt werden kann. Es wäre denkbar, daß die vielen Farbnuancen zwischen tiefblau und rot durch die Mischung von blauen Chelaten mit roten Oxoniumsalzen der Anthocyane hervorgerufen werden.

Wir haben schon erwähnt, daß nur die Glykoside des Cyanidins (2), Delphinidins (3) und Petunidins (5) tiefblaue Chelate bilden. Glykoside des Pelargonidins (1), Päonidins (4) und Malvidins (6) sind dazu nicht in der Lage und sollten daher als Hauptkomponenten lediglich in roten bis violetten Blüten auftreten. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die P. Werckmeister^[24] bei sorgfältigen chromatographischen Untersuchungen der Anthocyangehalte vieler Blüten erhalten hat. An einigen Beispielen sei dies erläutert.

Neben der blauen Kornblume gibt es eine rote Varietät. R. und G. M. Robinson^[10] haben angenommen, daß die rote Farbe durch „Copigmentierung“ mit Chlorogensäure zustande kommt. Das Anthocyan der roten Kornblume ist jedoch nicht das Cyanin, sondern das Pelargonin^[25], ein Glykosid des Pelargonidins (1) mit nur einer Hydroxygruppe im Phenylrest, das keine blauen Komplexe bilden kann.

Die verschiedenen Sorten der Staudenlupine (*Lupinus polyphemos*) zeigen in ihren Blüten alle Farbnuancen zwischen blaßrot, violett und tiefblau. Der aus Preßsäften von blauen Lupinen gewonnene Farbstoff läßt sich nicht dialysieren und ist demnach – wie das Protocyanin der Kornblume – hochmolekular. Die Farbstoffe der roten Lupinen treten dagegen schon innerhalb 30 bis 60 Minuten durch den Dialysierschlauch^[26], Dialysiert man Preßsäfte von violetten Lupinen, so wird die Innenlösung innerhalb einer Stunde blau, d.h. die Farbe der violetten Lupinen wird durch eine Mischung höhermolekularer blauer Chelate mit roten dialysierbaren Oxoniumsalzen hervorgerufen.

Die in verschiedenfarbigen Lupinen gefundenen Anthocyane sind in Tabelle 2 angeführt. In den roten Varietäten sind nur Pelargonidinglykoside vorhanden, die keine blauen Komplexe bilden können. In den blauen Lupinen finden sich Glykoside des Cyanidins und

Tabelle 2. Anthocyane der Lupinen.

| Anthocyan | RF-Wert in Butanol/ Eisessig/Wasser (4:1:5) | Lupinen | | |
|---------------------------|---|---------|-------|----------|
| | | rote | blaue | violette |
| Delphinidin-monoglucosid | 0,19 | — | ++ | ++ |
| Pelargonidin-monoglykosid | 0,39 | ++ | — | — |
| Pelargonin | 0,35 | ++ | — | + |
| Cyanidin-glykosid | 0,24 | — | ++ | + |
| Unbekannt | 0,29 | — | — | + |

[24] P. Werckmeister, Der Züchter 24, 224 (1954).

[25] M. Hadders u. C. Wehmer in G. Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse. Springer, Wien 1932, Bd. III/2, S. 984.

[26] E. Bayer, Chem. Ber. 92, 1062 (1959).

Tabelle 3. Dialysierbarkeit und elektrophoretische Beweglichkeit einiger Blütenfarbstoffe.

| Pflanze | Blütenfarbe | Dialyse des Preßsaftes | Elektrophoretische Beweglichkeit [a] | pH des Preßsaftes |
|--|--------------|--|--------------------------------------|-------------------|
| Krokus (<i>Crocus spec.</i>) | blau | dialysiert nicht in 10 Std. | zur Kathode | 5,75 |
| Märzveilchen (<i>Viola odorata</i>) | blau | dialysiert nicht, blauer Niederschlag nach 10 Std. | zur Kathode | 6,3 |
| Traubenhyazinthe (<i>Muscari botryoides</i>) | blau | dialysiert in 8 Std. | zur Anode | 5,4 |
| Tulpe (<i>Tulipa gesneriana</i>) | rot | dialysiert in 2 Std. | keine | 5,35 |
| Tulpe (<i>Tulipa gesneriana</i>) | dunkelviolet | dialysiert in 2 Std. | keine | 5,25 |
| Schwertlilie (<i>Iris germanica</i>) | blau | Niederschlag nach 1 Std. | — | 5,4 |
| Akelei (<i>Aquilegia coerulea hybrida</i>) | blau | dialysiert nicht in 8 Std. | — | 5,4 |
| Akelei (<i>Aquilegia coerulea hybrida</i>) | violett | violett → blau (in 2 Std.) | — | 5,5 |
| Akelei (<i>Aquilegia coerulea hybrida</i>) | rosa | dialysiert in 2 Std. | keine | 5,6 |
| Stiefmütterchen (<i>Viola tricolor</i>) | blau | dialysiert nicht in 24 Std. | zur Kathode | 5,3 |
| Pfingstrose (<i>Paeonia officinalis</i>) | rot | dialysiert in 5 Std. | keine | 5,0 |
| Rittersporn (<i>Delphinium consolida</i>) | blau | blauer Niederschlag | — | 5,5 |
| Glockenblume (<i>Campanula spec.</i>) | blau | blauer Niederschlag nach 5 Std. | zur Kathode | 5,7 |
| Hornveilchen (<i>Viola cornuta</i>) | blauviolett | blauer Niederschlag nach 1 Std. | — | 6,0 |
| Aster (<i>Aster spec.</i>) | rot | dialysiert in 3 Std. | keine | 5,25 |
| Lobelia (<i>Lobelia spec.</i>) | blau | dialysiert nicht in 10 Std. | zur Anode | 5,85 |

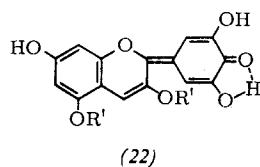
[a] in 0,2 M Acetatpuffer, pH = 4,62, 400 V.

Delphinidins, d.h. starke Komplexbildner. Violette Blüten enthalten sowohl die Pelargonidinglykoside als auch die Delphinidin- und Cyanidinglykoside.

Ähnlich lassen sich die Farben vieler anderer Blüten durch Komplexbildung erklären. In Tabelle 3 sind die Eigenschaften einiger Preßsäfte von Blumen zusammengestellt. Außerdem ist angegeben, ob sich nicht dialysierbare, höhermolekulare Komplexe nachweisen lassen und ob eine Wanderung im elektrischen Feld eintritt.

Grenzen der Komplexbildungstheorie

Die Komplexbildung ist beim Cyanin durch die Isolierung des Protocyanins bewiesen worden. Bei Delphinidinglykosiden tritt, wie schon Willstätter^[27] beobachtet hat, die Entfärbung in verdünnter Lösung zur Pseudobase (9) nicht so leicht ein wie beim Cyanin. In schwach saurem bis neutralem Medium könnte demnach bei Delphinidinglykosiden die violette chinoiden Anhydrobase (22) beständig sein^[12] und blauviolette Farbtöne hervorrufen.



Wir haben daher untersucht, ob im Farbstoff des Rittersporns ein Aluminium- oder Eisenkomplex vorliegt. Dieser Farbstoff ist in Wasser schwer löslich und kann nur mit Dimethylformamid/Wasser (2:1) aus den Blüten extrahiert werden. Der Vergleich der Lichtabsorptionsspektren (Abbildung 6) eines synthetisch hergestellten Delphinin-Aluminium-Komplexes und des Ritterspornfarbstoffes zeigt, daß letzterer um 40 bis 50 mμ kürzerwellig absorbiert und auch eine geringere Extinktion im Maximum der Lichtabsorption zeigt als das Chloro-didelphinino-aluminium. Die Zugabe von Alu-

miniumsalz zum Ritterspornfarbstoff bewirkt eine längerwellige Verschiebung und eine Extinktionserhöhung, da sich dann ein Komplex bildet (Abbildung 6). Primär liegt somit im Ritterspornfarbstoff sicher kein Eisen- oder Aluminiumkomplex vor. Wie Protocyanin

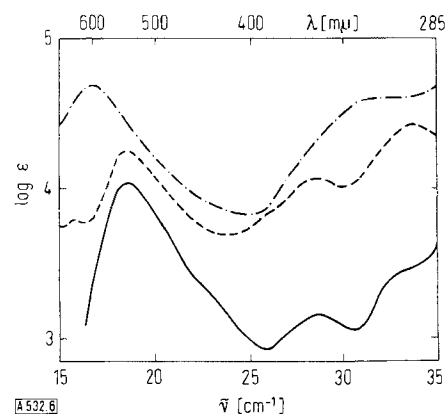


Abb. 6. Lichtabsorptionsspektren von Delphininchlorid in 0,01-proz. methanolischer HCl —, Ritterspornfarbstoff in Acetatpuffer, pH = 4,7, --- und Chloro-didelphinino-aluminium — · — · —.

ist auch der Ritterspornfarbstoff nicht dialysierbar und somit höhermolekular. Wiederum ist ein Polysaccharid daran beteiligt. Neben Glucose und Arabinose enthält es Galakturonsäuren. Metallionen sind im Farbstoff lediglich in Spuren vorhanden. Ihre Menge liegt um eine Zehnerpotenz unter der für das Delphinin äquivalenten Menge. Der Ritterspornfarbstoff ist demnach eine Verbindung zwischen einem pektinähnlichen Polysaccharid und der neutralen „Anhydrobase“ (22) des Delphinins ohne Beteiligung von Metallionen. Diese Bindung des Delphinins an Pektin zu einem nicht dialysierbaren Molekülkomplex kann auch künstlich hergestellt werden: Wenn man zu 19,5 mg aus Rittersporn isoliertem, reinem Delphinin in 50 ml Wasser 400 mg gereinigtes Äpfelpektin fügt, treten nach 20-stündiger Dialyse weniger als 2 % des Delphinins durch den Dialysierschlauch. Gleichzeitig mit dem Pektinzusatz wird die Extinktion erhöht, wie Abbildung 7 zeigt. Das Maximum der Extinktion stimmt im übrigen mit der Lage des Maximums beim Ritterspornfarbstoff über-

[27] R. Willstätter u. T. J. Nolan, Liebigs Ann. Chem. 408, 3 (1915).

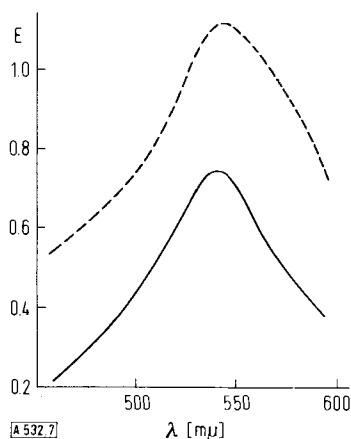


Abb. 7. Erhöhung der Extinktion von Delphinin in Acetatpuffer, pH 4,7, (—) bei Zusatz von gereinigtem Äpfelpektin (---). 18 mg Delphininchlorid wurden in 6 ml 0,1-proz. methanolischer HCl und 2 ml dest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 0,2 M Acetatpuffer (pH 4,7) auf 50 ml aufgefüllt und dann mit Pektin in Acetatpuffer (pH 4,7) versetzt (40 mg auf 18 mg Delphinin). Vor der Messung wurden Vergleichslösung und Probe mit Pektinzusatz 1 Tag stehen gelassen und dann zentrifugiert.

ein. Über die Art der Bindung der Anhydrobase des Delphinins an das Pektin können vorderhand keine exakten Angaben gemacht werden. Es ist möglich, daß Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Cyanin bildet mit Pektinen keine blauvioletten, nicht dialysierbaren Komplexe. Auch das Aglykon Delphinidin zeigt bei Pektinzusatz weder eine Farbvertiefung noch die Bildung einer hochmolekularen, nicht dialysierbaren Verbindung. Diese Ergebnisse können möglicherweise die Beobachtung von K. Hayashi et al. [28] erklären, die aus *Commelina communis* eine blaue Verbindung isoliert haben,

[28] K. Hayashi, Y. Abe u. S. Mitsui, Proc. Japan Acad. 34, 373 (1958); 35, 169 (1959).

die auf 4 mol Delphinidinglucosid 1g-Atom Magnesium enthält. Dem widerspricht, daß zwischen Delphinin oder Delphinidin, wie bei den Cyanidinderivaten, spektroskopisch und beim Versuch zur Isolierung keine Tendenz zur Komplexbildung mit Erdalkali-Ionen in wäßrigem Medium bei pH = 2 bis 9 nachweisbar ist [16, 18, 29]. Die Anlagerung von vier zweizähligen Anthocyanliganden würde für das Magnesium die Koordinationszahl 8 ergeben. Deshalb ist diese Theorie vom komplexchemischen Standpunkt nicht wahrscheinlich. Wenn nun aber beim Commelin, ähnlich wie beim Ritterspornfarbstoff, die blaue Farbe durch die Kombination eines Polysaccharides mit der Anhydrobase des Delphinidindiglykosids zustande käme und das Magnesium lediglich eine schwer abzutrennende Verunreinigung darstellen würde, wären die Widersprüche gelöst. Es ist somit wahrscheinlich, daß K. Hayashi et al. [28] erstmals einen Vertreter dieser höhermolekularen Farbstoffklasse in Händen hatten.

Die Bindung von Anthocyanen an Pektine dürfte auch bei der Färbung von Früchten eine Rolle spielen. So ist schon lange bekannt, daß man den Farbstoff der roten Weintraube durch Zusatz eines pektin-abbauenden Enzyms, z. B. Vinibon [30], besser in Lösung bringt und so einen Rotwein mit intensiverer Farbe erhält.

Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt. Außerdem standen Sachbeihilfen des Fonds der Chemischen Industrie zur Verfügung. Beiden Organisationen sei auch hier für die Förderung unserer Arbeiten herzlich gedankt.

Eingegangen am 31. Mai 1966 [A 532]

[29] E. Bayer, Chimia 16, 333 (1962).

[30] E. Vogt: Der Wein. 3. Auflage, Eugen Ulmer, Stuttgart 1955, S. 129.

Elektronenbrenzen, eine neue Methode zur Analyse kleinster Mengen organischer Substanzen

VON PROF. DR. H. SCHILDKNECHT NACH ARBEITEN MIT DR. F. ENZMANN, DIPL.-CHEM. K. GESSNER, DIPL.-CHEM. K. PENZIEN, DIPL.-CHEM. F. RÖMER UND DR. O. VOLKERT
ORGANISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG

Mit tritiiertem Wasser einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/ml inkubierte organische Verbindungen werden spezifisch fragmentiert. Die β -strahlenden Fragmente lassen sich nach chromatographischer Trennung in geringsten Mengen nachweisen. Chemisch identifiziert, gestatten sie Rückschlüsse auf die fragmentierten Verbindungen, wie Versuche mit Aminosäuren, Estern, Lactonen, Säureamiden, Chinonen, Terpenen, Stickstoff-Schwefel-Heterocyclen und Naturstoffen gezeigt haben.

1. Einleitung

„Die Körper geschickt in ihre Bestandteile zu zerlegen, deren Eigenschaften zu entdecken und sie auf verschiedene Art zusammenzusetzen, ist der Gegenstand und Hauptzweck der ganzen Chemie“. Mit diesen Worten

hat Carl Wilhelm Scheele allen Tätigkeiten des Chemikers die Analyse vorangestellt.

Die älteste Art, organische Stoffe zu zerlegen, war, sie einfach zu erhitzen, d. h. zu brenzen. Inzwischen kennt man mehrere Arten der Energiezufuhr, die zur Spaltung chemischer Bindungen führen. So beobachteten wir, daß