

Struktur und molekulare Stapelung von Anthocyanaen – Variation der Blütenfarben

Von Toshio Goto† und Tadao Kondo *

1914 machte *Willstätter* die überraschende Beobachtung, daß ein Pigment verschiedene Farben hervorbringen kann. So findet sich in der blauen Kornblume und in der roten Rose das gleiche Pigment: Cyanin. Die Vielfalt an Blütenfarben führte *Willstätter* auf unterschiedliche pH-Werte in Lösung zurück. Anthocyan ändert in der Tat die Farbe mit dem pH-Wert: Es erscheint rot in saurer, violett in neutraler und blau in alkalischer wässriger Lösung. *Willstätters* pH-Wert-Theorie zur Erklärung der Blütenfarbenvariation ist immer noch in wichtigen Lehrbüchern der Organischen Chemie zu finden. Vor kurzem jedoch zeigten erneute Untersuchungen, daß die Farbvariation und die Stabilisierung von Anthocyanaen in wässriger Lösung andere Ursachen haben könnten, nämlich Selbstassoziation, Copigmentierung und intermolekulare sandwichartige Stapelung. Die Stapelung käme hauptsächlich durch intermolekulare oder intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen etwa von Anthocyanidinen, Flavonen und aromatischen Säuren zustande. Zusätzlich könnten Wasserstoffbrücken und Charge-Transfer-Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Die interessantesten Molekülkomplexe von Anthocyanaen sind Metalloanthocyane wie Commelinin und Protocyanin (Pigment der blauen Kornblume). Diese rein blau erscheinenden Komplexe bestehen aus jeweils sechs Anthocyan- und sechs Flavonmolekülen sowie zwei Metall-Ionen. Ihr Molekulargewicht beträgt beinahe 10 000. Ein annähernder Strukturvorschlag liegt für Commelinin vor.

1. Einleitung^[1–6]

1.1. Kontroverse um die blauen Blütenfarbstoffe

Schöne Blütenfarben kommen größtenteils durch Anthocyane zustande. Die Erforschung der Anthocyane begann um 1913 mit Untersuchungen *Willstätters*, der gerade seine berühmten Arbeiten über Chlorophyll abgeschlossen hatte. Er bestimmte die Struktur von Cyanin, das aus der blauen Kornblume, *Centaurea cyanus*, isoliert worden war^[7]. Innerhalb weniger Jahre klärte er die Struktur eines Großteils der wichtigen Anthocyan-Aglycone, der Anthocyanidine, auf, die die Farbigkeit der Anthocyane bestimmen.

Wie Lackmus ändert Anthocyan seine Farbe in Abhängigkeit vom pH-Wert: In stark saurem Medium erscheint es orangefarben bis rot, in schwach saurem bis neutralem hingegen purpurrot bis violett. Nur in alkalischen Lösungen schlägt die Farbe nach blau um.

Willstätter führte die Vielzahl von Blütenfarben auf pH-Wert-Unterschiede im Zellsaft der Blüten zurück. In der Tat hatte er Cyanin^[7] sowohl aus der blauen Kornblume als auch aus der roten Rose isoliert. Der japanische Botaniker *Shibata*^[8] stellte diese pH-Wert-Theorie zur Erklärung der blauen Blütenfarbe in Frage, denn es war kaum vorstellbar, daß Zellsaft alkalisch sein könnte^[9]. Stattdessen schlug er 1919^[18] eine Metallkomplextheorie vor. Danach entsteht die blaue Farbe durch die Komplexierung von Anthocyanaen mit Metall-Ionen, etwa Magnesium-Ionen. Als experimentelle Stütze diente ihm unter anderem die Reduktion von Flavo-

nen mit Magnesium und Säure in wasserfreiem Medium, die zu einem blauen Anthocyan-Magnesium-Komplex führt. *Everest*, ein Mitarbeiter *Willstätters*, wandte sich entschieden gegen diese Theorie, ohne neue experimentelle Ergebnisse zu präsentieren. Sie geriet seither fast in Vergessenheit, doch 1957 griff sie *Hayashi*, ein ehemaliger Mitarbeiter *Shibatas*, wieder auf. Aus den tiefblauen Blütenblättern von *Commelina communis* (japanischer Name: Tsuyukusa) (Abb. 1 links) isolierten er und seine Mitarbeiter^[10, 11] ein blaues Anthocyan, Commelinin, in kristalliner Form und berichteten, daß es aus je zwei Molekülen eines Anthocyanins (Awobanin, A) und eines Flavons (Flavocommelin, F)^[12] sowie je einem Magnesium^[13, 14] und Kalium-Ion besteht. Dieses Pigment ist so stabil, daß es die blaue Farbe nicht unmittelbar bei einer pH-Wert-Verschiebung von 7 nach 1 ändert. *Hayashi* et al. erklärten Farbe und Stabilität, indem sie von einem 1:4-Koordinationskomplex aus Magnesium und Flavonoiden (A + F) ausgingen (Abb. 2 oben)^[15]. Einen solchen Anthocyanmetallkomplex nannten sie Metalloanthocyan. *Bayer*^[16] jedoch widersprach dieser Erklärung, da im allgemeinen Magnesium-Ionen im Gegensatz zu Eisen(III)- oder Aluminium-Ionen keine stabilen Chelatkomplexe mit Anthocyanaen bilden.

1958 isolierte *Bayer*^[17] ein weiteres Metalloanthocyan, Protocyanin, aus der blauen Kornblume, *Centaurea cyanus* (Abb. 1 rechts). Er berichtete, daß dieses Pigment zu 19.2% aus Cyanin, zu etwa 80% aus einem Polysaccharid und zudem aus Eisen(III)- und Aluminium-Ionen besteht (Molekulargewicht ca. 6200). Er schlug eine Struktur vor, in der die dreiwertigen Metall-Ionen zwei Cyaninmoleküle sowie Polygalacturonsäure koordinativ binden (Abb. 2 unten)^[16, 18]. *Hayashi* et al. teilten mit^[19], daß sich nach Hydrolyse des von ihnen isolierten Protocyanins folgende Bestandteile nachweisen ließen: Cyanin, ein Flavon, ein Polysaccharid und ein Polypeptid sowie Eisen-, Magnesium- und Kalium-Ionen, nicht aber Aluminium-Ionen. *Asen* und *Jurd*^[20] iso-

[*] Prof. Dr. T. Goto †
Faculty of Agriculture
Nagoya University
Dr. T. Kondo
Chemical Instrument Center
Nagoya University
Chikusa, Nagoya 464 (Japan)



Abb. 1. Links: *Commelina communis* (japanischer Name: Tsuyukusa; links Zuchtform, rechts Wildform). Mitte: Purpurrote Varietät von *Commelina communis*. Rechts: Kornblume *Centaurea cyanus*.

lierten aus Kornblumen ein blaues Pigment, das sich bei ihrer Analyse als Eisenkomplex mit vier Cyaninmolekülen und drei Molekülen eines Flavonoglucosids herausstellte. Da sie annahmen, dieses Pigment unterscheide sich deutlich von Protocyanin, nannten sie es Cyanocentaurin, doch später kam Osawa^[21] zu dem Schluß, daß es identisch mit Hayashis Protocyanin ist.

Commelinin und Protocyanin wiesen zwei überraschende Eigenschaften auf, die sie klar von anderen Anthocyanpigmenten unterscheiden: Sie können nicht dialysiert werden, und bei pH-Werten zwischen 4 und 6 wandern sie bei der Elektrophorese zur Anode. Demnach handelt es sich um hochmolekulare Pigmente mit negativer Ladung^[22].

1931 schlugen Robinson et al.^[23] einen „Copigmentierungseffekt“ von Flavonen und Tanninen vor, der die sichtbare Absorptionsbande von Anthocyanaen bathochrom

verschiebt. Die Copigmentierung verläuft jedoch nur in wässrigen Lösungen nicht stöchiometrisch und ergibt höchstens eine bläulich-violette, doch niemals die rein blaue Farbe von Commelinin und Protocyanin.

1.2. Kontroverse um die Stabilisierung von Anthocyanen

Bislang wurden zahlreiche Anthocyane aus Blüten, Früchten und Blättern isoliert, doch fand man relativ wenig Anthocyanidine, die Aglycone der Anthocyane. In der Natur kommen vor allem die Anthocyanidine Pelargonidin, Cyanidin, Päonidin, Delphinidin, Petunidin und Malvidin vor (Abb. 3). Die am weitesten verbreiteten Anthocyane sind Anthocyanidin-3-glucoside und -3,5-diglucoside^[24]. In stark saurem Medium ($\text{pH} < 2.5$) liegen Anthocyane als sta-



Toshio Goto wurde 1929 in Gifu (Japan) geboren. Er schloß 1952 sein Studium an der Nagoya University ab und wurde 1954 Mitglied des Lehrkörpers am Department of Chemistry der Universität. Von 1957 bis 1959 arbeitete er bei Professor L. F. Fieser am Department of Chemistry der Harvard University. Nach seiner Promotion an der Nagoya University (1960) wurde er 1961 zum Associate Professor ernannt. 1966 wechselte er als Professor für Organische Chemie zum Department of Agricultural Chemistry über. Goto interessierte sich besonders für Strukturaufklärung und Totalsynthese von biologisch wirksamen oder funktionell interessanten Naturstoffen wie Meerestoxinen, Nucleosiden und Gangliosiden sowie für die Chemie der Biolumineszenz und der Blütenfarbstoffe. Im August 1990 erlag er einem Herzinfarkt.



Tadao Kondo, 1941 in Nagoya (Japan) geboren, beendete 1965 sein Studium am Gifu Pharmaceutical College. 1969, nach Absolvierung des Master Course am Department of Agricultural Chemistry der Nagoya University, wurde er Mitglied des Lehrkörpers dieses Instituts, wo er 1973 promovierte. Er arbeitete dann bis 1975 als Postdoktorand bei Professor R. U. Lemieux am Department of Chemistry der University of Alberta, Kanada. 1979 wurde er am Chemical Instrument Center der Nagoya University zum Research Associate ernannt. Kondo beschäftigt sich in erster Linie mit der Synthese von Nucleosiden und Gangliosiden sowie mit der Chemie der Blütenfarbstoffe.

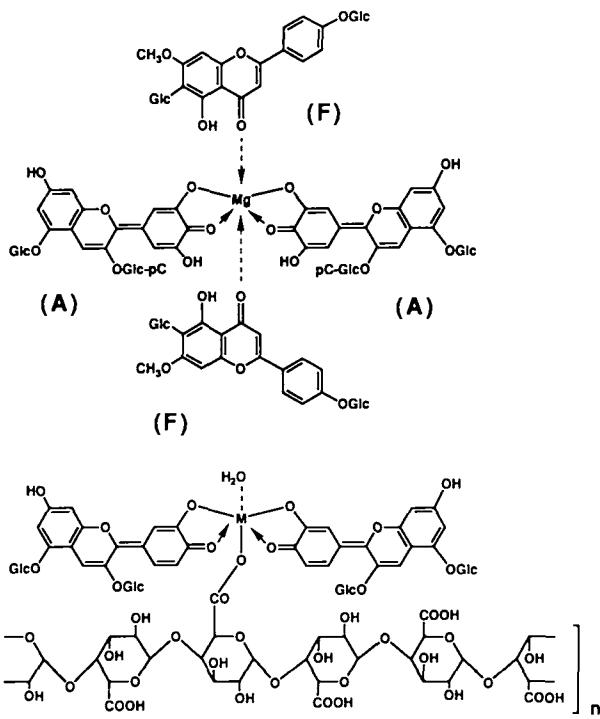
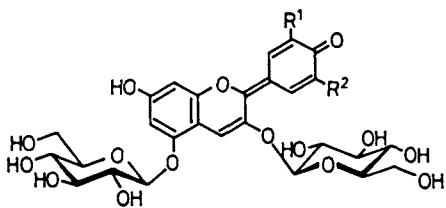


Abb. 2. Oben: Strukturvorschlag für Commelinin von Hayashi et al. [15] (1970). A: Awobanin 5, F: Flavocommelin 3. Unten: Strukturvorschlag für Protocyanin von Bayer et al. [16] (1966). pC bedeutet *p*-Hydroxycinnamoyl.

bile Flavylium-Ionen vor, die normalerweise orange oder rot sind. Wird eine saure Anthocyanslösung auf einen pH-Wert von 4 bis 6 gebracht, bildet sich zunächst die purpurrote Anhydrobase, die jedoch rasch an Farbe verliert und



R ¹	R ²	Anthocyan	Aglycon
H	H	Pelargonin	Pelargonidin
OH	H	Cyanin	Cyanidin
OCH ₃	H	Päonin	Päonidin
OH	OH	Delphin	Delphinidin
OCH ₃	H	Petunin	Petunidin
OCH ₃	OCH ₃	Malvin	Malvidin

Abb. 3. Struktur der häufigsten Anthocyane.

durch Hydratisierung in eine Pseudobase übergeht (Abb. 4)^[4, 25–29]. Da der Zellsaft von Blüten in der Regel schwach sauer ist, dürften Anthocyane im Zellsaft ohne zusätzliche Stabilisierung nicht beständig sein.

Die Copigmentierung übt auf Anthocyane einen stabilisierenden wie auch einen bathochromen Effekt aus. Copigmentierungseffekte lassen sich bei Polyphenolen, z. B. bei Flavonen und Tanninen, beobachten. Sie wurden lange Zeit auf Wasserstoffbrücken zwischen der Wirtverbindung und dem Copigment zurückgeführt^[30–32].

Asen et al.^[30] schlugen 1972 einen weiteren Stabilisierungsmechanismus vor: die Selbstassoziation von Anthocyancyanen. Sie stützten ihre Annahme auf die Beobachtung, daß bei pH 3.16 die Absorption von Cyanidin-3,5-diglucosid bei λ_{\max} auf den dreihundertfachen Wert stieg, wenn die Konzentration von 10^{-4} M auf 10^{-2} M, d. h. auf den hundertfachen Wert, erhöht wurde. Dieses Ergebnis legt die Selbstassozia-

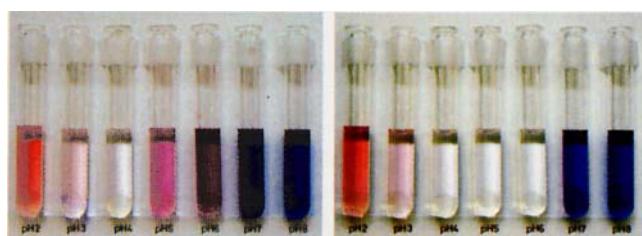
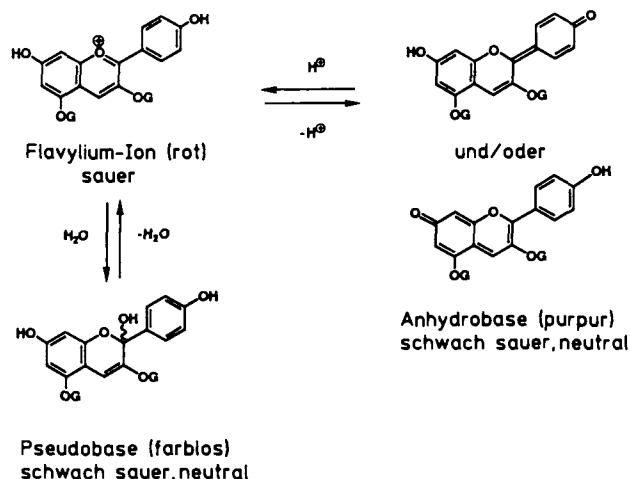


Abb. 4. Oben: Strukturänderung eines Anthocyanins in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert (G = Zuckerrest). Unten links: Malvin in Wasser (5×10^{-5} M) bei mehreren pH-Werten, unmittelbar nach dem Auflösen. Unten rechts: Malvin in Wasser (5×10^{-5} M) bei mehreren pH-Werten, zwei Stunden nach dem Auflösen.

tion des Anthocyanins in Form der Flavylium-Ionen nahe^[6]. In gleicher Weise änderte sich die Absorption im sichtbaren Bereich, wenn die Lösung eines Delphinidinderivats bei pH 6.6 von 8×10^{-3} M auf 8×10^{-5} M verdünnt wurde; das Absorptionsverhältnis $A_{624\text{nm}}/A_{540\text{nm}}$ stieg dabei von 0.58 auf 1.10, das heißt die Lösung wurde intensiver blau^[33]. Eine Erhöhung der Temperatur verursachte eine vergleichbare Änderung. Dies läßt darauf schließen, daß Verdünnung oder Erwärmung die Selbstassoziation der Anthocyane rückgängig macht. Tatsächlich erreicht die Konzentration von Anthocyanaen in vivo 2.4×10^{-2} M^[34, 35].

1.3. Kontroverse um die horizontale Stapelung (Wasserstoffbrücken) und die vertikale Stapelung (hydrophobe Wechselwirkungen)

Selbstassoziation und Copigmentierung wurden in zahlreichen Veröffentlichungen für wahrscheinlich gehalten; die Assoziation wurde allerdings größtenteils auf Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxy- und Carbonylgruppen an den aromatischen Ringen und den Zuckerbestandteilen zurück-

geführt, die eine horizontale Stapelung der Moleküle bewirken^[30, 32, 36].

Bei der Untersuchung der molekularen Anordnung von Commelinin, dem blauen Pigment von *Commelina communis*, dachten wir bereits 1976^[37, 38] an eine vertikale Stapelung von Anthocyan- und Flavonmolekülen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringen, eine Stapelung, die durch darübergelagerte hydrophile Zuckerreste noch weiter stabilisiert wird. Diese Vorstellung wird von Sweeny et al.^[39] gestützt. Einen überzeugenden Beweis für die vertikale Selbstassoziation von Anthocyan-Anhydrosäuren in neutraler Lösung lieferten uns dann Circular dichroismus- und ¹H-NMR-Messungen (Abschnitt 2). In gleicher Weise haben wir Copigmentierungsphänomene, z. B. die Assoziation zwischen Anthocyan und Flavon, untersucht (Abschnitt 4). Wir fanden, daß auch Flavonmoleküle sich vertikal zusammenlagern (Abschnitt 3). Obwohl intermolekulare Verknüpfungen wie Selbstassoziation oder Copigmentierung durch Verdünnung aufgehoben werden, wurden vor kurzem äußerst stabile Anthocyane in verdünnten neutralen wäßrigen Lösungen gefunden. Jedes dieser stabilen Anthocyane enthält pro Molekül zwei oder mehr aromatische Acylsubstituenten. Brouillard und wir schlugen eine vertikale sandwichartige Stapelung von Anthocyanidinen und zwei aromatischen Acylresten vor. Es gibt bereits experimentelle Befunde zugunsten dieses Mechanismus (Abschnitt 7).

Metalloanthocyane wie Commelinin und Protocyanin haben sich als sehr komplexe Moleküle herausgestellt. Wir konnten zeigen, daß sie aus je sechs Molekülen Anthocyan und Flavon sowie zwei Metall-Ionen bestehen; ihr Molekulargewicht liegt bei annähernd 10 000. Sie sind stöchiometrisch zusammengesetzt, was bei der Copigmentierung nicht der Fall ist. Wir gehen davon aus, daß die Anordnung bei den Metalloanthocyanten auf Selbstassoziation und Copigmentierung sowie auf die Komplexierung von Metall-Ionen zurückzuführen ist (Abschnitt 5).

Stabilität und Farbvariation der Anthocyane in wäßrigen Lösungen beruhen also hauptsächlich auf der vertikalen hydrophoben Stapelung (und/oder der Charge-Transfer-Wechselwirkung) von aromatischen Ringen in Flavonoiden und aromatischen Säuren. Die Stapelung kann zudem durch Wasserstoffbrücken zu den darüberlagernden hydrophilen Zuckerresten gefördert werden.

2. Selbstassoziation von Anthocyancen

Zwar gab es bereits Hinweise auf eine Selbstassoziation von Flavylium-Ionen in saurer Lösung, doch konnten erst Hoshino, Matsumoto und Goto durch Circular dichroismus-^[40–42] und ¹H-NMR-Messungen^[43] die Selbstassoziation von Anthocyan-Anhydrosäuren in neutraler Lösung nachweisen. So fanden sie, daß die CD-Kurven der typischen Anthocyanidin-3,5-diglucoside einen intensiven negativen „exciton-type“-Cottoneffekt in den sichtbaren Absorptionsbanden aufweisen, wenn die Anthocyane (in Form ihrer Flavyliumchloride) in recht hoher Konzentration in einem neutralen Puffer (pH 7.0) gelöst werden (Abb. 5 oben). Mindestens zwei Chromophore des Anthocyanins müssen sich vertikal in einer linkshändigen Schraubenachse anordnen,

um diese Art aufgespaltener Banden hervorzurufen. Dieser Befund wird von theoretischen Berechnungen unter Anwendung der Methode der CD-„exciton-type“-Chiralität gestützt^[44]. Die Amplituden von $[\theta]$ werden erheblich vergrößert, wenn die Konzentration erhöht wird, was auf vermehrte Bildung von stapelförmigen Molekülen in stärker konzentrierten Lösungen schließen läßt.

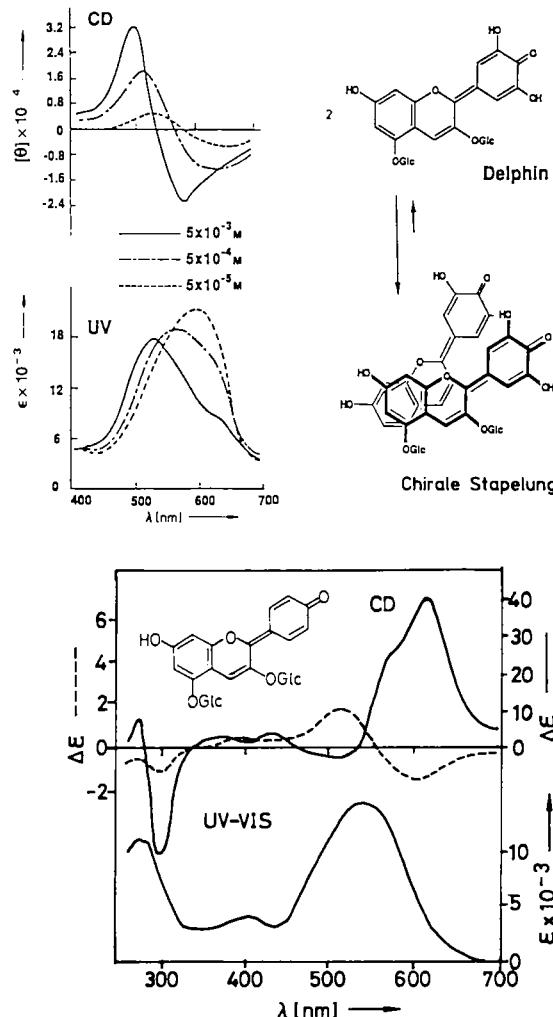


Abb. 5. Oben: Konzentrationsabhängigkeit der CD- und UV-Spektren von Delphinin in neutraler wäßriger Lösung. Unten: CD- und UV-VIS-Spektren von Pelargonin (7×10^{-4} M) in einem 0.05 M Phosphatpuffer bei pH 7.27. CD-Spektren: ... : 2 min nach dem Auflösen; —: unlösliche Partikel, die sich beim Altern bilden. UV-Spektrum: —: 2 min nach dem Auflösen.

Eine Verschiebung des sichtbaren Spektrums hin zu kürzeren Wellenlängen aufgrund der Bildung von chiralen Aggregaten läßt sich ebenfalls bei pH 7.0 beobachten. Die Selbstassoziation der Delphin-Anhydrosäure etwa bewirkt einen beträchtlichen hypsochromen Effekt im sichtbaren Spektrum (Abb. 5 oben) sowie einen intensiven Cottoneffekt^[42]. Dies weist darauf hin, daß Stabilität und Farbvariation dieser Anthocyane in Blütenblättern zumindest teilweise durch Selbstassoziation zustandekommen. Die vertikale Stapelung wurde auch durch ¹H-NMR-spektroskopische Analysen gestützt^[43]. Der hypsochrome Effekt von Malvin in wäßriger Lösung ist nicht nur auf reine Selbstassoziation zurückzuführen. Bei pH 7.0 befinden sich die Anhydrosäure und ihr Anion im Gleichgewicht; die Selbstassoziation unterdrückt

die Ionisierung der Anhydrobasis und bewirkt somit einen hypsochromen Effekt^[45].

Cyanin und Pelargonin verhalten sich entgegen der Norm^[46]. Die zunächst auftretende negative „exciton-type“-Cottonkurve geht allmählich in eine intensive positive „exciton-type“-Cottonkurve mit nicht symmetrischem Verlauf über (Abb. 5 unten). Daraus wurde geschlossen, daß diese Anthocyane allmählich eine Suspension unlöslicher Teilchen bilden, die diese Kurve hervorrufen. Da diese Anhydrobasen sich in Wasser nur wenig lösen, sind größere Partikelaggregate zu erwarten. In einigen Blüten wurden im Zellsaft Pigmentkristalle nachgewiesen^[33, 47–49]. Die Röntgenstrukturanalyse zeigt, daß sich Pelargonidinbromid vertikal gestapelt anordnet^[50].

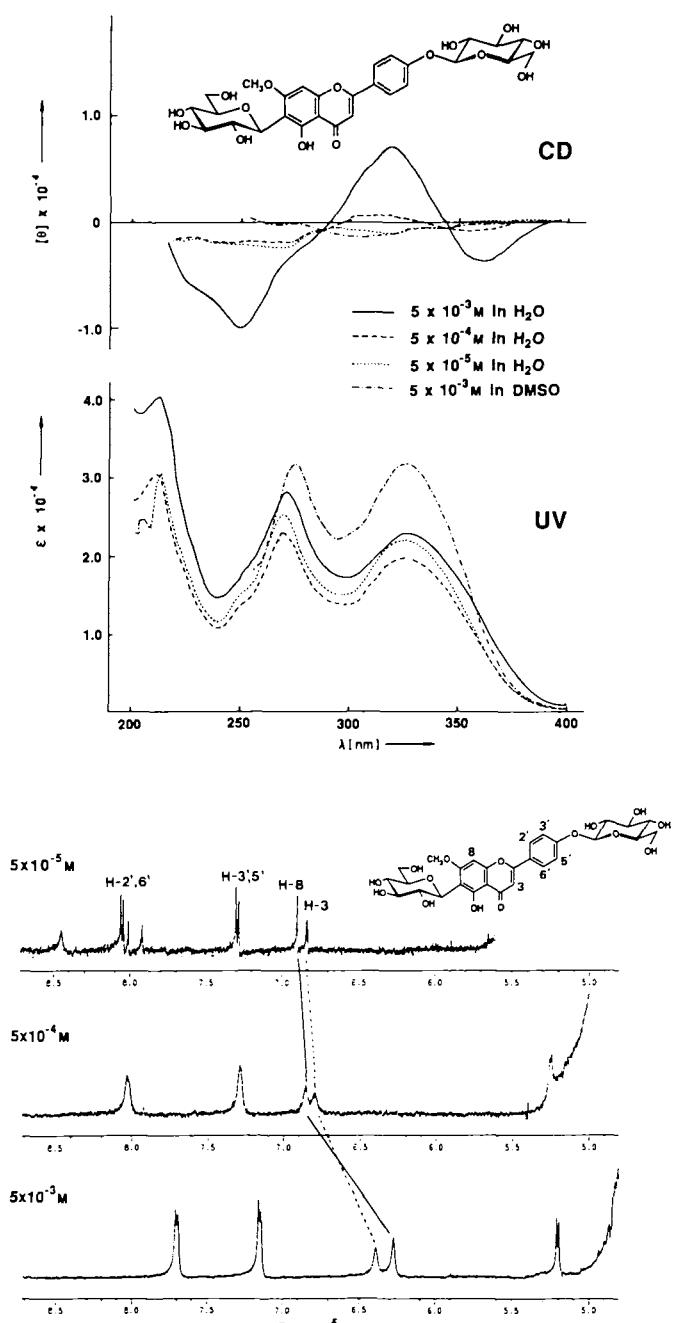


Abb. 6. Oben: CD- und UV-Spektren von Flavocommelin 3 in Wasser bei pH 5.7 und in DMSO. Unten: Konzentrationsabhängigkeit der ¹H-NMR-Signale von Flavocommelin in D₂O bei 30 °C.

3. Selbstassoziation von Flavonen^[51]

In wässriger Lösung hängen sowohl CD- als auch UV-Spektren des Flavons Flavocommelin von seiner Konzentration ab (Abb. 6 oben). Erhöht sich die Konzentration auf 5 × 10⁻³ M, sind recht intensive „exciton-type“-Cottonkurven zu beobachten, ein Hinweis darauf, daß es in wässriger Lösung bei hohen Konzentrationen zur chiralen Selbstassoziation der Flavonmoleküle kommt. Eine solche Stapelung läßt sich auch aus der abnehmenden Absorption im UV-Spektrum und aus der Temperaturabhängigkeit von CD- und UV-Spektren ableiten. In DMSO-Lösungen hingegen ist bei so hohen Konzentrationen wie 5 × 10⁻³ M weder ein Cottoneffekt noch eine Änderung im UV-Spektrum zu beobachten. Auch die NMR-Spektren stützen die Annahme einer solchen Stapelung. Alle Signale der Arenringprotonen werden hochfeldverschoben, wenn die Konzentration der Lösung erhöht wird (Abb. 6 unten), während sich das Signal der anomeren Protonen bei δ = 0.04 kaum ändert. Das weist auf eine vertikale Stapelung der aromatischen Ringe hin, so daß die Arenringprotonen eines Moleküls durch die aromatischen Ringe anderer Moleküle abgeschirmt werden.

4. Copigmentierung von Flavonen mit Anthocyanaen

Seit Robinson und Robinson^[23] 1931 den Copigmentierungseffekt entdeckten, wurde in vielen Arbeiten^[6, 21, 27, 30, 33–35, 44, 52–62] über Copigmentierungen zwischen Anthocyan und Flavon oder anderen Polyphenolen berichtet. Die Copigmentierung^[21] hängt ab von Art und Konzentration des Anthocyans und des Flavons sowie vom pH-Wert und der Temperatur der Lösung. Anthocyane, die eine aromatische Acylgruppe enthalten, bilden mit Flavonen einen sehr viel stabileren Copigmentierungskomplex^[53, 63] als nicht acyierte Anthocyane; Anthocyane mit zwei oder mehr aromatischen Acylgruppen hingegen werden eher durch intramolekulare sandwichartige Stapelung (Abschnitt 7) als durch Copigmentierung stabilisiert. Eine Copigmentierung ist sowohl mit dem Flavylium-Ion als auch mit der Anhydrobasis möglich. Sie verläuft nur in Lösung nicht stöchiometrisch und ergibt höchstens eine bläulich-violette Farbe, nie jedoch ein reines Blau^[44]. Die Copigmentierung verschiebt nicht nur das Absorptionsmaximum von Anthocyan im sichtbaren Bereich bathochrom, sondern erhöht auch in großem Maße die Absorptionsfähigkeit (Stabilisierung) (Abb. 7 oben).

Lange Zeit erklärte man sich den Copigmentierungseffekt durch Wasserstoffbrücken zwischen der Wirtverbindung und dem Copigment, die eine horizontale Stapelung herbeiführen^[30–32, 36]. Wir wiesen darauf hin^[37, 38] (siehe auch^[64]), daß die Copigmentierung in wässriger Lösung durch hydrophobe Stapelung der aromatischen Ringe von Anthocyan und Flavon entsteht (vertikale Stapelung; auch Charge-Transfer-Wechselwirkung^[65] könnte eine Rolle spielen) (Abb. 7 unten). Diese hydrophobe Stapelung könnte durch die darüberliegenden hydrophilen Zucker noch stärker stabilisiert werden (Wasserstoffbrücken). Ein Beispiel dafür ist der im folgenden beschriebene Mechanismus, der die Farbigkeit der purpurroten Blüten von *Commelinia communis* hervorruft^[66].

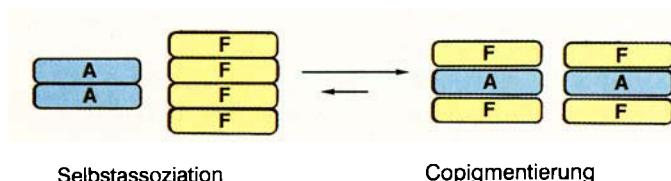
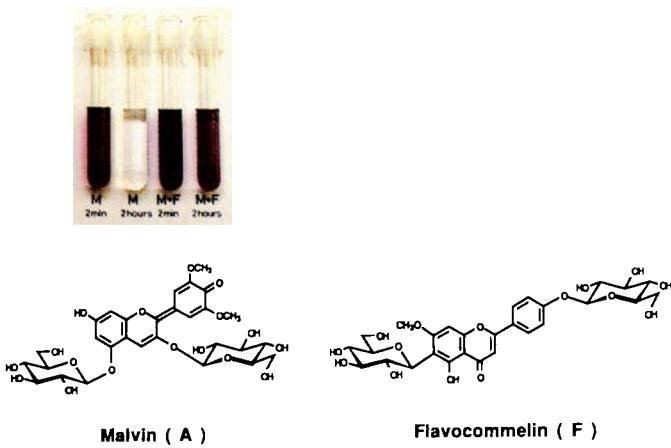
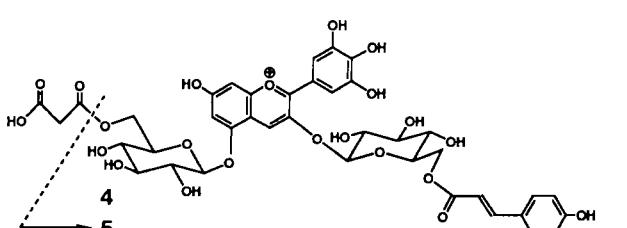
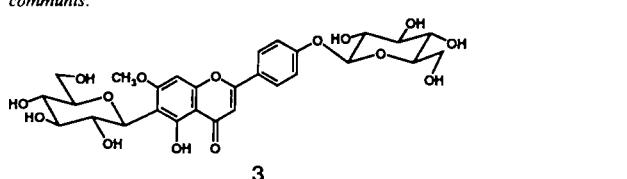
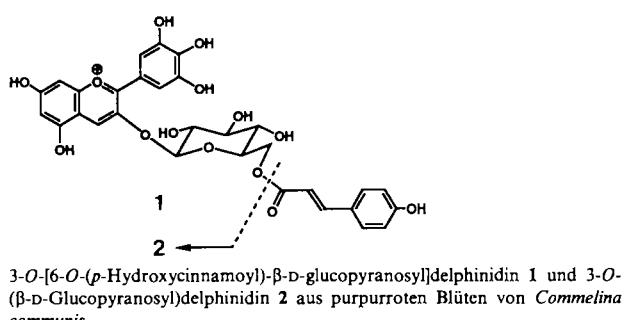


Abb. 7. Oben: Copigmentierung von Flavocommeline und Malvin in Wasser bei pH 6.0 (Malvin: 5×10^{-5} M; Flavocommeline: 5×10^{-4} M). Unten: Copigmentierungseffekt von Flavocommeline und Malvin.

Die purpurrote Varietät von *Commelina communis* (Abb. 1 Mitte) unterscheidet sich von der üblichen blaublühenden Form (siehe Abschnitt 5)^[67]. Daß auch Blumen mit mehrfarbigen Blütenblättern, z. B. halb blau, halb purpurrot, gefunden wurden, zeigt, welch enge Beziehung zwischen den blauen und den purpurroten Pigmenten bestehen muß. Die purpurroten Blütenblätter enthalten zwei Anthocyane, 1 und 2, sowie Flavocommeline 3, blaue Blüten hingegen Malonylawobanin 4 und Flavocommeline 3.



Preßsaft aus den purpurroten Blütenblättern hat im sichtbaren Bereich ein Absorptionsmaximum bei 580 nm, während beim gleichen pH-Wert (pH 5.7) das Absorptionsmaximum der Anthocyane 1 und 2 bei 530 bzw. 540 nm liegt, was auf Copigmentierung mit dem Flavon Flavocommeline hinweist. Der Zusatz von drei Äquivalenten Flavocommeline 3 verschiebt das Absorptionsmaximum von 1 und 2 um 30 bzw. 40 nm zu längeren Wellenlängen. Nach Zugabe des Flavons steigen zudem die Absorptionsintensitäten stark an, während im CD-Spektrum die Cottoneffekte nachlassen. Das sichtbare Spektrum des Preßsaftes aus purpurroten Blütenblättern stimmt weitgehend mit dem einer Mischung aus den Anthocyanaen 1 und 2 sowie Flavocommeline 3 überein (Abb. 8). Die purpurrote Färbung der Blütenblätter kommt

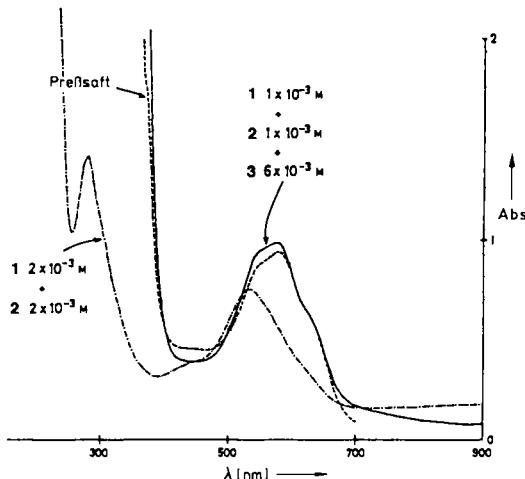


Abb. 8. Copigmentierungseffekt von Flavocommeline 3 und den Anthocyanaen 1 und 2, um die purpurrote Farbe der *Commelina-communis*-Varietät nachzuahmen. ---: Preßsaft aus purpurroten Blütenblättern, pH 5.8; - - -: 1 und 2 in 0.02 M Acetatpuffer, pH 5.8; —: 1, 2 und 3 in 0.02 M Acetatpuffer, pH 5.8.

also durch Copigmentierung der Anthocyane 1 und 2 mit Flavocommeline 3 zustande. Das Verschwinden des Cotton-effekts im sichtbaren Bereich legt eine vertikale sandwichartige Stapelung durch hydrophobe Wechselwirkung nahe. Charge-Transfer-Wechselwirkungen zwischen Anthocyan und Flavon könnten zum bathochromen Effekt beitragen.

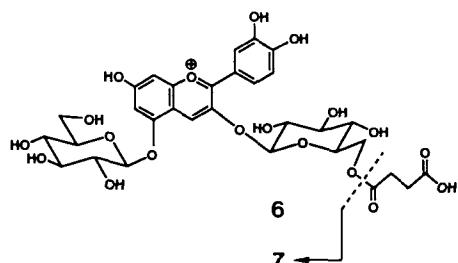
5. Metalloanthocyane: Commelinin und Protocyanin^[44]

5.1. Struktur der Bestandteile

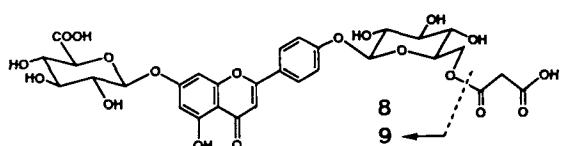
Bisher wurden lediglich zwei Metalloanthocyane isoliert: Commelinin und Protocyanin. Das Pigment der Hortensie (*Hydrangea*) könnte ebenfalls zu dieser Gruppe gehören^[59, 60].

Da sich Commelinin bei der Elektrophorese zur Anode bewegt^[22, 68], muß es mindestens eine negative Ladung tragen. Lange Zeit war dies unerklärlich, da weder Awobanin (A) 5 noch Flavocommeline (F) 3 noch das Magnesium-Ion negativ geladen sind. Später stellte sich heraus, daß Malonylawobanin (M) 4^[69, 70], das einen Malonsäurerest enthält, als Anthocyan in der Blüte vorliegt. Folglich ist Awobanin (A) 5 ein Artefakt, das erst bei der Extraktion entsteht.

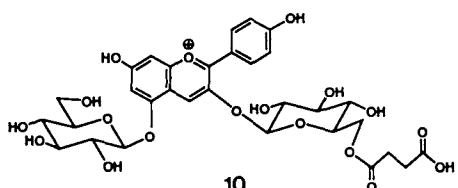
Aus der Kornblume isolierten Willstätter et al. Cyanin 7^[7], das man für den Anthocyanbestandteil des blauen Pigments Protocyanin hielt; Takeda et al.^[71] und wir^[72] fanden jedoch 1983, daß das tatsächlich auftretende Anthocyan Succinylcyanin 6 ist, das ähnlich wie Malonylawobanin 4 eine Carboxygruppe enthält. 1974 isolierten Asen et al.^[73] ein Flavon aus der Kornblume, dessen Struktur sie als Api-



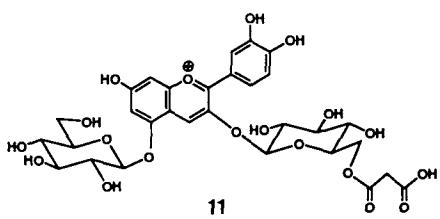
Succinylcyanin 6 und Cyanin 7 aus blauen Blüten von *Centaurea cyanus*.



Das Malonylflavon 8 und Asen's Flavon 9 aus *Centaurea cyanus*.



Succinylpelargonin 10 aus rosafarbenen Blüten von *Centaurea cyanus*.



Malonylcyanin 11 aus karmesinroten Blüten von *Centaurea cyanus*.

genin-4'-*O*-glucosid-7-*O*-glucuronid 9 bestimmten, doch auch dieses Molekül stellte sich als Artefakt heraus. Das echte Flavon 8 wies zusätzlich einen Malonsäurerest im Molekül auf^[72]. Die rosafarbenen Blüten von *C. cyanus* enthalten Succinylpelargonin 10^[74], die karmesinroten Malonylcyanin 11 und Succinylcyanin 6^[75] (Abb. 1 rechts).

5.2. Molekulare Zusammensetzung der Metalloanthocyane

Laut Hayashi und Takeda^[15] besteht Commelinin aus je zwei Molekülen Awobanin (A) 5 und Flavocommelin (F) 3 sowie je einem Magnesium-^[76] und Kalium-Ion; höhermolekulare Bestandteile wie Polysaccharide und Polypeptide konnten nicht nachgewiesen werden. Diese Autoren schlugen einen Koordinationskomplex aus Magnesium und vier Flavonoidmolekülen vor (Abb. 2 oben). Später fanden wir^[69], daß Malonylawobanin (M) 4 das beteiligte Anthocyan ist.

Bei der Elektrophorese einer älteren Commelininprobe ergaben sich aus unerklärlichen Gründen mehrere blaue Punkte (Abb. 9 rechts)^[22, 69]. Wir stellten fest, daß aus frischen Blütenblättern gewonnenes oder aus M, F und Magnesium-Ionen synthetisiertes Commelinin nur den Punkt ergab, der sich am raschesten bewegte, und daß Pigmente, die aus M, A, F und Magnesium-Ionen hergestellt wurden, in gleichen Abständen sieben blaue Punkte erzeugten (Abb. 9 links). Aus A, F und Magnesium-Ionen synthetisiertes Commelinin ergab nur den am langsamsten wandernden Punkt. Dieser Befund zeigt, daß Commelinin pro Molekül jeweils sechs Moleküle M und F enthält (Molekulargewicht etwa 9500)^[77]. Das durch analytische Ultrazentrifugation bestimmte Molekulargewicht beträgt etwa 10 000.

Unabhängig voneinander beschrieben Bayer et al.^[16] und Hayashi et al.^[19] Protocyanin als Komplex aus Cyanin, einem Flavon, Polysacchariden und/oder Polypeptiden sowie Metall-Ionen wie Eisen und Aluminium (Bayer) oder Eisen und Magnesium (Hayashi). Bayer schlug eine Struktur vor, die Polygalacturonsäure (Abb. 2 unten) enthält und in der zwei Anthocyane und das Polysaccharid ein Metall-Ion chelatisieren.

Wir^[44] erhielten von Makromolekülen freies natürliches Protocyanin. Es bestand aus Succinylcyanin 6, dem Malonylflavon 8 sowie Eisen- und Magnesium-Ionen. Ein Pigment, das aus diesen Bestandteilen synthetisiert wurde, war identisch mit dem natürlichen Pigment und enthielt im Mittel je sechs Moleküle Succinylcyanin 6 und Malonylflavon 8 und je ein Eisen- und Magnesium-Ion. Die Zusammensetzung ist also jener von Commelinin sehr ähnlich, was eine ähnliche Struktur nahelegt.

5.3. Beweise für Flavonoidstapelung in Commelinin

Aus dem intensiven „exciton-type“-Cottoneffekt in der sichtbaren Absorptionsbande (Abb. 10 oben) geht hervor,

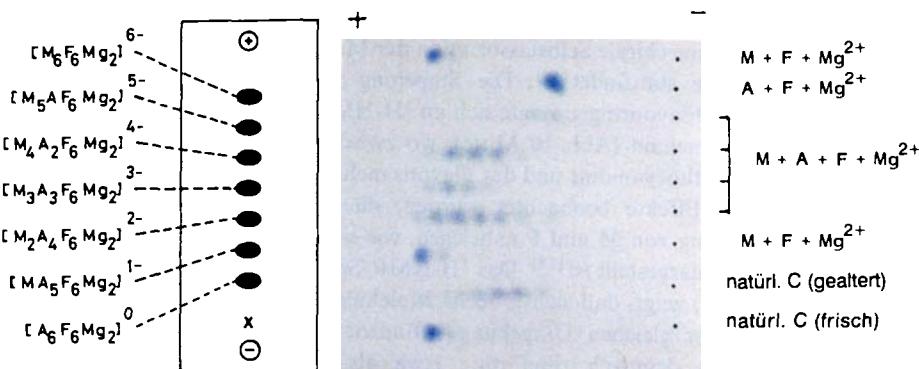


Abb. 9. Links: Schematische Darstellung der Elektrophorese von Commelinin und ähnlichen Pigmenten. Rechts: Elektrophorese von natürlichem und synthetischem Commelinin und ähnlichen Pigmenten. Bedingungen: Cellulose-Aacetat-Folie, 0,02 M Acetatpuffer bei pH 5,7. M = Malonylawobanin 4; F = Flavocommelin 3; A = Awobanin 5; C = Commelinin (Alterung: Ein Jahr bei Raumtemperatur).

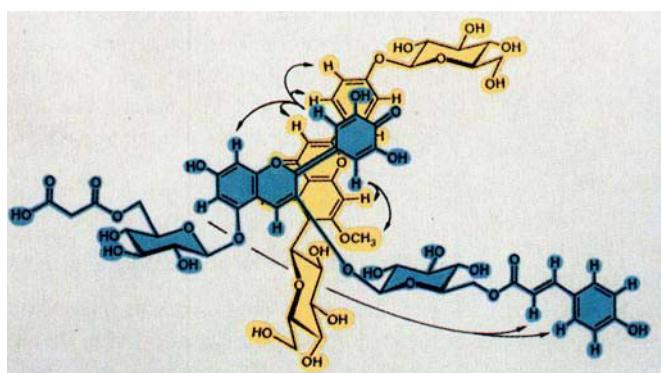
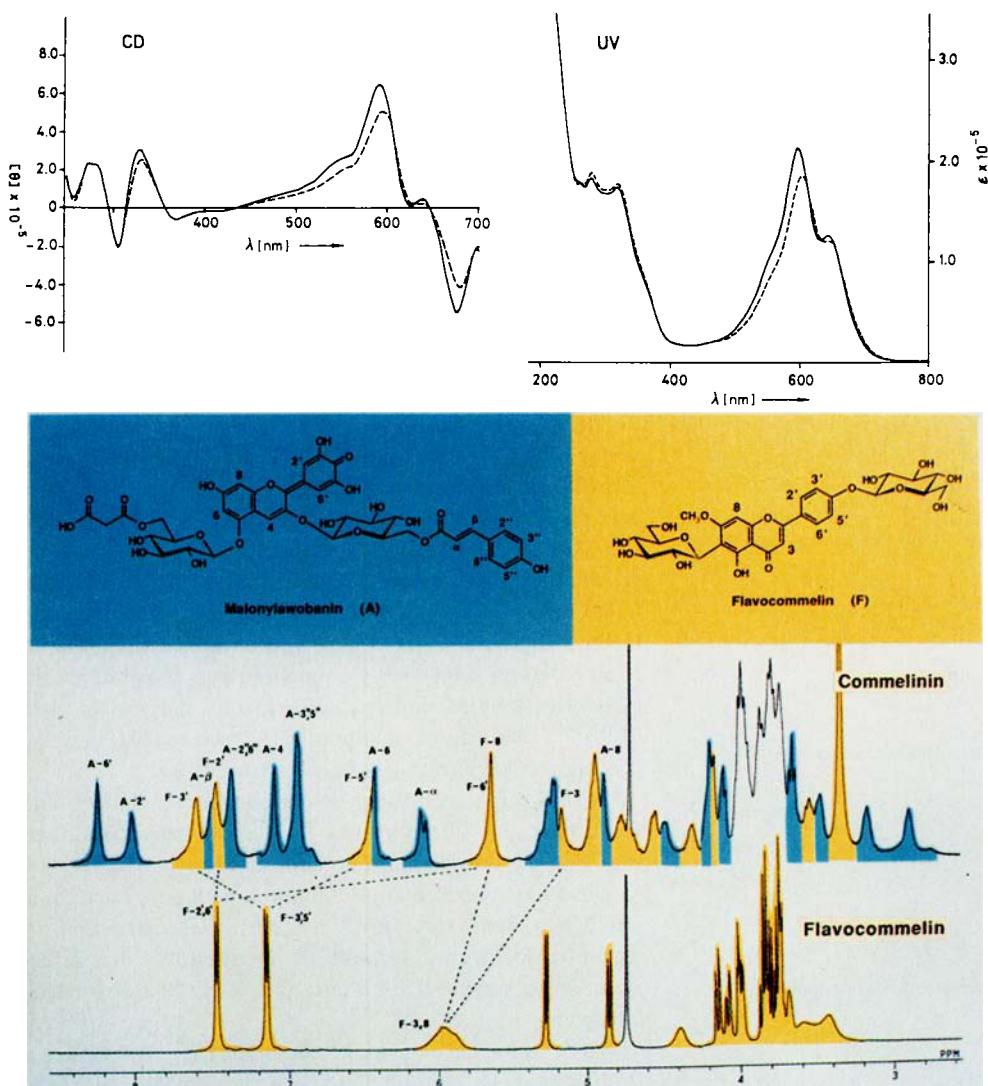


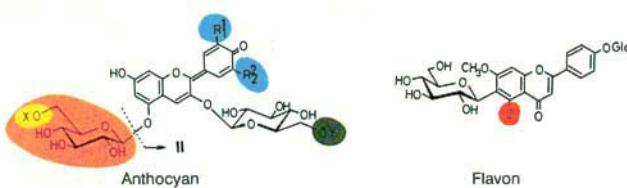
Abb. 10. Oben: CD- und UV-Spektren von Commelinin. —: Commelinin; - - -: Commelinin-ähnliches Pigment aus Awobanin 5, Flavocommelin 3 und einem Magnesium-Ion. Mitte: ^1H -NMR-Spektren von Commelinin und Flavocommelin in D_2O . (Das Anthocyanidin Malonylawobanin ist hier ausnahmsweise mit A abgekürzt.) Unten: Stapelungsmuster von Malonylawobanin und Flavocommelin in Commelinin. Blau: Malonylawobanin 4; gelb: Flavocommelin 3 (die Pfeile bedeuten negative NOEs zwischen den Protonen von 4 und 3).

daß in Commelinin eine chirale Selbstassoziation der Malonylawobaninmoleküle stattfindet^[44]. Die Stapelung von Anthocyanidin- und Flavonringen zeigte sich im ¹H-NMR-Spektrum von Commelinin (Abb. 10 Mitte), wo zwischen den Protonen des Anthocyanidins und des Flavons mehrere Nuclear-Overhauser-Effekte beobachtet wurden, die die kreuzweise Anordnung von **M** und **F** nahelegen, wie sie in Abbildung 10 unten dargestellt ist^[78]. Das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 10 Mitte) zeigt, daß sich je sechs Moleküle **M** und **F** jeweils in der gleichen Umgebung befinden: die Flavonoide könnten demnach ringförmig etwa als cy-

clo(–**MMFFMMFFMMFF**–) angeordnet sein. Ein deutliches Zeichen für die vertikale Stapelung von Flavocommelin mit anderen aromatischen Ringen sind die starken Verschiebungen der Signale aromatischer Protonen von Flavocommelin in Commelin zu höherem Feld (Abb. 10 unten)^[78].

5.4. Strukturvorschlag für Commelinin

Es ist bekannt, daß Anthocyane mit *o*-Dihydroxy-Gruppen im B-Ring mit dreiwertigen Metall-Ionen wie Eisen(III)



	R ¹	R ²	X [a]	Y [b]	Z	Komplexbildung
4	I	OH	OH	Mal	pC	3 OH Ja (Commelinin)
5	I	OH	OH	H	pC	3 OH Ja
	I	OH	H	Mal	pC	3 OH Ja
	I	H	H	Mal	pC	3 OH Nein
4	I	OH	OH	Mal	pC	OCH ₃ Ja
	I	OH	H	H	Suc	3 OH Ja
	II	OH	OH	-	pC	3 OH Nein
	II	OH	OH	-	H	3 OH Nein

[a] Mal = Malonyl. [b] pC = *p*-Hydroxycinnamoyl. Suc = Succinyl.

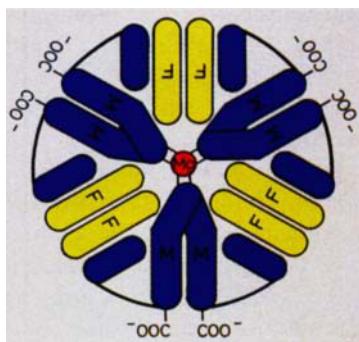
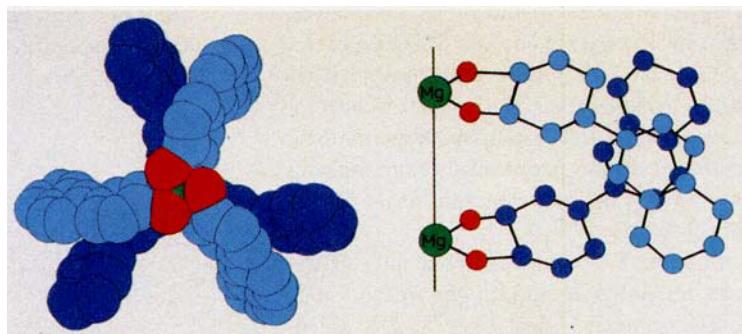


Abb. 11. Oben links: Bildung von Commelinin-ähnlichen Komplexen in Anwesenheit von Magnesium-Ionen. Oben rechts: Vorschlag für die Grobstruktur von Commelinin (ein weiteres Magnesium-Ion befindet sich unter dem gezeigten; beide Magnesium-Ionen sind oktaedrisch koordiniert). M: Malonylawobanin 4; F: Flavocommelin 3. Unten: Anordnung von sechs Anthocyanidinskeletten im Commelininmolekül. Links: Blickrichtung entlang der *c*-Achse; rechts: Blickrichtung senkrecht zur *c*-Achse. Der Vorschlag basiert auf der vorläufigen Analyse der Röntgenstrukturdaten.



und Aluminium einen blauen Chelatkomples bilden; zweiwertiges Magnesium hingegen ist dazu nicht in der Lage^[16]. Hayashi und Takeda^[15] schlugen a priori eine Struktur für Commelinin (Abb. 2 oben) vor, in der Magnesium-Ionen mit der *o*-Dihydroxy-Gruppe im B-Ring von Awobanin (A) 5 einen Chelatkomples bilden. Um die wesentlichen Bindungsstellen für die Magnesium-Ionen zu finden, haben wir geprüft, ob man mit abgewandelten Bestandteilen ein Commelinin-ähnliches Pigment herstellen kann (Abb. 11 oben links). Weder die Malonyl- und die *p*-Hydroxycinnamoyl-Gruppe von Malonylawobanin (M) 4 noch die Hydroxygruppe an C-5 von Flavocommelin (F) 3 sind wesentlich. Da zumindest die *o*-Dihydroxy-Gruppe im B-Ring notwendig ist, um eine ähnliche Art von Komplex zu erhalten, könnte es sein, daß das Metall-Ion an dieser Position chelatisiert wird^[44].

Commelininkristalle^[15] und Cadmiumanaloga von Commelinin^[13] wurden von Hayashi und Takeda hergestellt und von Y. Saito et al.^[179] durch Röntgenstrukturanalyse untersucht. Die Struktur konnte zwar nicht vollständig gelöst werden, doch wurden folgende Kristallstrukturdaten ermittelt: trigonal, $a = 31.251$, $c = 33.675 \text{ \AA}$, Raumgruppe $P\bar{3}21$, $Z = 12(?)$ (AF als eine Einheit), $V = 28529 \text{ \AA}^3$. Dieser Kristall weist eine dreizählige Symmetriearchse auf; das Commelininmolekül müßte also eine dreizählige Symmetrie haben. Anhand dieser Kristallstrukturdaten und der oben beschriebenen Ergebnisse schlugen wir für Commelinin die Struktur vor, die in Abbildung 11 oben rechts gezeigt ist^[1, 44]. Man erhält die Anordnung $[M_6F_6Mg_2]^{6-}$, indem drei M_2F_2 -Einheiten um die *c*-Achse gelagert und zwei Magnesium-Ionen

ins Zentrum gebracht werden. Zwei copigmentierte MF-Einheiten werden durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen den beiden Anthocyanmolekülen chiral fixiert und bilden somit die Einheit FMMF; eine intensive „exciton-type“-Cottonbande belegt die chirale Stapelung der beiden Anthocyane. Drei FMMF-Einheiten sind durch Chelatisierung mit zwei Magnesium-Ionen doppelt verbunden. In Abbildung 11 unten ist ein detaillierterer Vorschlag für die Stapelung der Anthocyanidinringe wiedergegeben, den wir aus der vorläufigen Analyse der Röntgenstrukturdaten von Y. Saito et al.^[179] entwickelt haben.

6. Struktur der polyacylierten Anthocyane

6.1. Allgemeines

Trotz der großen Anzahl von isolierten natürlichen Anthocyane weiß man noch wenig über ihre genaue chemische Beschaffenheit, da bislang die Strukturbestimmungen zu meist durch Hydrolyse oder oxidativen Abbau zu Fragmenten durchgeführt wurden. So sind die Konfiguration der Zucker am anomeren Zentrum und ihre Ringgröße meistens ebenso wenig bekannt wie die Bindungsstellen der Acylgruppen bei Anthocyane und die Konfiguration der Doppelbindung bei 3-Phenylpropensäurederivaten. ¹H-NMR- und massenspektrometrische Analysen schienen erfolgversprechend für die Strukturaufklärung komplizierter natürlicher Anthocyane zu sein, doch gab es hierzu keine Untersuchun-

gen, bis wir 1978 zum ersten Mal $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von acylierten Anthocyanaen veröffentlichten^[70, 80] (siehe auch^[81]). Die Schwierigkeit, analysierbare NMR-Spektren zu erhalten, mag an der konventionellen Reinigungsmethode für Anthocyane liegen.

Die exakte Bestimmung des Molekulargewichts durch Massenspektrometrie ist ebenfalls wichtig für die Strukturaufklärung von komplizierten Anthocyanaen, denn Bestandteile, die nur in geringer Konzentration vorkommen und deshalb im NMR-Spektrum nicht nachweisbar sind, könnten übersiehen werden, solange das Molekulargewicht unbekannt ist. Anthocyan-Flavyliumsalze sind jedoch stark polare Verbindungen, so daß man in ihren EI-Massenspektren selten ein Molekülion erkennt. Das Molekulargewicht (1113) von Gentiodelphin 12 wurde 1982 zuerst durch Felddesorptions-(FD)Massenspektrometrie bestimmt^[82]. Die FAB-(Fast atom bombardment-) Massenspektrometrie wurde dann für die beste Methode gehalten, um das Molekülion zu bestimmen, wie *N. Saito et al.*^[83] und wir^[84] im Fall von Platyconin 13 (m/z 1421) berichteten. Die Massenspektrometrie ermöglichte es auch, Malonsäure im Anthocyan 4 aus *Commelina communis* nachzuweisen^[69]. Die Methylenprotonen im Malonsäurerest lassen sich in saurem Deuteriumoxid oder Deuteriomethanol leicht gegen Deuterium austauschen, so daß es schwierig ist, den Malonsäurerest NMRspektroskopisch nachzuweisen^[85].

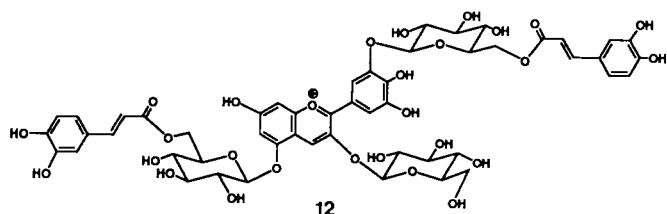
Bei der konventionellen Extraktionsmethode mit salzsaurerem Methanol wird die Malonylgruppe in den Anthocyanaen mit großer Wahrscheinlichkeit hydrolysiert^[86]. Der Nachweis von Malonylawobanin 4 und Succinylcyanin 6, der in Abschnitt 5.1 behandelt wurde, lieferte Anhaltspunkte, um die Strukturen der bekannten Anthocyane zu überprüfen. *Harborne* untersuchte erneut natürliche Anthocyane durch Elektrophorese, da Anthocyane, die Malonsäurereste ent-

halten und Labiaten der Test positiv aus. *Takeda et al.*^[89] entdeckten mit der FAB-Massenspektrometrie in Kompositen einige Anthocyane mit zwei Malonsäureresten. Zwitterionische Anthocyane sind in der Natur also weit verbreitet. In den folgenden Abschnitten sollen natürliche polyacylierte Anthocyane vorgestellt werden, deren Struktur und Stereochemie größtenteils durch uns vollständig aufgeklärt wurden.

6.2. Mit Zimtsäurederivaten polyacylierte Anthocyane

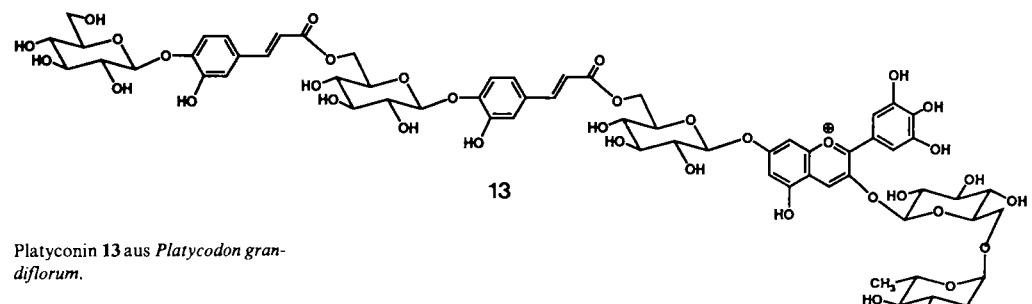
In polyacylierten Anthocyanaen finden sich sehr häufig Zimtsäurederivate wie *p*-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure), Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) und Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure). Wir haben die vollständige Struktur mehrerer solcher komplizierter Pigmente aufgeklärt, wie wir im folgenden zeigen werden.

Gentiodelphin 12^[82] aus *Gentiana makinoi* (Abb. 12 links) enthält zwei Caffeoylglucosidgruppen an C-5 and C-3', wäh-

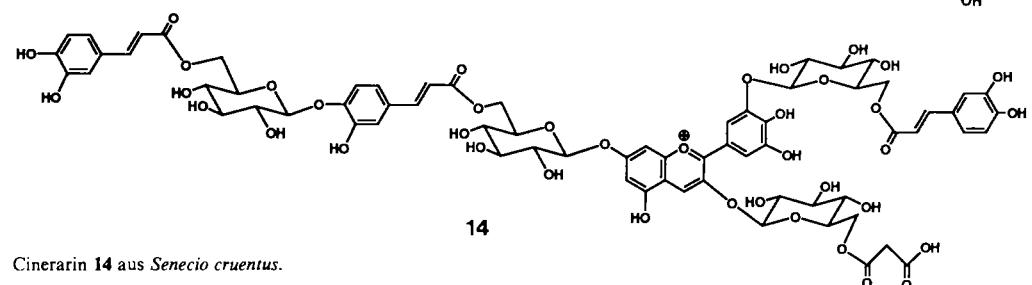


Gentiodelphin 12 aus *Gentiana makinoi*.

rend sich bei Platyconin 13^[84] (zur Isolierung siehe^[90, 91]) aus *Platycodon grandiflorum* (Abb. 12 Mitte) eine lange Kette Glucosylcaffeylglucosylcaffeylglucosid an C-7 befindet,



Platyconin 13 aus *Platycodon grandiflorum*.



Cinerarin 14 aus *Senecio cruentus*.

halten, bei pH-Werten um 4.4 als Zwitterionen vorliegen. Er und *Boardley*^[87] (siehe auch^[88]) untersuchten Blumen, die zu 81 Arten und 27 Pflanzenfamilien gehören, und konnten bei der Hälfte der Proben zwitterionische Anthocyane nachweisen; insbesondere fiel bei fast allen Arten der Kom-

einer Position, die selten glycosyliert wird. Cinerarin 14^[92] (zur Isolierung siehe^[93–95]) aus der Cinerarie *Senecio cruentus* (Abb. 12 rechts) hat eine kompliziertere Struktur dieser Art: Außer einer Malonylglucosidgruppe an C-3 enthält es drei Caffeoylglucosyleinheiten. Himmelblaues Anthocyan

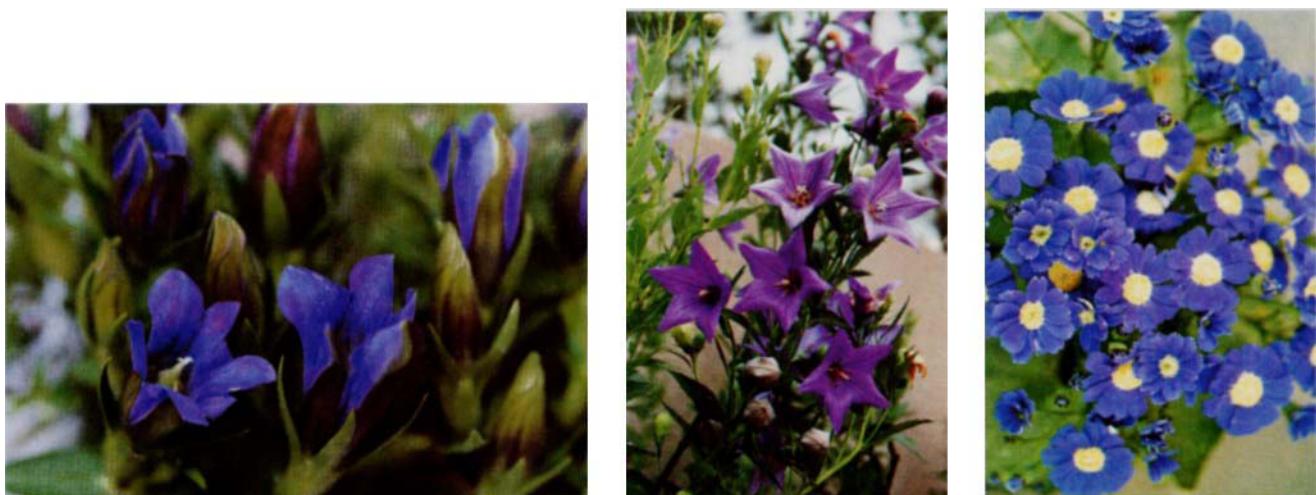


Abb. 12. Links: Glockenblume *Gentiana makinoi*. Mitte: Chinesische Glockenblume *Platycodon grandiflorum*. Rechts: Cinerarie *Senecio cruentus*.

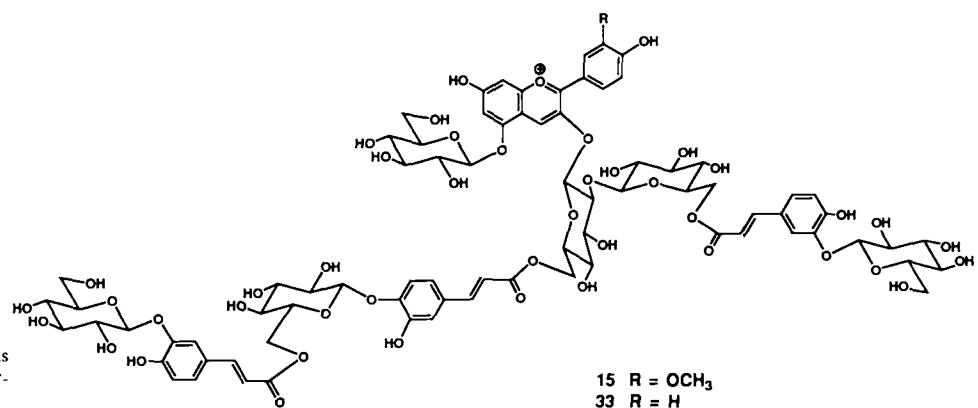


Abb. 13. Links: Trichterwinde *Ipomoea tricolor* „Heavenly Blue“. Rechts: Trichterwinde *Ipomoea nil* „Scarlet O'Hara“.

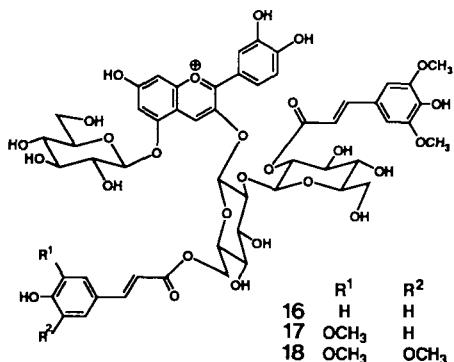
(HBA) 15, das aus den blauen Blüten der Trichterwinde *Ipomoea tricolor* (Abb. 13 links) isoliert wurde^[96, 97], hat an C-3 ein Disaccharid, das an O-6 zwei Glucosylkaffeesäurereste und an O-6' einen Glucosylkaffeesäurerest trägt; in zwei Fällen befindet sich die Glucoseeinheit in m-Stellung der Kaffeesäure, in einem in p-Stellung^[98–101]. Die Anthocyane 16–18 mit jeweils zwei Zimtsäurederivaten wurden im Rotkohl *Brassica oleracea* entdeckt^[102, 103] (siehe auch^[104]). Inter-

essanterweise befindet sich eine der Säuren in 2-Stellung einer Glucoseeinheit anstelle der üblichen 6-Stellung. Anthocyane mit einer von drei Säuren – p-Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxyimtsäure) – existieren nebeneinander.

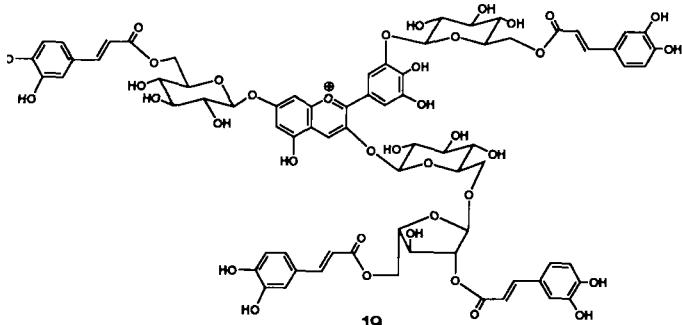
Zebrinin 19^[105] aus *Zebrina pendula* (Abb. 14 links) enthält vier Caffeylgruppen, zwei davon gebunden an eine Arabinoseeinheit. Es ist interessant, daß Lobelinin B 21^[106] (zur



Himmelblaues Anthocyan (HBA) 15 aus *Ipomoea tricolor* und „Scarlet O'Hara“-Anthocyan 33 aus *I. nil*.



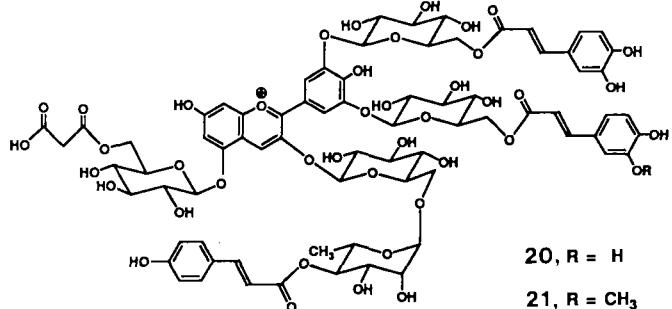
Drei diacylierte Anthocyane 16–18 aus *Brassica oleracea*.



Zebrinin 19 aus *Zebrina pendula*.

Isolierung siehe^[107] aus *Lobelia erinus* (Abb. 14 rechts) vier unterschiedliche Acylglucoside am Cyanin aufweist: *p*-Cumar, Kaffee-, Ferula- und Malonsäure sind an verschiedene Zuckerbestandteile gebunden (vgl. Lobelinin A 20). Vor kur-

dafür ist noch unbekannt. Im Fall der monoacylierten Anthocyane jedoch können sich Derivate mit *Z*-Konfiguration bilden^[111, 112].



Lobelinin A 20 und Lobelinin B 21 aus *Lobelia erinus*.

6.3. Mit Benzoesäurederivaten polyacylierte Anthocyane

Rittersporn ist eine der beliebtesten Gartenblumen der Welt. 1915 isolierten Willstätter et al.^[113] ein Pigment, Delphinin, aus den Blütenblättern des Ackerrittersporns, *Delphinium consolida*, und schlugen als Struktur Bis(*p*-hydroxybenzoyl)diglucosyl-delphinidin vor. Damals waren nur sehr wenige Anthocyane mit Benzoesäurederivaten als Acylbestandteil bekannt. Doch 1964 äußerte Harborne^[186] Zweifel an der Anwesenheit einer *p*-Hydroxybenzoylgruppe in dieser Verbindung. Später identifizierten Asen et al. ein Anthocyan des Rittersporns „Dark Blue Supreme“ als Delphinidin-3-

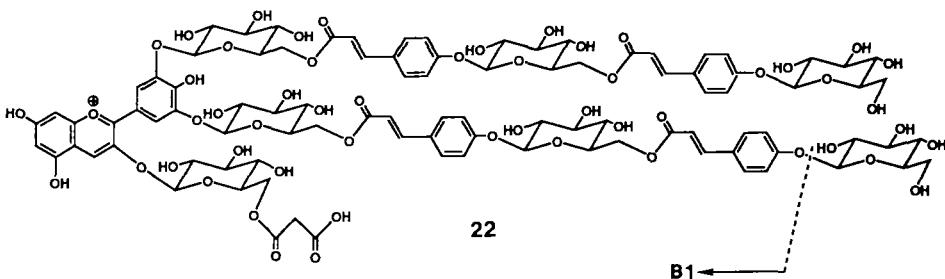


Abb. 14. Links: *Zebrina pendula*. Rechts: *Lobelia erinus*.

zem haben Terahara et al.^[108] sowie Kondo et al.^[109] über eine ähnliche Art von Pigment, Ternatin A1 22 und Ternatin B1 aus *Clitoria ternatea*, berichtet.

Es ist merkwürdig, daß die 3-Phenylpropensäurederivate in den Anthocyancen überwiegend in *E*-Konfiguration, das heißt als Zimtsäurederivate, vorliegen^[110, 111]. Der Grund

[bis(*p*-hydroxybenzoyl)glucosylglucosid]^[33] und ein Anthocyan aus den Blüten der zweijährigen Glockenblume *Campanula* sp. „Rose“ als Pelargonidin-3-[bis(*p*-hydroxybenzoyl)rutinosid-7-glucosid]^[114]. Aus den violetten Blüten von *Delphinium hybridum* „Black Night“ (Abb. 15 links) isolierten wir^[115] das Anthocyan Violdelphin 23 als Hauptbe-

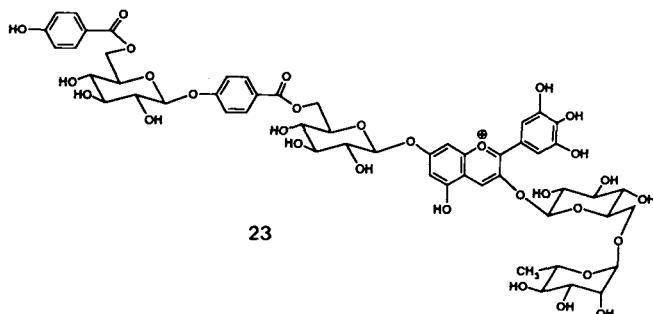


Ternatin A1 22 und Ternatin B1 aus *Clitoria ternatea*.



Abb. 15. Links: *Delphinium hybridum „Black Night“*. Mitte: *Salvia splendens*. Rechts: *Salvia farinacea*.

standteil. Es enthält zwei *p*-Hydroxybenzoyleinheiten, weist aber eine völlig andere Struktur auf als die oben besprochenen Pigmente. In den blauen Blüten von *Delphinium* liegt ein komplizierteres Anthocyan als **23** mit zwei zusätzlichen *p*-Hydroxybenzoylglucosyleinheiten vor.



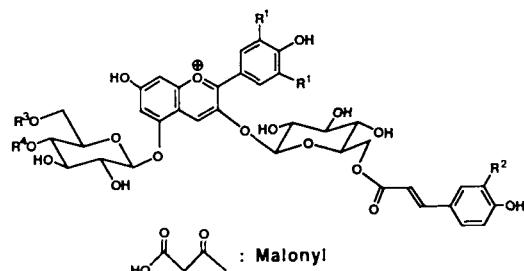
Violdelphin **23** aus violetten Blüten von *Delphinium hybridum*.

6.4. Mit Malonsäure polyacylierte Anthocyane

Willstätter und Bolton^[116] berichteten, daß Salvianin aus *Salvia coccinea* sich aus Pelargonidindiglucosid, das mit Malonsäure acyliert ist, zusammensetzt. Karrer und Widmer^[117, 118] isolierten aus *Monarda didyma* Monardaein, das sie für identisch mit Salvianin hielten und das aus Pelargonidindiglucosid bestehen sollte, das zweimal mit Malonsäure und einmal mit *p*-Cumarsäure acyliert war. In Widerspruch zu diesen Ergebnissen konnten weder Harborne^[86] noch Birkof er et al.^[119] Malonsäure in diesen Anthocyancen nachweisen.

Wir stellten fest, daß Monardaein **30**^[120] tatsächlich zwei Malonsäureeinheiten enthält. Wir haben auch die scharlachroten, purpurfarbenen und blauen Blüten von *Salvia* (Abb. 15 Mitte) untersucht^[121]. Scharlachrote Blütenblätter von *S. splendens* ergaben Salvianin **24**^[122], Monodesmalonylsalvianin **25**, Monardaein **30** und Monodesmalonylmonardaein **31** im Verhältnis 8:4:2:1. In purpurfarbenen Blütenblättern von *S. splendens* fanden wir Salviadelphin **26**, Monodesmalonylsalviadelphin **27**, Bisdesmalonylsalvia-delphin **28** und Dimalonylawobanin **32** im Verhältnis 5:4:1:1. Entsprechend ergaben blaue Blütenblätter von

S. farinacea (Abb. 15 rechts) Malonylawobanin **4** und Salviamalvin **29** im Verhältnis 2:1.



R ¹	R ²	R ³ [a]	R ⁴ [a]		Farbe
24	H	OH	Mal	Mal	Salvianin
25	H	OH	Mal	H	scharlach
26	OH	OH	Mal	Mal	Salviadelphin
27	OH	OH	Mal	H	purpur
28	OH	OH	H	H	purpur
29	OCH ₃	H	Mal	H	blau
30	H	H	Mal	Mal	Monardaein
31	H	H	Mal	H	scharlach
32	OH	H	Mal	Mal	purpur
4	OH	H	Mal	H	Malonylawobanin

[a] Mal = Malonyl.

Anthocyane **24–32** aus scharlachroten, purpurfarbenen und blauen Blüten von *Salvia*.

Es ist interessant, daß die Farbunterschiede der scharlachroten, purpurfarbenen und blauen Blütenblätter von *Salvia* nicht nur auf die unterschiedlichen Anthocyanidinringe (Pelargonidin, Delphinidin und Malvidin; vgl. Abb. 3) zurückzuführen sind, sondern auch auf unterschiedliche pH-Werte in den Blütenblättern: pH 5.6 in scharlachroten, 6.1 in purpurfarbenen und 7.0 in blauen Blütenblättern.

7. Intramolekulare sandwichartige Stapelung von polyacylierten Anthocyancen

1971 erkannten N. Saito et al.^[120], daß Platyconin **13** in neutralen oder schwach sauren wäßrigen Lösungen ungewöhnlich stabil ist. In der Folge wurden einige der stabilen Anthocyane gefunden, die in Abschnitt 6.2 aufgelistet

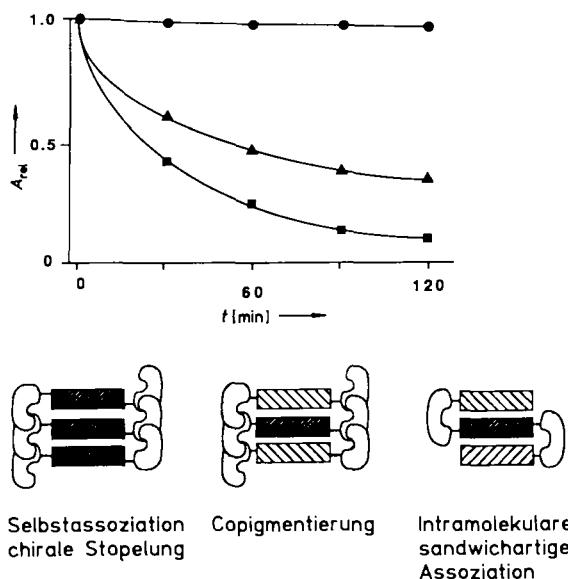


Abb. 16. Oben: Annähernde Darstellung der Stabilität von Anthocyane (5×10^{-5} M) in Wasser bei pH 6.5. ●—●: Anthocyane mit Zimtsäurederivaten (mindestens zwei Einheiten); ▲—▲: Anthocyane mit Zimtsäurederivaten (eine Einheit); ■—■: nicht acylierte Anthocyane. Unten: Schematische Darstellung von drei Stapelungstypen. Dunkle Rechtecke: Anthocyanidin; helle Rechtecke: aromatischer Ring; nierenförmige Gebilde: Zucker.

sind [94, 107, 108]. Diese Anthocyane enthielten Zimtsäurederivate, und zwar zwei oder mehr Einheiten. Nach Entfernung der Acylgruppen durch Hydrolyse wurde das Anthocyan instabil (Abb. 16 oben). Diesen Effekt führte man auf die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen OH-Gruppen im Anthocyanidin und den aromatischen Säuren zurück [93]. Brouillard [27, 64, 123] und wir [82, 84] meinten hingegen, daß diacylierte Anthocyane durch sandwichartige Stapelung (Abb. 16 unten) stabilisiert werden, die durch hy-

drophobe Wechselwirkungen zwischen dem Anthocyanidinring und den beiden aromatischen Acylgruppen zustande kommt, wie bereits im Fall der Copigmentierung [37] und der Selbstassoziation [40] vorgeschlagen.

Diese Hypothese wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gestützt. Sorgfältig durchgeführte NOE-Messungen (Nuclear Overhauser effect) an Himmelblauem Anthocyan (HBA) 15 ergaben mehrere Fern-NOEs (Abb. 17 oben), was für eine gefaltete Konformation von HBA spricht [44]. Ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten von HBA mit jenen von Methylglucosylcafeat ergab folgendes Bild: Die Protonensignale der beiden Kaffeesäurereste in Nachbarstellung zum Anthocyanidinring waren stark hochfeldverschoben, während die Signale des dritten Kaffeesäurerests nahezu keine Verschiebung erfuhren (Abb. 17 oben). Dies deutet auf eine parallele Stapelung der aromatischen Acylgruppe und der Anthocyanidinringe hin. Die CD-Kurve zeigte einen intensiven Cottoneffekt in der Nähe der Absorption der Acylgruppen (ca. 349 nm), während im sichtbaren Bereich keine Exciton-aufspaltung zu beobachten war.

Abbildung 17 unten zeigt ein Modell der intramolekularen sandwichartigen Stapelung von HBA 15. Diese Stapelung schützt das HBA-Molekül bei Kontakt mit Wasser vor der Bildung der Pseudobase und stabilisiert damit sowohl das Flavylium-Ion als auch die Anhydربase. Die blaue Farbe der Blütenblätter wird durch eine Erhöhung des pH-Werts im Zellsaft auf den ungewöhnlich hohen Wert 7.5 [124, 125] erzeugt (Abb. 18). Die rote Trichterwinde „Scarlet O’Hara“ (*Ipomea nil*) (Abb. 13 rechts) enthält ein Anthocyan 33, das sich von HBA 15 nur durch das Fehlen einer Methoxygruppe im B-Ring unterscheidet [78], doch die Farbe ist anders, da der pH-Wert des Zellsafts niedriger liegt (pH 6.1).

Die detaillierte Konformationsanalyse von Gentiodelphin 12 wurde anhand von Kopplungskonstanten und NOE-Da-

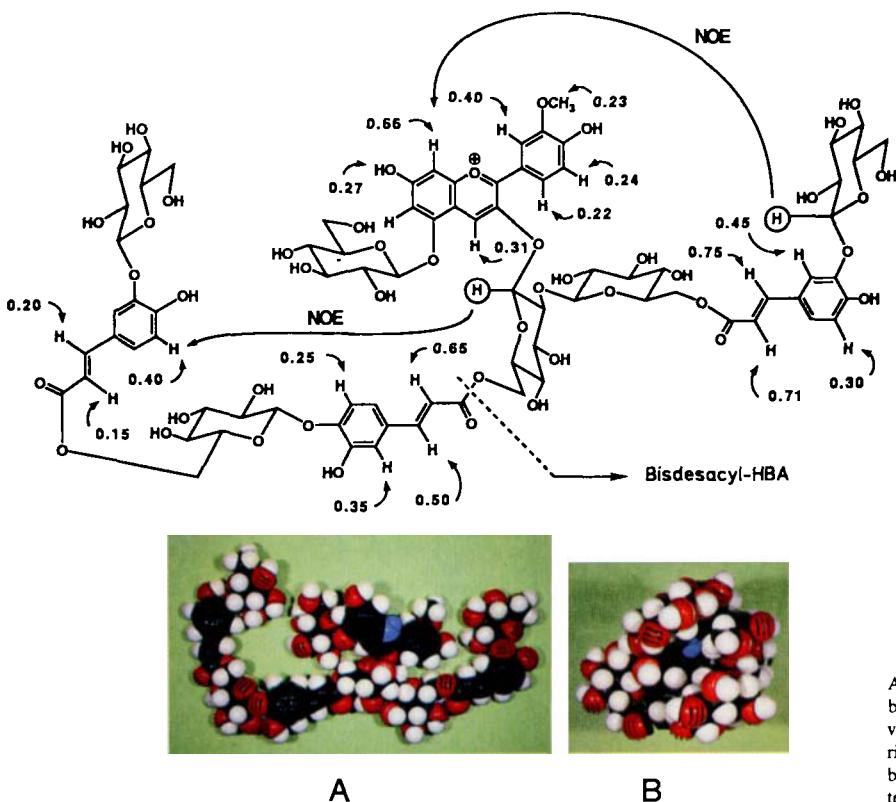


Abb. 17. Oben: Fern-NOEs und Hochfeldverschiebung von Protonensignalen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Himmelblauem Anthocyan 15 in saurem Deuteriomethanol. Unten: CPK-Modelle von Himmelblauem Anthocyan 15. A: gestreckte Form; B: gefaltete Form mit gestapelten Ringen.

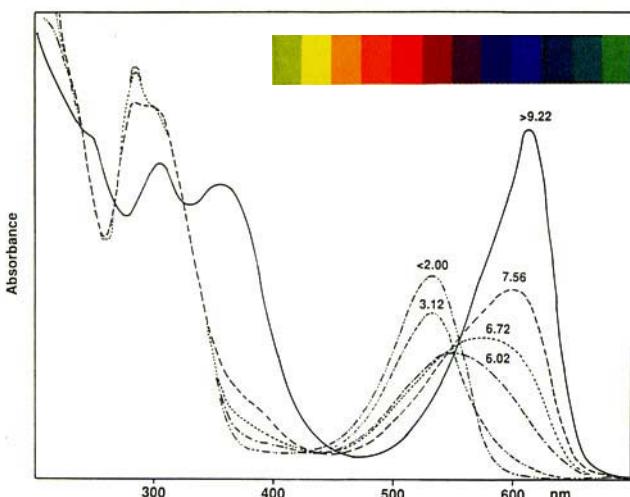


Abb. 18. UV-Spektren von Himmelblauem Anthocyan 15 in wässriger Lösung bei einer Vielzahl von pH-Werten (die Regenbogenfarben zeigen nur annähernde Spektren).

ten der ^1H -NMR-Spektren durchgeführt (Abb. 19 links). Im Unterschied zu HBA liegt beim Gentiodelphin keine sandwichartige Stapelung vor (Abb. 19 rechts)^[175]. Trotzdem ist

Gentiodelphin 12 in wässriger Lösung recht stabil (Abb. 20). Die Gründe für diese Stabilität müssen noch geklärt werden.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Anthocyane allein sind in verdünnter wässriger Lösung nicht stabil; sie werden durch vertikale Stapelung von aromatischen Ringen stabilisiert. Gestapelt werden Ringe der Anthocyane (Selbstassoziation), Ringe von Anthocyanen und Phenolen, z. B. Flavonen (Copigmentierung), oder intramolekular die Ringe von Anthocyanidinen und ihren aromatischen Säureresten (intramolekulare sandwichartige Stapelung) aufgrund hydrophober Wechselwirkungen (Abb. 21 oben). Diese Stapelung wird zusätzlich durch eine darübergelagerte Schicht hydrophiler Zuckerbestandteile (Wasserstoffbrückenbindungen) stabilisiert. Der Angriff eines Wassermoleküls auf C-2 des Anthocyanidinrings wird durch die gestapelten Bestandteile verhindert, da bei Hydratisierung das sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatom C-2 in ein sp^3 -hybridisiertes übergehen würde (Abb. 21 unten). Dank CD-^[126] und Resonanz-Raman-Spektren^[127, 128] konnten solche Stapelungen *in vivo* nachgewiesen werden.

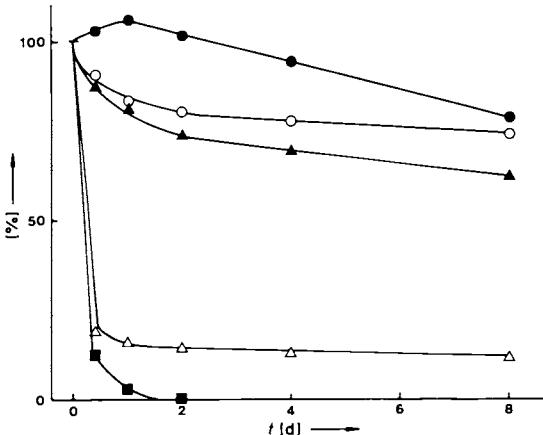
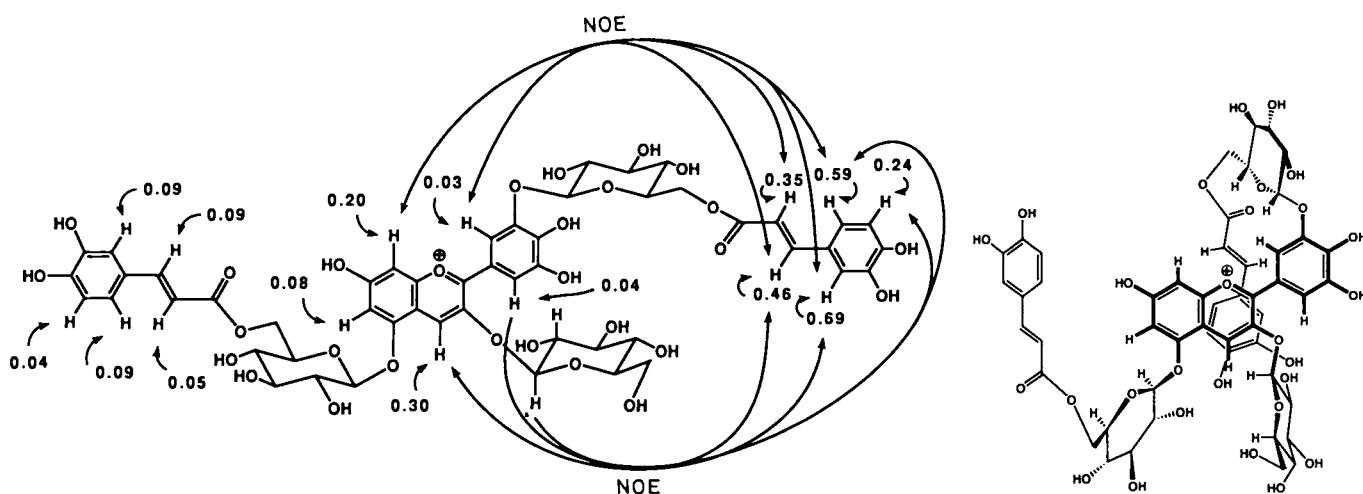


Abb. 20. Stabilität von acylierten Anthocyane ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) in wässriger Lösung bei pH 6.5. ●—●: Lobelinin A 20, ○—○: Gentiodelphin 12, ▲—▲: HBA 15, △—△: Bisdesacyl-HBA, ■—■: Awobanin 5.

Im Fall der Metalloanthocyane werden Metall-Ionen durch Anthocyanmoleküle chelatisiert, die ihrerseits mit Flavonmolekülen gestapelt werden. Eine ringförmige Anordnung von zwölf Flavonoiden (sechs Anthocyanen und sechs Flavonen) um ein Zentrum aus Metall-Ionen wurde vorgeschlagen. Commelinin enthält zwei Magnesium-Ionen im Zentrum von zwölf symmetrisch angeordneten Flavonoidmolekülen, während bei Protocyanin seltsamerweise zwei unterschiedliche Metall-Ionen beteiligt sind. Können zwei verschiedene Metall-Ionen in einer ähnlichen symmetrischen Anordnung vorkommen wie bei Commelinin? Dieses interessante Problem wird nur durch Röntgenstrukturanalyse der komplizierten Verbindungen gelöst werden können. Die Röntgenstrukturanalyse von Commelinin macht bereits Fortschritte.

Es wird vermutet, daß polyacylierte Anthocyane durch sandwichartige Stapelung der beiden aromatischen Acylbe-

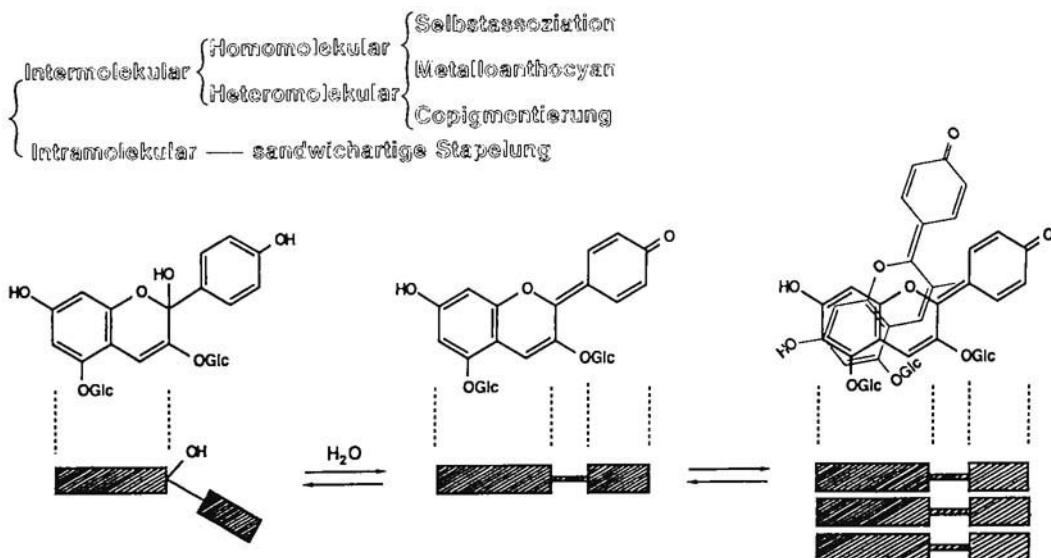


Abb. 21. Oben: Stabilisierungsmechanismen von Anthocyanaen. Unten: Die Stapelung der Moleküle der Anthocyan-Anhydrobase verhindert die Hydratisierung und damit die Bildung der Pseudobase.

standteile über und unter dem Anthocyanidinring stabilisiert werden, wie es die ¹H-NMR-Ergebnisse für HBA 15 nahelegen; bei Gentiodelphin 12 hingegen kann nur eine aromatische Acylgruppe auf den Anthocyanidinring gestapelt werden, und dennoch wird eine ähnliche Stabilität wie bei HBA erreicht. Weitere Untersuchungen, insbesondere die detaillierte Analyse der molekularen Erkennung, sind notwendig, um diese Stabilisierungsmechanismen von Anthocyanaen zu verstehen.

Eingegangen am 19. März 1990 [A 799]
Übersetzt von Dipl.-Chem. Harald Schwalbe, Frankfurt am Main

- [1] T. Goto, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 52 (1987) 158.
- [2] J. B. Harborne, R. J. Grayer in J. B. Harborne (Hrsg.): *The Flavonoids. Advances in Research since 1980*, Chapman and Hall, London 1988, S. 1.
- [3] G. Hrazdina in J. B. Harborne, T. Mabry (Hrsg.): *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London 1982, S. 135.
- [4] R. Brouillard in P. Markakis (Hrsg.): *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press, New York 1982, S. 1.
- [5] R. Brouillard in J. B. Harborne (Hrsg.): *The Flavonoids. Advances in Research since 1980*, Chapman and Hall, London 1988, S. 525–538.
- [6] C. F. Timberlake, P. Bridle in J. Walford (Hrsg.): *Developments in Food Colours. Vol. 1*, Applied Science Publishers, London 1980, S. 115.
- [7] R. Willstätter, A. E. Everest, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 401 (1913) 189.
- [8] K. Shibata, Y. Shibata, I. Kasagi, *J. Am. Chem. Soc.* 41 (1919) 208.
- [9] K. Shibata, K. Hayashi, T. Inosaka, *Acta Phytochim.* 15 (1949) 17.
- [10] K. Hayashi, Y. Abe, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* 34 (1958) 373.
- [11] S. Mitsui, K. Hayashi, S. Hattori, *Proc. Jpn. Acad.* 35 (1959) 169.
- [12] K. Takeda, S. Mitsui, K. Hayashi, *Bot. Mag. Tokyo* 79 (1966) 578.
- [13] K. Takeda, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 53 (1977) 257.
- [14] K. Takeda, K. Hayashi, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 53 (1977) 1.
- [15] K. Hayashi, K. Takeda, *Proc. Jpn. Acad.* 46 (1970) 535.
- [16] E. Bayer, H. Egger, A. Fink, K. Nether, K. Wegmann, *Angew. Chem.* 78 (1966) 834; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 791.
- [17] E. Bayer, *Chem. Ber.* 91 (1958) 1115.
- [18] E. Bayer, K. Nether, H. Egger, *Chem. Ber.* 93 (1960) 2871.
- [19] K. Hayashi, N. Saito, K. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* 37 (1961) 393.
- [20] S. Asen, L. Jurd, *Phytochemistry* 6 (1967) 577.
- [21] Y. Osawa in P. Markakis (Hrsg.): *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press, New York 1982, S. 41.
- [22] Y. Osawa, M. Koizumi, N. Saito, *Phytochemistry* 10 (1971) 1591.
- [23] G. M. Robinson, R. Robinson, *Biochem. J.* 25 (1931) 1687.
- [24] J. B. Harborne in T. W. Goodwin (Hrsg.): *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Vol. 1, 2. Aufl.*, Academic Press, New York 1976, S. 736.
- [25] R. Brouillard, B. Delaporte, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 8461.
- [26] R. Brouillard, J.-E. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 1359.
- [27] R. Brouillard, J.-M. H. Chahime, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5375.
- [28] R. Brouillard, G. A. Iacobucci, J. G. Sweeny, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7585.
- [29] A. Cheminat, R. Brouillard, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 4457.
- [30] S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, *Phytochemistry* 11 (1972) 1139.
- [31] T. C. Sommers, M. E. Evans, *J. Sci. Food Agric.* 30 (1979) 623.
- [32] L.-J. Chen, G. Hrazdina, *Phytochemistry* 20 (1981) 297.
- [33] S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, *Phytochemistry* 14 (1975) 2677.
- [34] S. Asen, K. H. Norris, R. N. Stewart, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 96 (1971) 770.
- [35] N. Ishikura, K. Yoshitama, *J. Plant Physiol.* 115 (1984) 171.
- [36] M. Williams, G. Hrazdina, *J. Food Sci.* 44 (1979) 66.
- [37] T. Goto, T. Hoshino, S. Takase, *Tetrahedron Lett.* 1979, 2905.
- [38] T. Goto, T. Hoshino, S. Takase, *20th Symposium on the Chemistry of Natural Products (Japan)*, Symposium papers, S. 59–66 (1976).
- [39] J. G. Sweeny, M. M. Wilkinson, G. A. Iacobucci, *J. Agric. Food Chem.* 29 (1981) 563.
- [40] T. Hoshino, U. Matsumoto, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1751.
- [41] T. Hoshino, U. Matsumoto, N. Harada, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 3621.
- [42] T. Hoshino, U. Matsumoto, T. Goto, *Phytochemistry* 20 (1981) 1971.
- [43] T. Hoshino, U. Matsumoto, T. Goto, N. Harada, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 433.
- [44] T. Goto, H. Tamura, T. Kawai, T. Hoshino, N. Harada, T. Kondo, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 471 (1986) 155.
- [45] T. Hoshino, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 1593.
- [46] T. Goto, H. Tamura, T. Kondo, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 5907.
- [47] R. C. Pecket, C. J. Small, *Phytochemistry* 19 (1980) 2571.
- [48] V. Hemleben, Z. Naturforsch. C. 36 (1981) 925.
- [49] N. Ishikura, *Idem* 35 (1981) 38.
- [50] N. Saito, K. Ueno, *Heterocycles* 23 (1985) 2709.
- [51] T. Goto, K. Yoshida, M. Yoshikane, T. Kondo, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 713.
- [52] S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, *Phytochemistry* 10 (1971) 171.
- [53] S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, D. R. Hassie, *Phytochemistry* 9 (1970) 619.
- [54] L. Jurd, S. Asen, *Phytochemistry* 5 (1966) 1263.
- [55] P. Scheffeldt, G. Hrazdina, *J. Food Sci.* 43 (1978) 517.
- [56] Y. Yazaki, *Bot. Mag. Tokyo* 89 (1976) 45.
- [57] C. F. Timberlake in J. Friend, M. J. C. Rhodes (Hrsg.): *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*, Academic Press, New York 1981–1982, S. 221.
- [58] S. Asen, R. Griesbach, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108 (1983) 845.
- [59] K. Takeda, R. Kubota, C. Yagioka, *Phytochemistry* 24 (1985) 1207.
- [60] K. Takeda, M. Kuriuda, H. Ito, *Phytochemistry* 24 (1985) 2251.
- [61] C. F. Timberlake, *Food Chem.* 5 (1980) 69.
- [62] R. Brouillard, G. Hazza, Z. Saad, A. M. Albrecht-Gary, A. Cheminat, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 2604.
- [63] T. Hoshino, U. Matsumoto, T. Goto, *Phytochemistry* 19 (1980) 663.

- [64] R. Brouillard, *Phytochemistry* 22 (1983) 1311.
- [65] S. Ootani, *Rep. Inst. Breeding Res. Tokyo Univ. Agric.* (1973) Suppl. 1.
- [66] K. Yoshida, M. Yoshikane, T. Kondo, T. Goto, unveröffentlicht.
- [67] Y. Osawa, N. Saito, T. Kawai, *Meiji-Gakuin Ronso* 156 (1970) 1.
- [68] Y. Osawa, M. Koizumi, N. Saito, T. Kawai, *Meiji-Gakuin Ronso* 159 (1970) 187.
- [69] T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, S. Takase, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 4863.
- [70] T. Kondo, H. Tamura, S. Takase, T. Goto, *Nippon Kagaku Kaishi* 1986, 1571.
- [71] K. Takeda, S. Tominaga, *Bot. Mag. Tokyo* 96 (1983) 359.
- [72] H. Tamura, T. Kondo, Y. Kato, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 5749.
- [73] S. Asen, R. M. Horowitz, *Phytochemistry* 13 (1974) 1219.
- [74] K. Takeda, Ch. Kumegawa, J. B. Harborne, R. Self, *Phytochemistry* 27 (1988) 1228.
- [75] K. Yoshida, T. Kondo, T. Goto, unveröffentlicht.
- [76] K. Takeda, T. Fujii, M. Iida, *Phytochemistry* 23 (1984) 879.
- [77] H. Tamura, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 1801.
- [78] T. Kondo, K. Yoshida, T. Goto, unveröffentlicht.
- [79] Y. Saito, M. Ito, S. Oba, unveröffentlicht.
- [80] T. Goto, S. Takase, T. Kondo, *Tetrahedron Lett.* 1978, 2413.
- [81] P. Bridle, R. S. T. Loeffler, C. F. Timberlake, R. Self, *Phytochemistry* 23 (1984) 2968.
- [82] T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, H. Imagawa, A. Iino, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 3695.
- [83] N. Saito, C. F. Timberlake, O. G. Tucknott, I. A. S. Lewis, *Phytochemistry* 22 (1983) 1007.
- [84] T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, K. Kawahori, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 2181.
- [85] R. M. Horowitz, S. Asen, *Phytochemistry* 28 (1989) 2531.
- [86] J. B. Harborne, *Phytochemistry* 3 (1964) 151.
- [87] J. B. Harborne, M. Boardley, *Z. Naturforsch. C* 40 (1985) 305.
- [88] J. B. Harborne, *Phytochemistry* 25 (1986) 1887.
- [89] K. Takeda, J. B. Harborne, R. Self, *Phytochemistry* 25 (1986) 1337.
- [90] N. Saito, Y. Osawa, K. Hayashi, *Phytochemistry* 10 (1971) 445.
- [91] N. Saito, Y. Osawa, K. Hayashi, *Bot. Mag. Tokyo* 85 (1972) 105.
- [92] T. Goto, T. Kondo, T. Kawai, H. Tamura, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 6021.
- [93] K. Yoshitama, K. Hayashi, *Bot. Mag. Tokyo* 87 (1974) 33.
- [94] K. Yoshitama, K. Hayashi, K. Abe, H. Kakisawa, *Bot. Mag. Tokyo* 88 (1975) 213.
- [95] N. Ishikura, E. Yamamoto, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 54 (1980) 637.
- [96] N. Ishikura, M. Shimizu, *Kumamoto J. Sci. Biol.* 12 (1975) 41.
- [97] A. B. Pomilio, J. F. Sproviero, *Phytochemistry* 11 (1972) 2323.
- [98] T. Goto, T. Kondo, H. Imagawa, I. Miura, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 3213.
- [99] T. Goto, T. Kondo, H. Imagawa, S. Takase, M. Atobe, I. Miura, *Chem. Lett.* 1981, 883.
- [100] T. Goto, H. Imagawa, T. Kondo, *Heterocycles* 17 (1982) 355.
- [101] T. Kondo, T. Kawai, H. Tamura, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 2273.
- [102] E. Idaka, K. Suzuki, H. Yamakita, T. Ogawa, T. Kondo, T. Goto, *Chem. Lett.* 1987, 145.
- [103] E. Idaka, H. Yamakita, T. Ogawa, T. Kondo, M. Yamamoto, T. Goto, *Chem. Lett.* 1987, 1213.
- [104] G. Hrazdina, H. Iredale, L. R. Mattick, *Phytochemistry* 16 (1977) 297.
- [105] E. Idaka, T. Ogawa, T. Kondo, T. Goto, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2215.
- [106] T. Kondo, J. Yamashiki, K. Kawahori, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 6055.
- [107] K. Yoshitama, *Phytochemistry* 16 (1977) 1857.
- [108] N. Saito, K. Abe, T. Honda, C. F. Timberlake, P. Bridle, *Phytochemistry* 24 (1985) 1583; N. Terahara, N. Saito, T. Honda, K. Toki, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 5305; N. Terahara, N. Saito, T. Honda, K. Toki, Y. Osajima, *ibid.* 31 (1990) 2921.
- [109] T. Kondo, M. Ueda, T. Goto, *Tetrahedron* 46 (1990) 4749.
- [110] L. Birkofe, C. Kaiser, W. Koch, M. Donike, D. Wolf, *Z. Naturforsch. B* 18 (1963) 631.
- [111] K. Yoshida, T. Kondo, K. Kameda, T. Goto, *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990) 1745.
- [112] T. Kondo, H. Tamura, K. Yoshida, T. Goto, *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 797.
- [113] R. Willstätter, W. Mieg, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 408 (1915) 61.
- [114] S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, *Phytochemistry* 18 (1979) 1251.
- [115] T. Kondo, K. Oki, K. Yoshida, T. Goto, *Chem. Lett.* 1990, 137.
- [116] R. Willstätter, E. K. Bolton, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 412 (1917) 113.
- [117] P. Karrer, R. Widmer, *Helv. Chim. Acta* 11 (1928) 837.
- [118] P. Karrer, R. Widmer, *Helv. Chim. Acta* 12 (1929) 292.
- [119] L. Birkofe, C. Kaiser, M. Donike, W. Koch, *Z. Naturforsch. B* 20 (1965) 424.
- [120] T. Kondo, Y. Nakane, H. Tamura, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 5879.
- [121] T. Kondo, M. Yoshikane, K. Yoshida, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 6729.
- [122] F. A. Tomas-Barberom, J. B. Harborne, R. Self, *Phytochemistry* 26 (1987) 2759.
- [123] R. Brouillard, *Phytochemistry* 20 (1981) 143.
- [124] S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, *Phytochemistry* 16 (1977) 1118.
- [125] N. Ishikura, *Kumamoto J. Sci. Biol.* 15 (1981) 29.
- [126] T. Hoshino, *Phytochemistry* 25 (1986) 829.
- [127] R. Brouillard, *Phytochemistry* 22 (1983) 1311.
- [128] J.-C. Marlin, A. Statoua, R. Brouillard, *Phytochemistry* 24 (1985) 1575.