

Bei der Remethylierung von 388 mg Pentamethyldigilanidobiosc (aus Strophanthobiase) in 3,60 ml Dimethylformamid mit 1,43 ml Methyljodid und 1,36 g Silberoxyd entstand wiederum einheitliches  $\beta$ -Methyl-penta-O-methyl-digilanidobiosid (II). Aus Äther-Pantan 305 mg Kristalle vom Smp. 76–84° (Misch-Smp. ohne Depression);  $[\alpha]_D^{22} = +3,9^\circ$  ( $c = 0,825$  in Wasser),  $[\alpha]_D^{22} = +11,4^\circ$  ( $c = 0,907$  in Chloroform). IR.-Spektrum siehe Fig. 3.

### ZUSAMMENFASSUNG

Durch Spaltung der methylierten Digilanidobiose-Derivate II und VI zu 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose und Cymarose bzw. Cymaronsäurelacton konnte für Digilanidobiose die Struktur I bewiesen werden. Für Acetyl digilanidobiose wurde entsprechend die Konstitution X abgeleitet. Strophanthobiase (XI) unterscheidet sich von der Digilanidobiose (I) nur durch die O-Methylgruppe an C-3 des Desoxyzuckers, da sich aus beiden Biosen identische Methylderivate (II und III) gewinnen lassen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

## 30. Phytolaccanin, der Farbstoff der Kermesbeere (*Phytolacca decandra* L.)<sup>1)</sup>

### 1. Mitteilung zur Kenntnis der Betacyane

von H. Wyler und A. S. Dreiding

(7. XII. 60)

Die reifen Früchte der *Phytolacca decandra (americana)* L., genannt Kermesbeeren<sup>2)</sup>, enthalten einen prachtvoll rot-violetten Saft, dessen färbende Eigenschaften man verschiedentlich anzuwenden trachtete.

Die Pflanze und deren Verwandtschaft waren ursprünglich nur auf dem amerikanischen Kontinent heimisch (*Virginian pokeweed*, indianisch: *Pocan*<sup>4)</sup>. Es wird überliefert<sup>4)</sup>, dass der Gouverneur von Jamestown (Virg.) um 1607 grosse Mengen der «Pokeberries» von der indianischen Bevölkerung ableifern liess und zur Prüfung als mögliche Textilfarbstoffquelle nach Europa versandte. Bei dieser Gelegenheit wurde die Pflanze dort angesiedelt und verbreitete sich rasch vor allem im Mittelmeergebiet. Die in sie gesetzten Erwartungen wurden jedoch enttäuscht. Jahrhunderte später diente der Saft dieser Beere in südlichen Ländern zum Färben von Wein und anderen Lebensmitteln<sup>3) 5) 6)</sup>. Dieser Gebrauch wurde schliesslich untersagt<sup>3)</sup>, da der Beeren-

<sup>1)</sup> Zum Teil aus einem Vortrag von A. S. DREIDING am «Symposium of the Plant Phenolics Group» im Shoreditch College (22. April) und am chemischen Kolloquium der Universität Oxford (26. April 1960).

<sup>2)</sup> Der Begriff Kermesbeeren (Kermeskörner, Scharlachbeeren, *Grana Chermes*) wurde nach HEISE<sup>3)</sup> auch für die getrockneten Weibchen der Kermesschildlaus, *Lecanium ilicis* L., welche an den Zweigen der Kermeseiche (*Quercus coccifera*) lebt, angewandt. Die mit Wein oder Essig befeuchteten, ursprünglich violett-schwarzen Tiere wurden an der Sonne getrocknet und verfärbten sich rot-braun. Dieses Pigment, bekannt als Kermessäure, welches einst in der Textilfärberei Verwendung fand, hat nichts mit dem Farbstoff der *Phytolacca* zu tun.

<sup>3)</sup> R. HEISE, Arbeiten kaiserl. Gesundheitsamt 11, 513 (1895).

<sup>4)</sup> C. D. MELL, Textile Colorist 52, 191, 682 (1930); 64, 76 (1942).

<sup>5)</sup> H. C. SORBY, Quart. J. microscopic Sci., New Ser. 9, 368 (1869).

<sup>6)</sup> LACOUR EYMARD, J. Pharmac. Chim. 27, 243 (1890).

saft ausser dem Farbstoff noch ein schädliches Prinzip<sup>7)</sup> enthalten soll. Auch in neuerer Zeit wurde wieder ein Versuch zur Anwendung des Farbsaftes in der Textilfärberei<sup>9)</sup> unternommen, anscheinend ohne nachhaltigen Erfolg. Vor einigen Jahren wurde dagegen auf die Verwendbarkeit zur Färbung von Kollagen in Gewebeschnitten hingewiesen<sup>10).</sup>

Der Farbstoff, den wir *Phytolaccanin* nennen, gehört zu einer speziellen Gruppe von wasserlöslichen roten Pigmenten, genannt *Betacyane*<sup>11)</sup>, welche in den meisten Centrospermen-Pflanzen vorkommen. Trotz fröhlem Interesse am *Phytolacca*-Farbstoff, besonders von seiten der Lebensmittelchemie, hat man bis jetzt noch keinen näheren Einblick in dessen Natur erhalten. Wir werden zeigen, dass das Phytolaccanin mit *Betanin*, dem Farbstoff der roten Rübe (*Beta vulgaris, var. rubra L.*) identisch ist.

Zur Identifikation des *Phytolacca*-Farbstoffes und anderer damals üblicher Weinfärbemittel<sup>12)</sup> schlug H. C. SORBY 1869 die Verwendung des Spektroskopes vor<sup>5).</sup> Er beobachtete, so wie später auch BISCHOFF<sup>13),</sup> HASTERLIK<sup>14),</sup> HAVERLAND<sup>8)</sup> und HEISE<sup>3),</sup> im verdünnten *Phytolacca*-Saft zwei Absorptionsbanden: eine lag etwa  $1/3$  zwischen den FRAUNHOFER'schen Linien E und D (ca. 538 m $\mu$ ) und eine schwächere bei Linie F (ca. 486 m $\mu$ ). Es ist jetzt bekannt, dass nur das Absorptionsmaximum bei 538 m $\mu$  für das Phytolaccanin (Spektrum s. Fig. 1) sowie auch für andere Betacyane charakteristisch ist. Die nicht immer in gleicher Intensität<sup>3)</sup> vorgefundenen Maxima

<sup>7)</sup> Verschiedentlich wurde auf die physiologische Wirkung und frühere medizinische Verwendung des *Phytolacca*-Beerenstaftes hingewiesen<sup>3) 4) 6) 8)</sup>. Über dessen Schädlichkeit bestehen z. T. auseinandergehende Ansichten. Seine Eigenschaften werden als bitter, emetisch<sup>4)</sup> und purgativ<sup>6)</sup> geschildert. Folgende Begleitstoffe sind bisher genannt worden (vgl. O. WHEMER, Die Pflanzenfarbstoffe, ferner<sup>8)</sup>): Phytolaccasäure oder Phytolaccinsäure, Phytolaccin (aus Wurzeln und Samen), ein saponinartiges, bitteres Glykosid. Gewisse schaumbildende Inhaltsstoffe werden in der Phytolaccaceen-Familie allgemein verbreitet angetroffen. Die einheimische Bevölkerung bediente sich mancher Phytolaccaceen-Art als Quelle eines Waschmittelsubstitutes<sup>4).</sup> Genauere Kenntnisse über die chemische Natur und Physiologie der erwähnten Substanzen fehlen anscheinend bis heute.

<sup>8)</sup> F. HAVERLAND, Beiträge zur Kenntnis der in den Früchten der *Phytolacca decandra* enthaltenen Bestandteile, Inaug.-Diss. Erlangen 1892.

<sup>9)</sup> G. K. HAUSER, Mem. Inst. chem. Technol. Acad. Sci. Ukrain. SSR. 3, 3 (1937); Chem. Abstr. 31, 6883 (1937).

<sup>10)</sup> A. NOVELLI, Experientia 9, 224 (1953).

<sup>11)</sup> H. WYLER & A. S. DREIDING, Experientia, im Druck.

<sup>12)</sup> SORBY<sup>5)</sup> erwähnt: «According to PAYEN's interesting work (Précis des substances alimentaires, p. 455) logwood and brazilwood were at all events employed a few years ago for this purpose; and rhatany root and the berries of the so called Virginian Poke (*Phytolacca decandra*) are sometimes used.» – Später werden im Buche von H. W. VOGEL, Praktische Spektralanalyse irdischer Stoffe, als Weinfärbemittel weiter aufgezählt: Heidelbeer-, Malven-, Flieder-, Rainweidebeeren- und Randenfarbstoff, Fuchsin, Rubin, Carmin, Indigoschwefelsäure, Campechefarbstoffe, Orcanettefarbstoffe (Alkannin). LACOUR EYMARD<sup>6)</sup> berichtet, dass in Weinbergen in Spanien und Portugal stets eine kleine Ecke für den Anbau von *Phytolacca* und Hollunder zu Färbezwecken reserviert blieb.

<sup>13)</sup> H. BISCHOFF, Das Caryophyllinenroth, Inaug.-Diss. Tübingen 1876; A. HILGER, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen 23, 456 (1879).

<sup>14)</sup> A. HASTERLIK, Mitt. a. d. pharm. Institute d. Univ. Erlangen, von A. HILGER, Heft 2, 84 (1889).

<sup>15)</sup> BISCHOFF schreibt u. a.: (S. 4) «Nicht zu gewagt schien daher die Folgerung, dass jene prachtvollen rothen Farbstoffe, welche in verschiedenen Familien der Caryophyllinen (alter Name für Centrospermen) und bei diesen wieder in zahlreichen Arten, Abarten und Varietäten auftreten, sich chemisch nahestehend, ja identisch sein mögen.»

bei 486 m $\mu$  gehören zu den Betaxanthinen<sup>11)</sup>, welche oft in verschiedenen Mengen neben den Betacyanen vorkommen.

Im Jahre 1876 entdeckte H. BISCHOFF<sup>13)</sup> auf Grund spektroskopischer Vergleiche und Farbreaktionen, dass der *Phytolacca*-Farbstoff mit demjenigen der roten Rübe (*Beta vulgaris*), des Fuchsschwanzes (*Amarantus*), des Brandschopfs (*Celosia*), der Melde (*Chenopodium*) und der Portulakrose (*Portulaca*) sehr nahe verwandt ist. BISCHOFF glaubte sogar, dass diese Pflanzen alle denselben Farbstoff enthielten, welchen er das «Caryophyllinenroth»<sup>15)</sup> nannte. Heute wissen wir, dass BISCHOFF's Teste nur allgemein charakteristisch für Betacyane sind, aber zwischen den einzelnen Mitgliedern dieser Gruppe nicht unterscheiden können. Mit der Anwendung dieser Teste zur Erkennung des *Phytolacca*-Farbstoffes in Lebensmitteln haben sich HILGER und Mitarbeiter<sup>13) 14) 16)</sup>, MACAGNO<sup>17)</sup> und HEISE<sup>3)</sup> befasst. Ähnliche Teste wurden später von WEIGERT<sup>18)</sup>, GERTZ<sup>19)</sup> und ROBINSON<sup>20)</sup> angewandt und bestätigten die Verwandtschaft des *Phytolacca*-Farbstoffes mit denjenigen vieler anderer Centrospermen-Pflanzen.

BISCHOFF<sup>13)</sup> war unseres Wissens der erste, der eine Anreicherungsmethode für den Farbstoff der *Phytolacca* beschrieb. Er fällte das Pigment aus einer 10-proz. alkoholischen Extraktlösung der Beeren mit Blei(II)-acetat und zersetzte die Fällung mit alkoholischer Schwefelsäure. Ein durch mehrmaliges Wiederholen dieser Prozedur erhaltenes, in Alkohol lösliches, violettes Rohfarbstoffpräparat enthielt nach einem qualitativen Test Stickstoff.

In einer sorgfältigen Arbeit über die Inhaltstoffe der *Phytolacca*-Beeren isolierte auch HAVERLAND<sup>8)</sup> einen violetten Farbstoff durch Fällung aus einer alkoholischen Extraktlösung mit Äther und anschliessend mehrmals wiederholten Ausfällungen aus konzentrierten wässrigen Lösungen mit Alkohol. Seine angereicherten, in Alkohol unlöslichen Präparate enthielten 49,63–49,85% C, 6,43–6,61% H und 7,02–7,05% N sowie auch Asche. Bei der sauren Hydrolyse erhielt HAVERLAND einen Zucker, dessen Osazon bei 192° schmolz.

Nach unserer heutigen Kenntnis ist es verständlich, dass BISCHOFF den in Alkohol löslichen, HAVERLAND jedoch den unlöslichen Teil zur näheren Untersuchung heranzog: Zweifellos war in beiden Fällen die Aufmerksamkeit auf den grössten Teil des Farbstoffmaterials gerichtet worden, und BISCHOFF hatte, nach seiner Isolermethode zu urteilen, die in Alkohol lösliche Kation-Form des Phytolaccanins in Händen, während HAVERLAND die in Alkohol unlösliche Anion-Form ausfällt. Diese Interpretation erklärt auch die Asche in HAVERLAND's Analysen.

Schon LACOUR EYMARD<sup>6)</sup> hatte versucht, aus einem Trockenkonzentrat des *Phytolacca*-Saftes den Farbstoff durch seine Löslichkeitseigenschaften in wässrigem Alkohol von verschiedener Konzentration abzutrennen. Er gab seine Bemühungen auf, als er bemerkte, dass die Begleitstoffe sehr ähnliche Löslichkeitseigenschaften

<sup>16)</sup> A. HILGER & C. MAI, Forschungsberichte über Lebensmittel und ihre Beziehung zur Hygiene 2, 343 (1895); Chem. Zbl. 1895, II, 1083.

<sup>17)</sup> MACAGNO, Atti della R. Stazione chimico-agraria sperimentale di Palermo 1881–84, S. 58.

<sup>18)</sup> L. WEIGERT, Jahresberichte und Programm d. k. k. önol.-pomol. Lehranstalt in Klosterneuburg, Wien 1894.

<sup>19)</sup> O. GERTZ, Studier öfver Anthocyan, Diss. Lund 1906.

<sup>20)</sup> W. J. C. LAWRENCE, J. R. PRICE, G. M. ROBINSON & R. ROBINSON, Philos. Transactions 230 B, 149 (1939–41); G. M. ROBINSON & R. ROBINSON, Biochem. J. 25, 1687 (1931).

besassen. Auch HARMS<sup>21)</sup> beschritt den gleichen Weg wie LACOUR EYMARD. Er behandelte das im Vakuum erhaltene Trockenkonzentrat des *Phytolacca*-Saftes mit 75-proz. Alkohol und beschrieb den in Lösung gegangenen Anteil nach dem Ein-trocknen durch ein paar Farbreaktionen und Fällungen. Ein Versuch, die Blei(II)-acetat-Fällung des Farbstoffs mit Schwefelwasserstoff zu zerlegen, führte nach HARMS zur Zerstörung. HEISE<sup>3)</sup> brauchte für die Entwicklung seiner Nachweisreaktionen ein Farbstoffkonzentrat, welches durch partielle Fällungen mit Alkohol aus wässrigen Extraktlösungen anfiel. Vor einigen Jahren<sup>22)</sup> wurde auch eine Anreicherung des *Phytolacca*-Pigmentes mittels Ionenaustauscher versucht.

Es ist zu vermuten, dass die oben beschriebenen Verfahren nicht zu sehr stark angereicherten Farbstoffpräparaten führten. Die wirksamste Abtrennung scheint nach unseren Erfahrungen die von BISCHOFF gebrauchte Blei(II)-salz-Fällung zu sein.

Der *Phytolacca*-Farbstoff wurde in letzter Zeit wieder mehrmals in analytisch kleinen Mengen untersucht, und zwar im Zusammenhang mit der Klassifikation der roten Farbstoffe der meisten Centrospermen-Pflanzen<sup>11) 23) 24)</sup> als Betacyane<sup>11)</sup>: Ob-schon REZNIK's erste Chromatographieresultate<sup>23)</sup> eher auf einen Unterschied zwischen den Hauptfarbstoffkomponenten der *Beta vulgaris*, var. *rubra* und der *Phytolacca decandra* deuten (BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O 4:1:5; *Beta*-Hauptfarbstoff Rf = 0,06, *Phytolacca*-Hauptfarbstoff Rf = 0,03), scheinen seine Elektrophoreseresultate<sup>24)</sup> eine Ähnlichkeit dieser zwei Pigmente vermuten zu lassen (Ionenmobilität in WALPOLE Puffer, pH 4,6 bei 120 Volt, 3,93 V/cm und 20°: *Beta*-Hauptfarbstoff = + 4,5 · 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; *Phytolacca*-Hauptfarbstoff = + 4,58 · 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Unsere Resultate hingegen zeigten eine grosse Ähnlichkeit aller roten Pigmente der *Phytolacca* mit denjenigen der *Beta*<sup>11)</sup>. So fanden wir im *Phytolacca*-Saft vier Farbstoffkomponenten, welche sich durch Papierelektrophorese bei pH 4,5 (0,05 M Pyridiniumformiat) vollständig auftrennen liessen (E<sub>B</sub> = 1,34, 1,21, 1,00 und 0,88<sup>25)</sup>), und welche sich wie die Betacyane der *Beta*, nämlich Präbetanin, Isopräbetanin, *Betanin* und Isobetanin<sup>26)</sup> verhielten. (Das *Betanin* macht über 95% der roten Farbe aus.)

Um den Wert dieser papieranalytischen Methode zu prüfen und damit auch einen genaueren Einblick in die Natur der Betacyane der *Phytolacca decandra* zu gewinnen, haben wir das Hauptpigment, das Phytolaccanin (E<sub>B</sub> und R<sub>B</sub> = 1,00)<sup>11) 25)</sup> näher untersucht. Dies ist von besonderem Interesse im Zusammenhang mit biogenetischen Erwägungen über Betacyane, da die Phytolaccaceen in Botanikerkreisen allgemein als primitivste der Centrospermen-Familien angesehen werden<sup>27)</sup>.

Es ist uns gelungen, das Phytolaccanin nach dem für den Randenfarbstoff *Betanin* entwickelten<sup>28)</sup> Verfahren zu isolieren und aus Pyridiniumformiat-Lösung

<sup>21)</sup> H. HARMS, Amer. J. Pharmacy, Vol. 65, 4th Ser., Vol. 23, 1-3 (1893).

<sup>22)</sup> C. H. ICE, T. B. GAGE & S. H. WENDER, Proc. Oklahoma Acad. Sci. 32, 101 (1951).

<sup>23)</sup> H. REZNIK, Z. Bot. 43, 499 (1955).

<sup>24)</sup> H. REZNIK, Planta 49, 406 (1957).

<sup>25)</sup> Als E<sub>B</sub>- bzw. R<sub>B</sub>-Werte definieren wir die relativ zu *Betanin* zurückgelegten Wanderungs-distanzen der Fleckschwerpunkte in der Papierelektrophorese bzw. im Papierchromatogramm (vgl. 11)).

<sup>26)</sup> H. WYLER, G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU & A. S. DREIDING, Helv. 42, 1696 (1959).

<sup>27)</sup> F. BUXTBAUM, Biologie der Pflanzen 35, Heft 3, im Druck; H. CH. FRIEDRICH, Phyton (Graz) 6, 220 (1956); dort findet sich eine Zusammenstellung der früheren Literatur.

<sup>28)</sup> H. WYLER & A. S. DREIDING, Helv. 40, 191 (1957).

durch Ansäuern zu kristallisieren. Elementaranalyse und Titration<sup>29)</sup> zeigen, dass dieses Kristallisat, wie das unter analogen Bedingungen gewonnene Betanin<sup>28)</sup>, offenbar als ein partielles Pyridiniumsalz mit einer unstöchiometrischen Menge Pyridin<sup>28)</sup> anzusehen ist. Die Absorptionsbanden des Phytolaccanins im ultravioletten, sichtbaren (Fig. 1) und infraroten Bereich (Fig. 2) sind vollkommen identisch mit denjenigen des Betanins. Die beiden Farbstoffe besitzen gleiche  $E_B$ - und  $R_B$ -Werte<sup>11)</sup><sup>25)</sup>

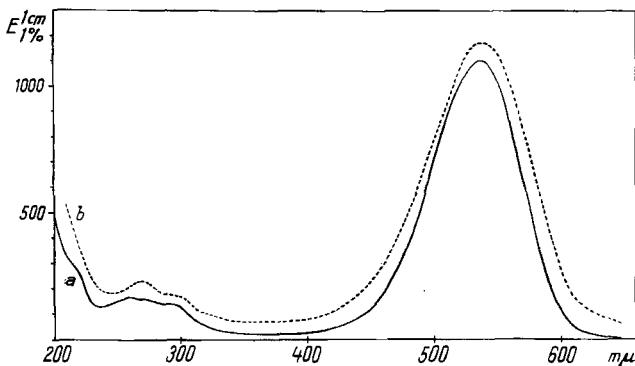


Fig. 1. Elektronenspektren des kristallisierten Phytolaccanin-pyridiniumsalzes und des kristallisierten Phytolaccanidin-hydrochlorids (in  $H_2O$ ).

a) Phytolaccanin-pyridiniumsalz; b) Phytolaccanidin-hydrochlorid.

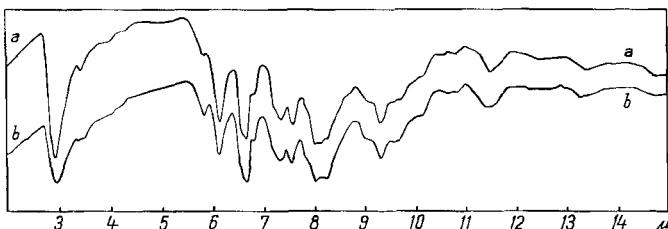


Fig. 2. IR-Spektren der kristallisierten Hauptpigmente der *Phytolacca decandra* und der *Beta vulgaris*, var. *rubra* (in KBr).

a) Betanin-pyridiniumsalz (0,5 Äquivalent Pyridin); b) Phytolaccanin-pyridiniumsalz

in den untersuchten Lösungsmitteln und zeigen die gleichen, in beiden Fällen schwach ausgebildeten und diffusen Linien in den RÖNTGEN-Pulverdiagrammen<sup>30)</sup>.

Eine saure Hydrolyse des Phytolaccanins aus der Mutterlauge der Kristallisation lieferte auf papierchromatographischem Wege identifizierte Glucose als einzigen Zucker und ein kristallisiertes Agluconhydrochlorid, welches mit einem direkt aus der Hydrolyse des Betanins kristallisierten Rohbetanidin-hydrochlorid<sup>31)</sup> verglichen wurde. Die folgenden Eigenschaften sind identisch in den beiden Präparaten: 1) Die Kristallform<sup>30)</sup>, 2) die Absorptionsspektren im UV., sichtbaren (Fig. 1) und IR.

<sup>29)</sup> Die Mikrotitrationen wurden im Labor von Dr. H. SIMON im organisch-chemischen Institut der ETH ausgeführt.

<sup>30)</sup> Die GUINIER-Aufnahmen und deren Interpretationen verdanken wir den Herren Prof. Dr. F. LAVES, Dr. W. FLÖRKE und R. GUBSER vom Institut für Kristallographie und Petrographie der ETH.

<sup>31)</sup> H. WYLER & A. S. DREIDING, Helv. 42, 1699 (1959).

(Fig. 3), 3) die papierchromatographisch feststellbare Zusammensetzung aus Betanidin- (ca. 70%) und Isobetanidin-hydrochlorid (ca. 30%), und 4) die deutlich ausgebildeten Linien in den RÖNTGEN-Pulverdiagrammen (Fig. 4)<sup>30</sup>.

Aus allen den hier angegebenen Befunden können wir schliessen, dass das Phytolaccanin mit Betanin identisch ist. Es ist wahrscheinlich, dass die roten Nebenfarbstoffe der *Phytolacca decandra* (weniger als 5% des gesamten roten Farbstoffgehaltes) dem Präbetanin, Isobetanin und Isopräbetanin entsprechen.

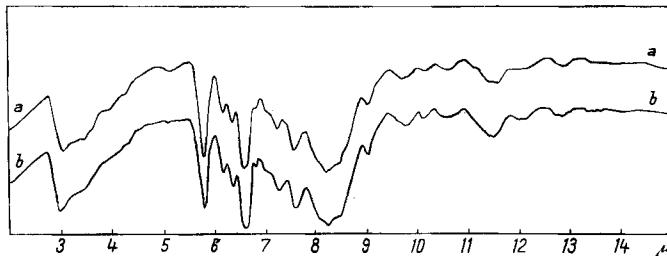


Fig. 3. IR-Spektren der kristallisierten Aglucon-hydrochloride aus der *Phytolacca decandra* und der *Beta vulgaris*, var. rubra (in KBr).

a) Betanidin-Isobetanidin-hydrochlorid (7:3); b) Phytolaccanidin-hydrochlorid.

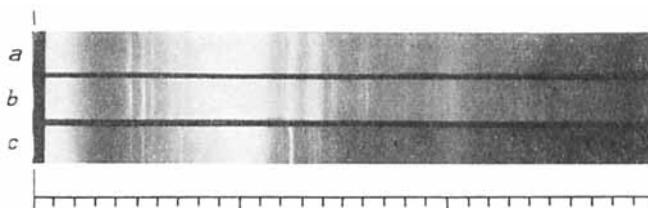


Fig. 4. RÖNTGEN-Pulverdiagramme der kristallisierten Aglucon-hydrochloride aus der *Phytolacca decandra* und der *Beta vulgaris*, var. rubra.

(GUINIER-Aufnahme mit streng monochromatischer Cu-Strahlung)

- a) kristallisiertes Gemisch von 48% Betanidin- und 52% Isobetanidin-hydrochlorid;
- b) kristallisiertes Gemisch von 72% Betanidin- und 28% Isobetanidin-hydrochlorid;
- c) kristallisiertes Aglucon-hydrochlorid aus Phytolaccanin.

Wir danken der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit. Die Anschaffung von speziellen Apparaturen wurde durch einen Kredit des JUBIÄUMSFONDS DER UNIVERSITÄT ZÜRICH ermöglicht.

### Experimenteller Teil<sup>32</sup>

**Isolierung von Phytolaccanin aus *Phytolacca decandra*-Beeren.** — 62 g tief violettrote Beeren (in der Nähe von Ascona gesammelt) wurden in 75 ml Wasser zerquetscht und der erhaltene Saft durch ein Koliertuch gepresst; ein zweiter Extrakt mit 35 ml Wasser enthielt nur noch relativ wenig Farbmateriale. Die vereinigten Extraktlösungen von total 110 ml wurden unter Umrühren mit 6,7 ml einer 23-proz. Blei(II)-acetat-Lösung versetzt bis fast aller Farbstoff ausgefällt war; die Annäherung an den Endpunkt liess sich dabei durch regelmässig entnommene Tupfproben auf Filterpapier beobachten, wobei auf die Farbabnahme der von der Fällung abfließenden Flüssigkeit geachtet wurde. Der feine, rotbraune Niederschlag des Bleisalzes wurde

<sup>32)</sup> Die Elementaranalysen und IR.-Spektren stammen aus dem Mikrolabor dieses Institutes (Leitung H. FROHOFER).

abzentrifugiert und durch abwechselndes Suspendieren und Zentrifugieren mit 25 ml Wasser und vier 20-ml-Portionen von 99-proz. Alkohol gewaschen. Die Fällung wurde dann sukzessive mit einigen Portionen von salzaurem Alkohol (100 ml 99-proz. Alkohol + 2 ml konz. HCl) extrahiert. Ein Vorextrakt mit einem Gemisch von 20 ml dieses salzauren Alkohols und 10 ml Alkohol enthielt nur wenig Farbstoff und wurde verworfen. Die nächsten vier Extrakte mit je 10 ml des salzauren Alkohols wurden filtriert und in je 150 ml abs. peroxydfreien Äther<sup>33)</sup> gegossen. Die erhaltenen Fällungen wurden zentrifugiert und ergaben nach dem Trocknen zusammen 84,7 mg angereichertes Farbmaterial. Proben dieser Fällungen in wässrigen Lösungen zeigten Extinktionen ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) von 514, 468 und 380 am Hauptabsorptionsmaximum bei 536-538  $\mu\mu$  (z. Vgl. Betanin:  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1100$  bei 536-538  $\mu\mu$ ).

**Reinigung durch Elektrophorese.** — Die oben erhaltenen, vereinigten Äther-Fällungen wurden in 3 ml 0,05 M Pyridiniumformiat und 3 Tropfen 2 M Pyridin gelöst, von wenig Rückstand durch Zentrifugieren befreit und auf eine wassergekühlte Säule (1,6 × 54 cm)<sup>34)</sup>, enthaltend 22 g WHATMAN-Papierpulver in 0,05 M Pyridiniumformiat, aufgetragen. Nach einer Elektrophoresedauer von 9 Std. 20 Min. bei 1200 Volt (30-37 Milliampera) hatte die Front der Hauptfarbstoffzone eine Distanz von 30 cm zurückgelegt. Die Papiersäule wurde ausgestossen und in 3 Zonen zerlegt: A) schwach rotviolette Vorzone (ca. 2% des Farbmaterials), B) Hauptfarbstoffzone (ca. 10 cm lang, 93% des Farbmaterials), C) hinterer Ausläufer der Hauptzone (ca. 5% des Farbmaterials).

**Zone B:** Die Farbstofflösung der Hauptzone wurde mit ca. 50 ml Wasser eluiert, filtriert und am Rotationsverdampfer auf 1,7 ml eingeengt. Das Konzentrat, welches einen pH-Wert von 3,5 aufwies, wurde unter Rühren und Eiskühlung langsam mit 0,16 ml 1 N Salzsäure versetzt, worauf bei pH 2,95 der Farbstoff in mikroskopisch feinen Nadeln auszukristallisieren begann. Die Kristallisierung blieb noch  $1/2$  Std. bei  $-5^\circ$  stehen und wurde im Kühlraum abfiltriert. Der Kristallkuchen wurde zweimal mit je 0,1 ml Eiswasser gewaschen, scharf abgesaugt und im Vakuum-exsikkator über KOH und  $P_2O_5$  getrocknet; Ausbeute 11,3 mg. Dieses Präparat war ein Pyridiniumsalz, welches eine nicht stöchiometrische Menge Pyridin (in diesem Fall etwa 0,5 Äquivalent) enthielt. Dieses Phänomen wurde schon früher beim Rübenfarbstoff Betanin<sup>28)</sup> bemerkt.

Die Analysenproben wurden im Schweinchen eingewogen und 48 Std. im Hochvakuum über  $P_2O_5$  bei Zimmertemperatur getrocknet (es ist sehr schwer, dieses äusserst hygrokopische Präparat vollkommen trocken zu erhalten).

	Äquivalent-Gewicht				
	1. + 2. Stufe			3. Stufe	
	% C	% H	% N	Stufe	
$C_{25}H_{28}O_{13}N_2$ , $(C_5H_5N)_{0,5}$	Ber. 54,68	5,09	5,80	302	604
$C_{25}H_{26}O_{13}N_2$ , $(C_5H_5N)_{0,5}$	Ber. 54,86	4,77	5,82	301	602
$C_{25}H_{28}O_{13}N_2$ , $(C_5H_5N)_{0,5}$ , $(H_2O)_{1,5}$	Ber. 52,34	5,35	5,55	315	631
$C_{25}H_{26}O_{13}N_2$ , $(C_5H_5N)_{0,5}$ , $(H_2O)_{1,5}$	Ber. 52,50	5,05	5,57	314	629
	Gef. 52,23	4,64	5,88	300	526
				304	520

Die UV.- und IR.-Spektren dieses Präparates (Fig. 1 und 2) sind identisch mit den entsprechenden Spektren eines Betanin-Pyridiniumsalzes mit einem Salzäquivalent von etwa 0,5. Ein RÖNTGEN-Pulverdiagramm nach dem GUINIER-Verfahren<sup>30)</sup> weist dieselben schwach ausgebildeten und diffusen Linien auf wie dasjenige des entsprechenden Betanin-Pyridiniumsalzes.

**Zonen A und C:** Die Eluate dieser Zonen wurden auf ca. 0,5 ml eingeengt und nur papier-elektrophoretisch und papierchromatographisch analysiert (siehe unten).

#### Analyse der Fraktionen durch Papierelektrophorese und Papierchromatographie.

— **Allgemeines.** — Die Papierelektrophorese (PE) wurde auf WHATMAN-Papierstreifen Nr. 1 (7 × 36 cm, Faserrichtung quer) in einer Apparatur nach DURRUM bei 480 Volt (freie Länge des Streifens 34 cm; Spannungsgefälle 14 V/cm) in folgenden Pufferlösungen durchgeführt:

<sup>33)</sup> Nach G. W. PUCHER, H. B. VICKERY & A. J. WAKEMANN, Ind. & Engng. Chem., analyt. Ed. 6, 140 (1934).

<sup>34)</sup> Eine Beschreibung der Elektrophoreseapparatur, welche hier gebraucht wurde, wird im Zusammenhang mit der Isolierung des Randenfarbstoffes veröffentlicht werden.

PE ( $Pf_{4,5}$ ) = Papierelektrophorese in 0,05 M Pyridiniumformiat (pH 4,5), Laufzeit ca.  $1\frac{1}{2}$  Std.

PE ( $F_{2,4}$ ) = Papierelektrophorese in 0,1 M Ameisensäure (pH 2,4) Laufzeit 2 Std.

Die Auswertung der Papierelektrophorese erfolgte in  $E_B$ -Werten<sup>25</sup>.

Die *Papierchromatographie* (PC) erfolgte auf vollständig benetzten WHATMAN-Papierstreifen Nr. 1 ( $7 \times 47$  cm, Faserrichtung quer) im absteigenden Durchlaufverfahren während einer Laufzeit von  $2\frac{1}{2}$  Std. Als Lösungsmittel diente 0,1 M Ameisensäure ( $F_{2,4}$ ). Die Resultate wurden in  $R_B$ -Zahlen ausgewertet<sup>25</sup>.

*Resultate.* – Die Zone A (ca. 2% des Gesamtfarbstofes) trennte sich in der PE ( $Pf_{4,5}$ ) in 3 rote Flecke: Einen Hauptfleck bei  $E_B$  1,0 (Betanin, Anteil ca. 0,65) und zwei Nebenflecke bei  $E_B$  1,21 (Isopräbetanin, Anteil ca. 0,20) und  $E_B$  1,34 (Präbetanin, Anteil ca. 0,15). In der PE ( $F_{2,4}$ ) sah man nur zwei Flecke bei  $E_B$  1,0 (Betanin, Anteil ca. 0,65) und einen schwachen, länglichen bei  $E_B$  1,78 (Präbetanin und Isopräbetanin, Anteil ca. 0,35). In der Papierchromatographie resultierten ebenfalls nur zwei Flecke:  $R_B$  1,0 und  $R_B$  1,23 (Anteile 0,65 resp. 0,35).

Die Zone B, welche ca. 93% des gesamten roten Farbstoffes ausmachte, zeigte in allen drei Untersuchungsmethoden nur je einen Fleck,  $E_B = R_B = 1,0$  in der PE ( $Pf_{4,5}$ ) und der PC ( $F_{2,4}$ ); dieser entsprach in seinen Eigenschaften dem Betanin.

Die Zone C enthielt noch ca. 5% des Gesamtfarbstofes. Sie setzte sich nach der PE ( $Pf_{4,5}$ ) aus zwei Komponenten zusammen:  $E_B$  1,0 (Betanin, Anteil ca. 0,4) und  $E_B$  0,88 (Isobetanin, Anteil ca. 0,6). In der PE ( $F_{2,4}$ ) trennen sich diese beiden Substanzen nicht in der üblichen Laufzeit von 2 Stunden. Erwartungsgemäss fand man deshalb nur einen Fleck bei  $E_B$  1,0. Daneben waren Spuren einer Substanz bei  $E_B$  0,26 bemerkbar. In der PC ( $F_{2,4}$ ) sah man nur einen Fleck bei  $E_B$  1,0.

#### Pigment-Inventar der roten Farbstoffe der *Phytolacca decandra*-Beere

Substanz	$E_B$ ( $Pf_{4,5}$ )	$E_B$ ( $F_{2,4}$ )	$R_B$ ( $F_{2,4}$ )	Anteil
I (Präbetanin)	1,34	1,78	1,23	ca. 0,3%
II (Isopräbetanin)	1,21	1,78	1,23	ca. 0,4%
III (Phytolaccanin = Betanin)	1,0	1,0	1,0	97,3%
IV (Isobetanin)	0,88	1,0	1,0	2,0%
V	?	0,26	?	(Spuren)

**Darstellung des Aglucons, Phytolaccanidin-hydrochlorid.** – Die Mutterlauge der Kristallisation des Phytolaccanins aus der Hauptfarbstoffzone B wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 0,5 ml 22-proz. HCl aufgenommen und 5 Min. auf 82–85° erhitzt. Schon nach drei bis vier Min. begann das Aglucon-hydrochlorid in rechteckigen Plättchen (Grösse ca.  $0,01 \times 0,027$  mm) auszukristallisieren. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde das Produkt abfiltriert, mit 2 Tropfen 22-proz. HCl gewaschen und im Vakuum über KOH und  $P_2O_5$  getrocknet; Ausbeute 4,6 mg Phytolaccanidinhydrochlorid. Zur Analyse wurde im Schweinchen eingewogen und im Hochvakuum über  $P_2O_5$  während 24 Std. getrocknet (Gewichtsverlust 6,85%; es ist sehr schwer, dieses äusserst hygroskopische Präparat vollkommen trocken zu erhalten).

$C_{19}H_{19}O_8N_2Cl$	Ber. C 52,00	H 4,36%	
$C_{19}H_{19}O_8N_2Cl, (H_2O)_{0,56}$	Ber., 50,83	, 4,52%	Gef. C 50,81 H 4,00%
$C_{19}H_{17}O_8N_2Cl, (H_2O)_{0,56}$	Ber., 51,06	, 4,09%	

Das IR.-Spektrum dieses Präparates in KBr war identisch mit demjenigen des kristallinen Gemisches von Betanidin (70%)- und Isobetanidin (30%)-hydrochlorid (Fig. 3). Der Vergleich derselben beiden Substanzen in RÖNTGEN-Pulverdiagrammen nach dem GUINIER-Verfahren<sup>30</sup> zeigte in Intensität und Lage übereinstimmende Linien (Fig. 4).

Die PE ( $Pf_{4,5}$ ) dieses Phytolaccanidin-Präparates ergab 2 Flecke  $E_B$  1,03 und  $E_B$  0,87 im Intensitätsverhältnis von 7:3 (geschätzt). Dies entsprach vollkommen dem als Vergleich mitlaufenden kristallinen Betanidin-Isobetanidin-Gemisch. In der PE ( $F_{2,4}$ ) sah man nur einen Fleck bei  $E_B$  0,64, an derselben Stelle wie denjenigen des Betanidin-Isobetanidin-Gemisches. In der PC ( $F_{2,4}$ ) zeigte sich ein Hauptfleck bei  $R_B$  0,54 in gleicher Weise wie dies auch beim mitlaufenden Betanidin-Isobetanidin-Gemisch der Fall war. In der PE ( $F_{2,4}$ ) und der PC ( $F_{2,4}$ ) liegen die  $E_B$ - und  $R_B$ -Werte von Betanidin und Isobetanidin so nahe beieinander, dass sie sich in der Laufzeit von zwei Stunden nicht auftrennen.

**Analyse des Zuckers.** – Die Mutterlauge der Kristallisation des Phytolaccanidins aus der salzauren Hydrolyse wurde zur Trockne eingedampft, in 2 ml Wasser aufgenommen, auf eine

Säule von 9 ml Dowex 2 (OH-Form) gegeben und mit 15 ml Wasser durchgewaschen. Das zur Trockne eingedampfte farblose Eluat wurde in 10 Tropfen Wasser gelöst; 12 Aufträge dieser Lösung auf eine Fleckgrösse von 4 mm Durchmesser auf WHATMANN-Papier 47 × 7 cm erwiesen sich als genügende Konzentration für eine eindeutige Identifikation. Im absteigenden Chromatogramm mit frisch angesetztem Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 zeigte sich nach einer Laufzeit von 14 Stunden nur ein Fleck  $R_f = 0,20$  (entwickelt mit Anilinphthalat), welcher mit einem solchen von gleichzeitig wandernder Glucose identisch war.

#### SUMMARY

The major red-violet pigment of *Phytolacca decandra* L. (pokeberry), called phytolaccanin, has been isolated and crystallized. The elementary analysis, the UV-, visible and IR.-spectra and the electrophoretic as well as the chromatographic behaviour on paper indicated its identity with betanin, the pigment of the red beet.

This conclusion was confirmed by the acid hydrolysis of phytolaccanin which yielded a crystalline aglucone, identified as a mixture of betanidin and isobetanidin hydrochlorides by its spectra, its x-ray powder diagram and other analyses.

Besides betanin, which accounts for more than 95% of the red pigment, the pokeberry was found to contain small amounts of three other pigments which are probably isobetanin, prebetanin and isoprebetanin.

Zürich, Organisch-Chemisches Institut der Universität

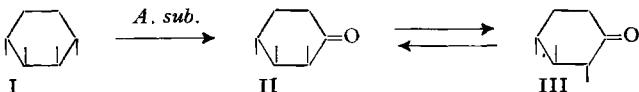
### 31. Sur une $\delta$ -lactono-épimérase I<sup>1)</sup>.

#### Préparation et propriétés

par Th. Posternak et P. Waegell

(7 XII 60)

Il y a quelques années, POSTERNAK & REYMOND<sup>2)</sup> montrèrent qu'*Acetobacter suboxydans*, souche KLUYVER & DE LEEUW, contient un ferment en présence duquel s'effectue la réaction suivante: la trihydroxy-2,3/4-cyclohexanone (II), formée sous l'action du microorganisme par déshydrogénéation du cyclohexanetétrol-2,3/1,4 (dihydroconduritol) (I), est épimérisée d'une manière réversible en trihydroxy-3/2,4-cyclohexanone (III). Ce ferment (épimérase) a été retrouvé dans deux autres souches d'*A. suboxydans*, qui diffèrent d'ailleurs considérablement de la première souche par leur capacité de déshydrogénéation des cyclitols. L'enzyme passe assez facilement en solution; il est présent dans les extraits acellulaires des microorganismes.



Les trihydroxycyclohexanones II et III n'étant pas des substances naturelles, il était probable que les réactions observées résultait d'un défaut de spécificité de

<sup>1)</sup> Communication préliminaire: IV. Congr. Int. Biochim.; résumés des communications, 52 (1958).

<sup>2)</sup> Th. POSTERNAK & D. REYMOND, Helv. 38, 195 (1955).