Über das Anthocyanin in den dunkelpurpurnen Blüten von *Tulipa Gesneriana* L.*

Studien über die Physiologie von Liliaceen I

von Mannen SHIBATA**

柴田萬年**：暗紫色花チューリップのアントシアニンについて*

(百合科植物の生理学的研究 I)

Eingegangen am 30. Juni 1956.

Der Blütenfarbstoff von *Tulipa Gesneriana* L., dem verbreiteten und beliebten Gartenpflanzen aus der Familie Liliaceen, bildet den Gegenstand vorliegender Mitteilung. Diese Gartenpflanze wird in der Umgebung von Stadt Tonami in Toyama Präfektur in grossem Umfang gepflanzt und blüht in der Frühlingszeit fast auf einmal auf.

Anfang Mai 1953 habe ich eine Gelegenheit gehabt, eine Menge Blüten der genannten Pflanzen abzupflücken und in frischem Zustand zu chemischen Untersuchungen heranzuziehen.

Als Untersuchungsmaterial benutzte ich eine leicht in Menge anschaffbare, dunkelpurpurn*** blühende Sorte „Queen of night“, die im Jahre 1950 von den Niederlanden eingeführt wurde.

Das Ausziehen des Anthocyanins wurde wie üblich durch Einlegen des Materials in 1-proz. methanolische Salzsäure ausgeführt, und aus dem dunkelroten Extrakt wurde der Farbstoff bequem als Bleiverbindung niedergeschlagen. Nach der Behandlung mittels chlorwasserstoffhaltigen Methanols wurde der Farbstoff mit viel Äther ausgefällt. Aus der gefällten Farbstofffraktion, die noch mit kleiner Menge Begleitstoffen verunreinigt ist, kann man das Anthocyanin ohne Schwierigkeit dadurch reinigen, dass man die obige flockige Fällung in 1-proz. kalte äthanolische Salzsäure aufnimmt und mit viel Äther nochmals ausgefällt.

Der ausgefällte amorphe Farbstoff wird in wenigen kaltem Äthanol aufgenommen, filtriert und sofort in 1/2 Vol. kalte 20-proz. äthanolische Salzsäure eingetragen.

Schon nach kurzem Stehen beginnt die Kristallisation des Anthocyaninchlorids. Das abgesaugte Kristallisat war wie erwartet gering, die Ausbeute betrug 0.14 Proz. des frischen Ausgangsmaterials.

* Vorgetragen an der jährlichen Versammlung der Botanischen Gesellschaft von Japan, die den 13. Okt. 1955 in Hiroshima abgehalten wurde.

** Biologisches Institut der Universität zu Toyama, Japan. 富山大学文理学部生物学教室

*** Sie wird gewöhnlich von Blumenzüchtern „schwarz“ genannt.

Vor ungefähr zwanzig Jahren haben G. M. Robinson und R. Robinson mit Hilfe einer von ihnen ausgearbeiteten qualitativen Methode den Blütenfarbstoff mehrerer Sorten von *Tulipa Gesneriana* L. untersucht und berichtet, dass er sich meistens als Glukosid des Pelargonidins oder in einigen Sorten überdies mit einer kleinen Menge von Cyanidinglukosid gemischt befinde.

Nach dem Ergebnis meiner Versuche, die die Reindarstellung des Farbstoffs zum Ziel hatten, wurde der Befund Robinsons als verschieden erkannt, obwohl seine Sorte von *Tulipa* nicht mit meiner identisch war. Nach meinen quantitativen Versuchen gab 1 Mol Anthocyaninchlorid 1 Mol Glukose, 1 Mol Rhamnose und 1 Mol zuckerfreien Farbstoff und der letztere konnte chemisch, papierchromatographisch sowie auch spektrophotometrisch mit Delphinidinchlorid identifiziert werden.

Die Verteilungszahl dieses Farbstoffs war ca. 7.2.

Aus dem oben gesagten liess sich das Anthocyanin als ein Delphinidinrhamnoglukosid erkennen. Daher wird der neue Blütenfarbstoff provisorisch „Tulipanin“ genannt. Wegen der Knappheit an Menge ist es aber mir leider bis jetzt noch nicht gelungen, die Lage der Zuckerbindung festzustellen.

Beschreibung der Versuche

Isolierung von Tulipaninchlorid.

17.35 kg frische, von Blütenständen abgenommene Kronenblätter* („Queen of night“) wurden mit 18 l 1-proz. methanolischer Salzsäure übergossen, 9 Stunden lang stehen gelassen und hierauf von dem roten Extrakt durch Pressen abgetrennt. Der Extraktückstand wurde von neuem in 8 l Methanol über Nacht liegen gelassen, abgenutscht und mit 2 l Methanol gut gewaschen. Die vereinigte Extraktionsflüssigkeit ist zähflüssig, da sie noch viel schleimige Begleitstoffe enthält. Aus diesem Filtrat fällt man durch Zusatz von gesättigter Bleiacetatlösung den Farbstoff in rohem Zustand als wattenartiges, blaues Bleisalz aus, wobei die methanolische Mutterlauge noch etwas schmutzig purpurn gefärbt erscheint.

Dieses Bleisalz, welches sofort abgenutscht und nacheinander mit Wasser und Äthanol gründlich gewaschen wurde, wiegt in lufttrockenem Zustand ca. 708 g. Es ist klar, dass mit diesem blauen Bleisalz eine beträchtliche Menge von Bleichlorid mitgerissen wird. Dieses Bleisalz wird in einer Reibschale fein pulverisiert und in 1500 ccm 5-proz. methanolischer Salzsäure unter Wasserkühlung und Anrühren mit Glasstab in mehreren Portionen eingetragen, wobei der Farbstoff sehr leicht als Chlorid in Lösung geht.

Nach dem Abfiltrieren des ausgefällten Bleichlorids, das weiter mit 800 ccm Methanol gut ausgewaschen wird, versetzt man das vereinigte tiefrote Filtrat mit fünffachem Volumen Äther, wobei das Anthocyaninchlorid als flockiger Niederschlag

* Dieses Material wurde durch Gütegkeit von Herrn M. Neo in seinem Garten gesammelt, wofür ich ihm auch an dieser Stelle herzlich danken möchte.

ausfällt, welcher sich alsbald zu einer dichteren Masse am Boden des Kolbens zusammenzieht. Nach dem Abdekantieren der oben stehenden Mutterlauge löst man nun die Farbstoffmasse in 1-proz. äthanolischer Salzsäure auf, filtriert und fällt den Farbstoff durch Zugabe von viel Äther aus. Der erhaltene amorphe Niederschlag wird nach übernachtigem Stehen abgenutscht und sofort in kleine Menge von kaltem Äthanol eingetragen, wobei er allmählich in Lösung geht. Die dunkelrote Äthanol-lösung des Anthocyanins wird filtriert und beim Zusatz von 1/2 Volumen 20-proz. äthanolischer Salzsäure tritt das Tulipaninchlorid als tief schokoladenfarbige, fast schwarz aussehende Masse teilweise auf. Nach dem Stehen über Nacht im Eisschrank ist die Auskristallisation vollständig. Die abgesaugten Kristalle bestanden aus fast schwarz aussehenden prismatischen Nadeln, die ca. 22 g wogen. Die Mutterlauge wird zu weiterer Ausbeute unter Zugabe von weniger 20-proz. äthanolischer Salzsäure noch einige Tage stehen gelassen. Diese nachherigen Ausscheidungen sind nur gering (ca. 3 g) und etwas unrein. Die Ausbeute betrug nämlich 0.14 Proz. des frischen Ausgangsmaterials.

Dieser rohe Farbstoff wird in einer möglichst kleiner Quantität heissen Wassers gelöst und filtriert und das Filtrat wird mit gleichem Volumen 20-proz. äthanolischer Salzsäure vermischt. Schon nach kurzem Stehen tritt eine Trübung der Lösung ein und beginnt die Kristallisation des Tulipaninchlorids, was gewöhnlich in einigen Stunden endet. Die Verbindung bildet dabei äusserst feine, schokoladenfarbige, prismatische Nadelchen. Drei- bis viermalige Wiederholung dieses Verfahrens brachte das Tulipaninchlorid in vollkommen reinen Zustand, wobei man unterm Mikroskop schöne rotbraune Nadelchen sehen konnte, welche einen prachtvollen Goldglanz gaben.

Beschreibung des Tulipaninchlorids.

Tulipaninchlorid kristallisiert, wie aus Fig. 1 ersichtlich, zu prismatischen Nadelchen, die sich beim Erhitzen in einem Schmelzpunktröhrchen von 177°–178° (unkorr.) ab zusammenziehen und zersetzen.

Fig. 1.

Hinsichtlich der Verteilung zwischen *iso*-Amylalkohol und 0.5-proz. Salzsäure verhielt sich das Tulipaninchlorid monoglykosidisch, wie es bei den Rhamnose enthaltenden Diglukosiden gewöhnlich der Fall ist. Nämlich geht ca. 7.2 Proz. des Tulipaninchlorids aus wässriger Schicht in den *iso*-Amylalkohol über. Wie es sich aus den Details unten ersehen lässt, ist dieser *Tulipa*-Farbstoff in manchen Eigenschaften dem R. Robinson u. A. (1934) aus den blauen Blüten von *Salvia patens*, dem von C. Kuroda (1935)

aus dem himmelblauen Blüten von *Commelina communis* var. *hortensis* isolierten Delphin und dem von K. Hayashi (1936) aus der azurblau blühenden Sorte von *Hyacinthus orientalis* L. isolierten Hyacin ähnlich.

Um den Vergleich zu erleichtern, werden einige leicht ermittelbare Eigenschaften der drei Verbindungen in folgender Tabelle zusammengestellt:

	Delphinchlorid*	Hyacinchlorid*	Tulipaninchlorid
Kristallform	kurze, flache blattartige Kristalle	linsenförmige Täfelchen	prismatische Nadelchen
Zersetzungspunkt	—	188° (von 185° ab zusammenziehen)	177°-178° (unkorr.)
Löslichkeit	in kaltem Wasser, Alkohol u. verd. Salzsäure sehr schwer löslich (od. unlöslich)	in kaltem Wasser sehr schwer, in heissem Wasser löslich; in kaltem Äthanol sehr schwer löslich; in verd. HCl verhält es sich fast gleich wie Wasser	in kaltem Wasser, Äthanol und verd. Salzsäure ziemlich löslich
Bildung von Pseudobase	beim Erhitzen in H ₂ O od. Äthanol tritt die Pseudobasebildung leicht ein	dieselbe Reaktion tritt nur schwer ein	beim Erhitzen in Wasser od. Äthanol tritt die Pseudobasebildung sehr schwer ein
Reaktion mit Soda-lösung	rein blau und bald grün	rein blau, nach einigen Sekunden blaugrün und bald grün	rein blau, nach einigen Sekunden gelbbraun
Reaktion mit Natronlauge	dieselbe Farbänderung, aber geht die Reaktion sehr schnell vor sich	momentan blau, dann plötzlich grün u. bald gelbbraun	momentan rein blau, dann grün und bald gelbbraun
Reaktion mit Na-Acetat	violett-blau	violett	violett, ziemlich stabil
Reaktion mit FeCl ₃	blauviolett (in Wasser) violettblau (in Äthanol)	tief blau, aber mit einem Stich ins violett (in Wasser); tief himmelblau (in Äthanol)	violett (in Wasser); blauviolett (in Äthanol)
Reaktion mit Bleiacetat	königblauer Niederschlag (royal blue)	blauer Niederschlag	tief blauer Niederschlag
Reaktion mit Pikrinsäure	kein Niederschlag	kein Niederschlag	kein Niederschlag

Die Analysenzahlen des Tulipaninchlorids sind wie folgt:

3.448 mg lufttrockene Subst. verloren im Vakuum (2 mm Hg) bei 105° über P₂O₅ 0.420 mg an Gewicht.

3.028 mg wasserfreie Subst.: 5.424 mg CO₂; 1.168 mg H₂O

C₂₇H₃₁O₁₆Cl Ber. C 50.10, H 4.83
Gef. C 48.88, H 4.32

C₂₇H₃₁O₁₆Cl·5H₂O Ber. H₂O 12.22
Gef. H₂O 12.18

* Zitiert nach K. Hayashi: Acta Phytochim. 9: 28 (1936)

Hydrolytische Spaltung von Tulipaninchlorid.

Zur sauren Hydrolyse wird 1.3017 g reinen Tulipaninchlorids ($C_{27}H_{31}O_{16}Cl \cdot 5H_2O$) in 100 ccm warmem Wasser gelöst, 60 ccm konz. Salzsäure (sp. Gew. 1.18) gefügt, 3 Minuten lang gekocht, und nachher über Nacht in Eiswasser gestellt. Beim Abkühlen mit Eiswasser schied sich der zuckerfreie Farbstoff in den fächer- oder fischschwanzförmigen Tafeln fast quantitative aus (Fig. 2). Das abgespaltene Aglykon

Fig.2.

(Delphinidin) fiel dabei fast gänzlich aus und konnte abgenutscht werden. Die Kristalle sehen in der Masse fast schwarz aus und zeigten einen prachtvoll grünen Glanz. Sein Gewicht beträgt in exsikkator-trockenem Zustand (über $CaCl_2$) 0.6118 g, nämlich ca. 47 Proz. des Tulipaninchlorids. Es besitzt die charakteristische Lösungsfarbe, das Absorptionsspektrum und die sonstigen Eigenschaften des von Willstätter beschriebenen Delphinidinchlorids.

Die saure wässrige Lösung ist rosa gefärbt, und enthält dann nur Spuren von Delphinidin. Man wäscht nun die saure Lösung und den abgesaugten Farbstoff mehrmals mit Äther aus, und die ätherischen Auszüge hinterlassen nach dem Verdampfen keinen merklichen Rückstand, woraus zu schliessen ist, dass etwaige bei gewissen Anthocyanen gebunden angetroffene organische Säure hierbei nicht vorhanden ist.

Mit Äther erschöpfend ausgezogene, saure Flüssigkeit, welche die abgespaltenen Zucker enthält, wurde zur Entfärbung mit *iso*-Amylalkohol gründlich geschüttelt. Die Amylalkoholreste wurden durch Ausschütteln mit Äther entfernt, dann mit Sodalösung neutralisiert, und die farblose Lösung wurde unter vermindertem Druck zum Trocken verdampft. Aus dem hinterbleibenden Rückstand wird weiter in üblicher Weise das Osazon dargestellt. Das gebildete Osazon wird mit Aceton behandelt, aus dem in Aceton löslichen Teil gewinnt man ganz einheitliche Nadelbüschel, welche nach einmaligem Umlösen den Schmp. 180° zeigten, und aus dem in Aceton unlöslichen Teil gewinnt man gelbe Nadeln vom Schmp. 204° . Wird das erstere mit reinem Rhamnosazon vom Schmp. 183° und das letztere mit reinem Glukosazon vom Schmp. $204-5^\circ$ gemischt, so bemerkt man keine Schmelzpunktserniedrigung, woraus zu schliessen ist, dass die Zucker Rhamnose und Glukose sind. Zugleich ist mit Hilfe von papierchromatographischer Methode Glukose und Rhamnose bestätigt.

Beschreibung des Aglykons (Delphinidinchlorid)

Der zuckerfreie Farbstoff von *Tulipa*-Blüten verhält sich in allen Punkten gleich wie Delphinidin, das zum erstenmal von R. Willstätter u. A. gewonnene Anthocyanidin aus *Delphinium*-Blüten.

Aus 99 proz. Äthanol unter Zusatz von ein wenig 20 proz. äthanolischer Salzsäure umkristallisiert, fällt das Delphinidin meistens als Aggregat von äusserst

feinen Nadelchen (Fig. 3). Die qualitativen Reaktionen des Farbstoffs mit NaOH, Na₂CO₃, FeCl₃ u. a. und dessen Reduktionsvermögen der Fehlingschen Lösung in der Kälte usw. stimmt mit der Literaturangabe gut überein. Das Aglykon enthält keine Methoxylgruppe nach der Methode von Zeisel-Pregl.

Das im Chlorcalcium-Exsikkator getrocknete und unter vermindertem Druck bei 105° getrocknete wasserfreie Delphinidinchlorid (ohne besondere Reinigung) ergibt die folgende Analysenzahlen.

2.800 mg lufttrockene Subst. verloren im Vakuum (2mm Hg) bei 105° über P₂O₅ 0.185 mg an Gewicht.

2.619 mg wasserfreie Subst.: 5.058 mg CO₂; 0.714 mg H₂O

C₁₅H₁₁O₇Cl Ber. C 53.15, H 3.25

Gef. C 52.78, H 3.06

C₁₅H₁₁O₇Cl·1½ H₂O Ber. H₂O 7.38

Gef. H₂O 6.61

Die Absorptionsspektren von *Tulipa*-Farbstoffen.

Die Absorptionsspektren von dem in der Natur auftretenden Anthocyanidin, wie K. Hayashi in seiner dritten Mitteilung über die spektrographischen Untersuchungen der Farbstoffe von Anthocyanidintypus ausführlich beschrieben hat, wurden zur Kon-

Fig. 3.

Fig. 4.

stitutionsermittlung des hier aus *Tulipa*-Blüten isolierten, zuckerfreien Farbstoffs nutzbar gemacht. Hierbei werden auch die Absorptionskurven des Glukosids sowie des Aglykons dargestellt. Zum Spektrographieren wurde das Aglykon in absolutem Äthanol

(5×10^{-5} Mol) und das Glukosid in 60 proz. Äthanol (4×10^{-5} Mol) gelöst, wobei der Chlorwasserstoffgehalt der Lösungsmittel zu 0.1 Proz. eingestellt wurde (Fig. 4).

Aus der Kurvenform und Absorption in der Nähe von $358 \text{ m}\mu$, wie in Fig. 4 angegeben ist, kann man darauf schliessen, dass das *Tulipa*-Aglykon nichts anderes als Delphinidin selbst ist. Noch weiter stimmt *Tulipa*-Aglykon mit Delphinidin-Präparat von K. Hayashi nach papierchromatographischer Methode gut überein.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Hayashi in der Tokyo Universität für Erziehung für seine vielseitige Belehrung und stetige Anregung meinen tief gefühlten Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis

Hayashi K., Acta Phytochim. 8: 68 (1934). ———, Ebenda 9: 25 (1936). Kuroda C. und Wada M., Proc. Imp. Acad. Tokyo 11: 235 (1935), ———, Ebenda 11: 238 (1935). Reynolds, T. M., Robinson R. und Scott-Moncrieff R., Journ. Chem. Soc. London 1934: 1235. Robinson G. M. und Robinson R., Biochem. Journ. 25: 1698 (1931); 26: 1657 (1932). Willstätter R. und Mieg W., Liebig's Ann. Chem. 408: 80 (1915).

A Large Silicified Wood of *Aleurites* from the Miocene of Isikawa Prefecture, Honsyu*

by Shunji WATARI**

亘理俊次**: 石川県中新世産のアブラギリ属の化石木*

Received June 30, 1956

Recently the writer received a fragment of silicified wood, about $7 \times 10 \times 15 \text{ cm}$ in size, together with a set of ground sections from Mr. H. Matsuo of the Geological Institute of the Kanazawa University. According to him the specimen was obtained from a huge trunk more than one meter in largest diameter and at least five meters in length, and he also announced that it was found from a green tuff formation (Miocene) at Seryo, Oosugidani-mura, Nomi District, about thirty Km southwest from Kanazawa City, Isikawa Prefecture.

For precise identification, several additional sections were cut. The state of preservation of internal structures in these sections is found to be fairly poor, inflation, deformation or disorganization of elements being observed elsewhere. However small areas which retain a considerable detail of structures are scattered here and there in most of these sections, and after carefully examining through them the

* Contributions from the Division of Plant-Morphology, Botanical Institute, Faculty of Science, University of Tokyo, N. S. No. 73.

** Botanical Institute, Faculty of Science, University of Tokyo. 東京大学理学部植物学教室