96. Studien über Anthocyane. XX¹⁾.

Über Empetrin, einen neuen Farbstoff der japanischen Rauschbeeren.

Von Kôzô HAYASHI, Gen SUZUSHINO und Kazuhiko ÔUCHI.

Forschungsanstalt für Naturezeugnisse, Tokyo.

(Comm. by Y. ASAHINA, M.J.A., Oct. 12, 1951.)

Behandelt man die fast schwarz aussehenden, reifen Früchte von japanischen Rauschbeeren (*Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch) mit methylalkoholischer Salzsäure und versetzt die Lösung mit wässrigem Bleizucker, so erhält man die Bleiverbindung des Farbstoffs in Form von blauem voluminösem Niederschlag. Durch Verwandlung desselben mittels methylalkoholischer Salzsäure ins Chlorid und Fällung mit Äther, wird der Farbstoff in harzigem Zustand gewonnen. Obwohl das daraus dargestellte Anthocyanin-pikrat prachtvolle Krystalle bildet, so doch ist das regenerierte Chlorid immer noch schwer krystallisierbar und enthält einen geringen Gehalt an Methoxyl. Nach mühsamen Aufarbeiten ist es uns endlich gelungen, ein neues, methoxyl-freies Monogalaktosid des Delphinidins zu isolieren, das wir „Empetrin“ zu nennen vorschlagen. Da der Rohfarbstoff bei der Hydrolyse neben viel Delphinidinchlorid eine geringe Menge einen schwerlöslichen, methoxylierten Anthocyanidinchlorids, welches wohl Malvidinchlorid zu sein scheint, liefert, so besteht der mit Salzsäure behandelte Farbstoff der japanischen Rauschbeeren aus

Versuchsteil.

Isolierung und Beschreibung des Empetrins.

4.5 kg frische Beeren, die in Sugadaira (Pref. Nagano) am Mitte September gesammelt worden waren, wurden mit 2.8 l l-proz. methyl

1) XIX. Mitteil.: Acta Phytochim., **15**, 223 (1949); vgl. auch Proc. Japan Acad., **25**, 107 (1949).

2) K. Hayashi: Acta Phytochim., **15**, 35, 45 (1949).

alkoholischer Salzsäure überschichtet, 20 Stunden stehen gelassen, abgepresst und nochmals mit 1.8 l demselben Extraktionsmittel in gleicher Weise behandelt, und schliesslich mit 1 l Wasser nachgewaschen. Der ausgezogene Farbstoff wurde dann durch Zusatz von überschüssigem Bleizucker (20% aq.) als blaues Bleisalz ausgefällt (lufttrocken, ca. 200 g). Dieses wurde, wie üblich, mittels 5-proz. methylalkoholischer Salzsäure ins Chlorid rückverwandelt; das letzte wurde mit 5 Vol. Äther ausgefällt, die Fällung in 350 ccm Wasser aufgenommen und nochmals in eine violett-stichig blaue Bleiverbindung übergeführt. Zur Reinigung wurde das Bleisalz mit Eisessig gründlich entzogen, dann durch Vermischen mit Äther das blaue Bleisalz wieder ausgefällt. Nach der Rückverwandlung ins Chlorid und darauffolgendem Fällen mit Äther, wurde das Anthocyaningemisch als braunrote Flocken erhalten. Die abgesaugte Verbindung löste man in 50 ccm warmem Wasser auf und mit 150 ccm kalt-gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt. Bald trat eine karminrote Abscheidung hervor, die überwiegend aus Nadeln und zum Teil aus prismatischen Platten bestand. Lufttrocken, 4.2 g (ca. 0.1 Proz. des frischen Ausgangsmaterial).

Bloss durch Umkrystallisieren des Pikrats schien die Trennung von beiden Farbstoffkomponenten sehr schwierig zu sein; aber fanden wir schliesslich, dass das Empetrin durch Überführung in das schwerlösliche Chlorid rein isoliert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden etwa 4 g Pikratkrystalle mit 50 ccm 5-proz. methylalkoholischer Salzsäure digeriert, worauf sich eine halb-krystalline Abscheidung entstand, die in Massen dunkel schokoladenfarbig aussah. Ausbeute ca. 1.8 g. Nun löst man 1 g obiger Substanz

Fig. 1. Empetrinchlorid.

in 15 ccm warmem Wasser, fügt dazu 6 ccm 20-proz. Salzsäure und 15 ccm Aceton. Bald kommt das Empetrinchlorid als charakteristische, tonnenförmige Blättchen zur Abscheidung (Fig. 1). Einzelkrystalle erschien rotbraun, aber in Massen tief schokoladenfarbig mit prachtvollem Goldglanz. Schmp. 177° (Zers.) im lufttrocken, und Schmp. 185° (Zers.) im wasserfreien Zustand. Prüfung auf Methoxylgruppen fiel ganz negativ aus.

Krystallwasser-Bestimmung:

Sbst. 3.561 mg: Gew.-Verl. 0.395 mg (100° , P_2O_5 , 3 mm Hg).

$C_{21}H_{21}O_{12}Cl \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$. Ber. H_2O 11.18. Gef. H_2O 11.09.

Bezüglich einen ca. 2 Monaten über $CaCl_2$ aufbewahrten Präparats:

Sbst. 3.095 mg: Gew.-Verl. 0.311 mg (100° , P_2O_5 , 3 mm Hg).

$C_{21}H_{21}O_{12}Cl \cdot 3H_2O$. Ber. H_2O 9.74. Gef. H_2O 10.05.

C-H-Bestimmung einen wasserfrei getrockneten Präparats:

Sbst. 2.784 mg: CO₂ 5.143 mg, H₂O 1.099 mg.

C₂₁H₂₁O₁₂Cl. Ber. C 50.35, H 4.20.

Gef. „ 50.41, „ 4.42.

Das Empetrinchlorid löst sich leicht in Wasser, Alkohol, Methylalkohol sowie in Salzsäure von verschiedener Konzentration. Aber in 20-proz. Salzsäure ist es schwer löslich und scheidet sich hieraus bisweilen in watte-ähnlichem Gebilde, wie vorher beim Uliginosin

Fig. 2. Empetrinpikrat.

(Malvidin-3-galactosid) beobachtet wurde. Lösungsfarbe und Farbenreaktionen stehen, im grossen und ganzen, mit denen des Idaeins nahe. Verteilungszahlen zwischen *iso*-Amylalkohol und 0.5-proz. Salzsäure ermittelten wir als 8 bei erster, und 7.5 bei zweiter Schüttelung. Beim Verseifen mit kalter 10-proz. Natronlauge gibt das Empetrin keine nachweisbare, organische Säure ab; somit ist dieses Anthocyanin frei von esterartig gebundenen Acylgruppen. Das Pikrat (Fig. 2) bildet sich karminrote Nadeln vom Schmp. 180–181° (Zers.). Das Chlorid gibt eine in Fig. 4 angegebene Absorptionskurve, aus welcher es in den Delphinidinderivaten zurückgeführt werden kann.

Hydrolyse des Empetrins.

Man löst 64 mg getrockneten Glykosidchlorids in 7 ccm 20-proz. Salzsäure und hält die Flüssigkeit 3 Minuten im Kochen und kühlt sogleich in Leitungswasser ab. Das zuckerfreie Farbstoffchlorid fällt in schwalbenschwanzähnlichen Gebilden aus (Fig. 3).

Fig. 3. Delphinidinchlorid.

Mutterlauge wurde der Zucker, wie üblich, auf titrimetrischem Wege nach Bertrand bestimmt, wobei die Zuckermenge 20.04 mg Galactose¹⁾ entsprach. Also fanden wir folgende Prozentzahlen:

1) Dass der Zucker Galactose ist, stellten wir fest, durch Überführung desselben in Phenylsazon (Schmp. 179–181°) sowie in α-Methylphenylhydrazon (Schmp. 185–6°).

Aglykon des Empetrins (Delphinidinchlorid).

Das zuckerfreie Farbstoffchlorid, welches durch Spaltung mit 20-proz. Salzsäure gewonnen worden war, krystallisiert in den in Fig. 3 angegebenen Gebilden aus. Es löst sich in Alkoholen spielend leicht, und sogar in Wasser sowie in verdünnter Salzsäure sehr gut. Es zeigt mit Eisen(III)chlorid eine azurblaue Färbung. Es fällt aus wässriger Lösung als schwer lösliches Pikrat fast vollkommen aus. Die Verbindung ist ganz frei von Methoxyl. Schon aus solchen und auch anderen Beschaffenheiten sind wir am ehesten vorauszusetzen, dass das Aglykon Delphinidin sei. Derselbe Umstand wurde weiter gestützt durch Messung von Lichtabsorption (Fig. 4) und durch folgende Analysendaten:

Fig. 4. Die Farbstofflösung wurde bereitet in einer 1/4000-molaren Konzentration, wobei das Glykosid in 60-proz. Alkohol (0.1 Proz. HCl) und das Aglykon in abs. Alkohol (0.1 Proz. HCl) aufgelöst wurde. Die Absorptionskurve wurde nach dem System Hartley-Baly's dargestellt.

Krystallwasser-Bestimmung.

- i) Ein aus 20-proz. Salzsäure auskrystallisierendes Präparat:
Sbst. 3.373 mg: Gew.-Verl. 0.184 mg (100°, P₂O₅, 3 mm Hg).
C₁₅H₁₁O₇Cl·H₂O. Ber. H₂O 5.05, Gef. H₂O 5.45.
- ii) Ein aus 13~14-proz. Salzsäure umkrystallisiertes Präparat:
Sbst. 3.619 mg: Gew.-Verl. 0.354 mg (100°, P₂O₅, 3 mm Hg).
C₁₅H₁₁O₇Cl·2H₂O. Ber. H₂O 9.61, Gef. H₂O 9.78.

C-H-Bestimmung einen wasserfreien Präparates:

Sbst. 3.189 mg: CO₂ 6.219 mg, H₂O 1.006 mg.
C₁₅H₁₁O₇Cl. Ber. C 53.17, H 3.25.
Gef. „ 53.22, „ 3.53.

Hydrolyse des rohen Anthocyangemisches.

Das rohe Anthocyaninchlorid, welches man aus ursprünglichem Glykosidpikrat regeneriert hat, wurde durch Verkochen mit 20-proz. Salzsäure, in zwei Komponenten, Anthocyanidin und Zucker, aufgespalten, wobei andere Spaltstücke, z. B. organische Säuren, keineswegs nachgewiesen wurden. Die Zuckerkomponente, die in der sauren Hydrolyseflüssigkeit gelöst blieb, bestand aus Galactose allein, während das Aglykon, wie unten beschrieben, eine Mischung von zwei Anthocyanidinen darstellte. Unterm Mikroskop beobachtet man braunrote, nicht deutlich krystallisierende Substanz, welche gewöhnlich mit einer kleiner Menge von nadeligen Krystallen beigemengt ist.

Die quantitativen Bestimmungen der beiden Spaltstücke ergaben die folgenden Zahlen :

Glykosidchlorid (getrocknet) mg	Gesamtaglykonchlorid (getrocknet)		Zucker (Galactose)		
	mg	%	mg	%	
310.2	200.1	64.5	{ 83.5	26.9	Polarimetr. Titrimetr. Polarimetr. Titrimetr. „
805.5	575.4	71.4	{ 80.0	25.8	
			{ 232.5	23.9	
95.4	67.0	70.2	{ 222.0	27.5	
			29.36	30.8	
Als Delphinidin-monogalactosid erwarten wir : 67.4				36.0	

Das oben erhaltene Rohanthocyanidin, an welchem wir stets ca. 2 Proz. Methoxyl nachweisen könnten, wurde mit 0.5~1-proz. Salzsäure in der Wärme behandelt, wobei die Substanz grösstenteils in Lösung ging, aber ein kleinerer Teil davon ungelöst zurückblieb. Das in Lösung gegangene Anthocyanidin liess sich durch Zusatz von zwei-fachem Volumen 20-proz. Salzsäure als braunrote Nadeln abscheiden, die von Methoxyl ganz frei waren, und als Delphinidin gut charakterisiert wurden.

Der unlösliche Anteil wurde, unter den für Malvidin angeschriebenen Krystallisationsbedingungen, als prismatische Nadeln gewonnen. Die Substanz zeigt mit Eisen(III)chlorid eine Vertiefung der Lösungsfarbe ins Bordeaux-rot mit einem Stich ins Violett. Methoxyl-Bestimmungen an dieser Verbindung ergaben sich :

Sbst. (wasserfrei) 4.714 mg : AgJ 5.109 mg.

„ „ 3.35 „ : „ 2.90 „ .

$C_{15}H_{19}O_5Cl(OCH_3)_2$. Ber. CH_3O 16.92.

Gef. „ 14.32, 11.4¹⁾.

1) An den natürlichen, methoxylierten Anthocyanen werden die Methoxylwerte bisweilen als zu niedrig gefunden, was man wohl darauf zurückzuführen ist, dass das betreffende Anthocyan hierbei mit dem methoxylfreien verunreinigt ist.

Also stellen wir fest, dass zwei Komponenten des zuckerfreien Farbstoffs Delphinidin und Malvidin sind, und die beiden als Galactosid in der Fruchthaut von japanischen Rauschbeeren vorhanden sind.

An dieser Stelle möchten wir Herrn Direktor, Prof. Yasuhiko Asahina für seine stetige Anregung und Belehrung einen wärmsten Dank aussprechen. Herrn Kollege, Dr. H. Itô danken wir für Sammlung des Versuchsmaterials.

Wir sind auch dankbar dem Unterrichtsministerium für finanzielle Unterstützung und Herrn D. Ôhata im Iatro-chemischen Institut für Durchführung der Elementaranalysen.