

ÜBER DIE CAROTINOIDE VON CUCURBITA.

I. DIE PIGMENTE DER FRUCHT VON CUCURBITA
MAXIMA, DUCH.

Von Harusada SUGINOME und Kiyoshi UENO.

Eingegangen am 11 Juni, 1931. Ausgegeben am 28 August, 1931.

Im Jahr 1885 hat Arnaud⁽¹⁾ einen kristallisierten Chlorophyllbegleiter untersucht und gefunden, dass dieser wahrscheinlich mit dem Farbstoff der Möhre (*Daucus carota*) und *Cucurbita pepo*, dem Carotin, identisch ist. Darüber gibt es aber keine ausführliche Beschreibung. Bisher untersuchten weder Chemiker noch Botaniker das Pigment im Fleisch von *Cucurbita*, als erster hat Ansai⁽²⁾ Carotinosis, eine gelbe* Färbung der Haut, die durch das Essen von *Cucurbita* verursacht wird, darauf zurückgeführt, dass der gelbe Farbstoff durch die Schweiß-drüse ausgeschieden wird. Als Ausgangsmaterial hatte Genannter einen Extrakt benutzt, der durch Behandlung der Frucht von *Cucurbita maxima* mit Petroläther erhalten wurde. Die Isolierung der Farbstoffe im kristallisierten Zustande gelang bisher noch nicht.

Im folgenden sei über die Isolierung und über die Eigenschaften der Pigmente berichtet:

Die zerhackte Frucht wurde mit Aceton extrahiert und der mit diesem Extrakte ausgeführte Entmischungs-Versuch nach Sorby-Kraus-Willstätter ergab, dass die Frucht von *Cucurbita maxima* wenigstens ein sauerstofffreies und daneben ein sauerstoffhaltiges Pigment enthält. Da sie mit keinem der bekannten, wohldefinierten Carotinoiden des Pflanzenreichs übereinstimmen, geben wir ihnen die Namen Cucurbiten und Cucurbitaxanthin.

Neuerdings haben Kuhn, Winterstein und Kaufmann,⁽³⁾ Zechmeister und Cholnoky,⁽⁴⁾ zu gleicher Zeit und unabhängig, ein verestertes Carotinoid, Physalien, aus der Judenkirsche und der Bocksdrübeere gefunden.

Aus *Cucurbita maxima* wurde noch kein verestertes Carotinoid isoliert aber durch Behandlung der Mutterlauge des Cucurbitens mit methylalkoholischem Kali Palmitinsäure gewonnen. Es ist allerdings fraglich, ob die Palmitinsäure aus einem Farbstoff oder aus einem Begleitstoff der Carotinoide, wie Phytosterin, kommt.

(1) *Compt. rend.*, **100** (1885), 751.

(2) *Japanese Journal of Medical Sciences. V. Pathology*, **1** (1928), 175.

* In Hokkaido sieht man oft Carotinosis der Bauern, welche dort in Herbst *Cucurbita maxima* zu essen pflegen.

(3) *Ber.*, **63** (1930), 1489.

(4) *Ann.*, **481** (1930), 42.

Cucurbiten kristallisiert aus Petroläther in dunkelbraun gefärbten rhombischen glänzenden Täfelchen mit starkem Pleochroismus. In der Durchsicht sind die Kristalle dunkelrot. Der Schmelzpunkt liegt bei 179–180° (unkorr.). 10 Kg. frische Frucht lieferten 0,18 g. reines Cucurbiten. Die Ausbeute an dem Farbstoff ist abhängig von der Reife der Frucht. Die Elementaranalyse ergibt als Bruttoformel des Cucurbitens $C_{40}H_{56}$. In Benzin ist es löslich, in Alkohol aber sehr wenig. In konzentrierte Schwefelsäure löst sich das Cucurbiten wie Carotin mit tiefindigoblauer Farbe. Auch die anderen Farbenreaktionen, mit Ausnahme jener mit Ameisensäure, erinnern an Carotin. Für den direkten Vergleich diente Carotin, welches aus *Daucus carota* gewonnen worden war.

Herr Prof. G. Nakamura hatte die Güte, die Absorptionskurven des von uns erhaltenen Cucurbitens und Carotins zu vergleichen im Versuchsteil sind diese wiedergegeben. Beide Absorptionskurven stehen zwar sehr nahe, aber jene des Carotins ist etwas nach rot verschoben.

Neuestens haben Karrer⁽¹⁾ und seine Mitarbeiter die Einheitlichkeit des Carotins bezweifelt, nachdem es ihnen gelungen ist, den Schmelzpunkt durch häufiges Umkristallisieren aus Petroläther auf 181–182° zu steigern. Die genannten Verfasser nahmen an, dass Carotin nach Willstätter und seinen Mitarbeitern⁽²⁾ ein Gemisch aus α - und β -Carotin ist. Nach ihrer Beschreibung scheint β -Carotin noch nicht ganz rein dargestellt worden zu sein und sie vermuteten, dass β -Carotin in reinem Zustand optisch inaktiv sei. Doch steht Cucurbiten, so weit es den Schmelzpunkt betrifft, sehr nahe dem β -Carotin.

Der zweite Nebenfarbstoff in der Frucht von *Cucurbita maxima*, für den wir den Nahmen Cucurbitaxanthin vorschlagen, wurde mit einem Mengenverhältnis 1,6:1,0 (zugunsten des Cucurbitens) isoliert. Dieser Farbstoff ist unlöslich in Petroläther, wohl aber löslich in Methyl- und Aethylalkohol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform. Aus Methanol kristallisiert es in ziegelroten körnigen Kristallen mit Metallglanz. Die Kristalle sind in der Durchsicht dunkelgelb. Der Schmelzpunkt liegt bei 180° (unkorr.) Cucurbitaxanthin besitzt die Zusammensetzung $C_{40}H_{56}O_2$ und gehört somit in die Gruppe der Xanthophylle. Es ist optisch aktiv, und zwar rechtsdrehend: $[\alpha]_C^{20} = +105^\circ$ (in Chloroform).

Bezüglich der Konstitution des Cucurbitens und Cucurbitaxanthins sind Untersuchungen im Gange.

-
- (1) P. Karrer, *Z. angew. Chem.*, **42** (1929), 923; H. v. Euler, P. Karrer und M. Rydbom, *Ber.*, **62** (1929), 2447; P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli, Ber., Pieper und R. Marf, *Helv.*, **14** (1931), 614.
 - (2) R. Willstätter und W. Mieg, *Ann.*, **335** (1907), 1; H. H. Escher, Dissertation Zurich. Polytechnikum (1909); R. Willstätter und H. H. Escher, *Z. Physiol. Chem.*, **64** (1910), 47.

Experimenteller Teil.

Isolierung der Farbstoffe. Als Ausgangsmaterial standen 130 Früchte von *Cucurbita maxima* zur Verfügung, die im letzten Herbst in der hiesigen Universitätsfarm gesammelt worden waren. Den Herrn G. Misonoo und K. Shirahama sind wir für ihre freundlichen Bemühungen zu grossem Dank verpflichtet.

12.5 Kg. Fruchtfleisch, frei von Chlorophyll, wurden durch die Hackmaschine getrieben und 24 Stunden lang unter 10 l. Aceton stehen gelassen, und dann abgesaugt. Die Extraktion wurde noch viermal wiederholt. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff bei verminderter Druck und bei 30–40° ~~derart~~ abdestilliert, dass von ihm nur sehr wenig zurückblieb, um so die nächste Operation zu erleichtern. Der etwas acetonhaltige rotbraune Rückstand wurde in Petroläther (Sdp. bis 60°) aufgenommen. Nach dem Trocken über Natriumsulfat wurde unter Stickstoff bei verminderter Druck der Petroläther abdestilliert. Der rotbraune zähe Rückstand wog 21.5 g. Dieser Rückstand wurde wieder mit 800 ccm. Petroläther behandelt, wodurch unlösliche rotbraune körnige Kristalle von Cucurbitaxanthin abgetrennt wurden. Die Ausbeute an diesem betrug 0.14 g. Die tief gefärbte Petrolätherlösung wurde mit 80% igem Methanol entmischt, dann über Natriumsulfat getrocknet. Durch Abdestillation unter Stickstoff im Vakuum gewinnt man einen rotbraunen Kristallbrei, der 20.0 g. wog. Bei der Aufbewahrung in der Kälte (-15°) vermehrten sich die metallglänzenden Kristalle, welche mit Hilfe von wenig Petroläther rasch abgesaugt wurden. Um den farblosen Begleiter zu lösen, wurde mit kaltem Lösungsmittel gewaschen. Die Ausbeute betrug 0.23 g. Dieses rohe Cucurbiten wurde mit Petroläther umgelöst. Schmp. 178.5–179.5°. Nach noch zweimaliger Umkristallisation zeigte die Substanz einen konstanten Schmelzpunkt: 179–180°. Da der Schmelzpunkt etwas abhängig von der Art des Erhitzen ist, führten wir das Schmelzpunkttröhrchen in das bis 165° vorwärmte Bad ein.

Cucurbiten, in solcher Weise gewonnen, ist löslich in Petroläther, Aceton, Chloroform und Schwefelkohlenstoff, schwer löslich in Alkohol. Die petrolätherische Lösung ist weinrot, wenn sie konzentriert ist, aber in der Verdünnung orangegegelb.

Anal: Subst.=4,154, 4,200, 4,342; CO₂=13.615, 13,772, 14,199; H₂O=3,954, 4,045, 4,138 mg. Gef.: C=89.39, 89.43, 89.19; H=10.65, 10.78, 10.66%. Ber. für C₄₀H₅₆: C=89.48; H=10.52%.

Die Analyse wurde von Herrn K. Saito ausgeführt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Darstellung des Carotins. Nach Kohl⁽¹⁾ und Euler und Nordensen⁽²⁾ wurden 50 kg. Möhren in dünnen Scheiben zerschnitten und drei Stunden lang in Wasser gekocht und gut abgepresst; der Presskuchen wurde mit Sand verrieben und in dünner Schicht auf Blechen bei 50° getrocknet. Das trockene Material wurde mit Petroläther (Sdp. bis 50°) perkoliert und eingedampft. Es blieb ein rotbrauner Kristallbrei zurück. Nach der Aufbewahrung in der Kälte wurde dieser abgesaugt. Zur Reinigung wurden die Kristalle in Petroläther unter Rückflusskühlung gelöst, hierbei blieben wenige schwerlösliche rotbraune Kristalle, die bei ca. 178-180° schmolzen. Beim Erkalten der Lösung scheidet sich wohl Carotin als auch ein farbloser Begleiter aus.

Um den Begleiter zu trennen, saugt man nur die rotbraunen leichten Täfelchen, die in der Lösung suspendiert sind, ab, während, farblose rhombische dipyramidale schwere Kristalle am Boden bleiben, welche bei 117-118° schmelzen. Carotin in solcher Weise dargestellt, zeigt einen Schmp. 167-168° (unkorr.), bei 165° tritt aber leichte Sinterung ein. Ausbeute 0.9 g.

Nach noch dreimaligem Umkristallisieren aus demselben Lösungsmittel schmilzt das Carotin bei 170-171° (unkorr.). Bestimmt man mit einem abgekürzten Normalthermometer in einem bis 165° vorerwärmten Bad, so liegt der Schmelzpunkt bei 173-174° wie schon Escher⁽³⁾ feststellte. Zur Sicherheit kristallisierten wir das oben erwähnte Präparat nochmals aus Schwefelkohlenstoff-Alkohol um, das Carotin zeigte aber denselben Schmelzpunkt.

Die Analyse (K. Saito) des Farbstoffes ergab:

Subst.=4.247, 4.409, 4.370; CO₂=13.904, 14.496, 14.308; H₂O=4.144, 4.246, 4.236 mg. Gef.: C=89.48, 89.67, 89.30; H=10.92, 10.77, 10.85%. Ber. für C₄₀H₅₆: C=89.48; H=10.52%.

Aus dem Filtrat wurde ein farbloser Begleiter, in Nadeln kristallisiert, isoliert, dessen Schmelzpunkt bei 118-119° liegt.

Vergleich des Cucurbitens mit Carotin. Cucurbiten kristallisiert in rhombischen Täfelchen, während Carotin unter denselben Bedingungen in Rhomboedern kristallisiert. In der Durchsicht ist Cucurbiten dunkelrot, Carotin orangerot. Der Schmelzpunkt des Cucurbitens ist um ca. 10° höher als derselbe des Carotins. Die Analysenresultate der beiden Farbstoffe liegen innerhalb der Fehlergrenze. Gegen Luftsauerstoff ist Cucurbiten viel beständiger als Carotin.

(1) Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in den Pflanzen.

(2) *Z. Physiol. Chem.*, **56** (1908), 223.

(3) *Z. Physiol. Chem.*, **83**, (1913) 206.

Farben-Reaktionen.⁽¹⁾ Alle Versuche mit Cucurbiten und Carotin sind unter genau denselben Bedingungen ausgeführt worden.

Eisenchlorid in Palmöl⁽²⁾ (je 1 mg. Substanz in 1 g. Palmöl mit einigen Körnchen Eisenchlorid).

Cucurbiten: bläulichgrün.

Carotin: bläulichgrün (etwas rascher).

Konz. Schwefelsäure (je 1 mg. Substanz in 2 ccm.).

Cucurbiten: blau, nach 24 Std., braunschwarz.

Carotin: blau, nach 24 Std., braunschwarz.

Ameisensäure (je 1 mg. Substanz mit 2 ccm. Kahlbaumscher Ameisensäure).

Cucurbiten: In der Kälte keine Reaktion, nach ca. 5 Minuten langem Kochen und kurzem Stehen: grüne Lösung → dunkelblau. (sehr beständig).

Carotin: In der Kälte keine Reaktion, nach ca. 5 Minuten langem und kurzem Stehen: rotbraune Lösung.

Dichloressigsäure (je 1 mg. Substanz in 0.5 ccm. Säure).

Cucurbiten: dunkelblau → blauschwarz.

Carotin: braun → braunschwarz → blauschwarz (rascher).

Konz. Schwefelsäure + Chloroform (je 0.5 ccm. gesättigte Chloroformlösung + 0.3 ccm. konz. Schwefelsäure).

Cucurbiten: Schwefelsäure indigoblau, Chloroform dunkelbraun.

Carotin: Schwefelsäure indigoblau, Chloroform braunschwarz.

Essigsäureanhydrid (je 0.5 ccm. gesättigte Chloroformlösung + 2 Tropfen Essigsäure-anhydrid + 5 Tropfen konz. Schwefelsäure).

Cucurbiten: Schwefelsäure kobaltblau → blau → fast farblos.

Chloroform → grünblau.

Carotin: Schwefelsäure blauschwarz → indigoblau.

Rauchende Salpetersäure + Chloroform (je 1 ccm. gesättigte Chloroformlösung + 1 Tropfen Salpetersäure $d = 1.52$).

Cucurbiten: blau → blaugrün → gelblichbraun.

Carotin: blau → blaugrün → gelblichbraun.

Trichloressigsäure + Chloroform (je 1 mg. Substanz + 0.3 g. Säure + 0.5 ccm. Chloroform).

Cucurbiten: blau → braunschwarz → blauschwarz.

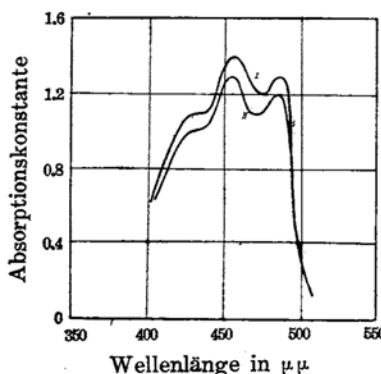
Carotin: blau → braunschwarz → blauschwarz.

Absorptionskurve I: Carotin in Alkohol (1:20000)

Absorptionskurve II: Cucurbiten in Alkohol (1:20000)

(1) Vgl.: R. Kuhn, A. Winterstein und W. Wiegand, *Helv.*, **11** (1928), 723.

(2) L. S. Palmer and W. E. Thrun: *J. Ind. Eng. Chem.*, **8** (1916), 614.



Optische Schwerpunkte des Cucurbitens :

$$487\mu\mu, 452\mu\mu, \text{ und } 428\mu\mu.$$

Im Absorptionsspektrum der Alkohollösung finden wir Cucurbiten und Carotin sehr nahestehend. Für die Untersuchung wurden Hilgersche Sektor-Photometer und Spektrograph mit 90° Ablenkung benutzt. Als Lichtquelle hat uns die Nitralampé gedient.

Herrn Prof. Nakamura möchten wir für sein freundliches Entgegenkommen auch an dieser Stelle herzlich danken.

Cucurbitaxanthin. Das aus dem Extrakt durch Petroläther getrennte Pigment (0.14 g.), Cucurbitaxanthin, wurde mit 80% igem Methanol entmischt und aus Methanol umkristallisiert. Diese Cucurbitaxanthin kristallisiert in körnigen ziegelroten Kristallen mit Metallglanz. In der Durchsicht sind sie braungelb. Der Schmelzpunkt liegt bei 180° . Das Pigment ist löslich in Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Methyl- und Aethylalkohol aber fast unlöslich in Petroläther ; optisch ist es aktiv :

$$[\alpha]_c^{20^\circ} = \frac{+0.32^\circ \times 100}{0.602 \times 0.5} = +105.1^\circ$$

Nach der Umkristallisation aus Chloroform-Petroläther wurde es analysiert. (K. Saito).

Subst.=3.859; $\text{CO}_2=11.926$; $\text{H}_2\text{O}=3.473$ mg. Gef.: C=84.29; H=10.07%. Ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$: C=84.44; H=9.93%.

Cucurbitaxanthin färbt sich mit Ameisensäure sofort grün. Beim Versetzen der Chloroformlösung mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zeigt es eine blaue, dann blauschwarze Färbung.

In der folgenden Tabelle werden Cucurbitaxanthin mit dem rechts-drehenden Xanthophyll, Lutein⁽¹⁾ verglichen.

Name	Formel	Schmelzpunkt (korr.)	Drehungsvermögen in Chloroform	Kristallform aus Methanol
Cucurbitaxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	183°	+105° (C)	Körnig
Lutein	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	193°	+160° (Cd.)	Prismen

Behandlung der Mutterlauge des Cucurbitens mit methylalkoholischem Kali. Da aus der Mutterlauge des Cucurbitens kein Farbstoff in kristallisiertem Zustand isoliert worden war, wurde Hydrolyse ausgeführt.

Nach Zechmeister und Cholenoky⁽²⁾ wurde die tiefe orangefarbene Mutterlauge mit Petroläther auf 300 ccm. verdünnt und mit 100 ccm. 30% igem methylalkoholischem Kali unterschichtet und bei 25° stehen gelassen. Nach einigen Stunden ging der grösste Teil des Farbstoffes in die untere Schicht über und gleichzeitig erschien eine weisse wachsartige Substanz an den Glaswandungen und an der Berührungsfläche der beiden Schichten. Nach 24 Stunden wurde die wachsartige Substanz filtriert, mit Petroläther gewaschen und dann in Wasser gelöst. Nun wurde mit Salzsäure angesäuert, mit Aether (Tierkohle) extrahiert und der mit Natriumsulfat getrocknete Extrakt eingedampft. Es hinterblieben ca. 2 g. braune Kristalle, Schmp. 58–61°. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus 70% igem Alkohol, unter verminderter Druck abdestilliert und dann noch einmal aus demselben Lösungsmittel umkristallisiert, erhielten wir schneeweisse glänzende Kristalle, die bei 62–63° schmolzen. Mit gereinigter Kahlbaumscher Palmitinsäure entstand keine Depression.

Subst.=4.007; CO₂=11.003; H₂O=4.599 mg. Gef.: C=75.10; H=12.84%. Ber. für C₁₆H₃₂O₂: C=74.93; H=12.59%. (K. Saito).

Die alkalische methylalkoholische Lösung wurde mit Aether überschichtet. Mit Schwefelsäure angesäuert, scheidet sich Natriumsulfat aus und der Farbstoff geht in die obere Schicht über. Die Aetherauszüge wurden gewaschen, getrocknet und eingeengt. Bei der Aufbewahrung in der Kälte kristallisierte kein Farbstoff, sondern eine farblose Substanz aus. Diese wurde mit Methylalkohol abgesaugt. Durch Umkristallisation aus Aceton wurden farblose Kristalle, die bei 152° unscharf schmolzen, gewonnen. Diese Kristalle zeigten sich unter dem Mikroskop als ein Gemisch aus Täfelchen und Nadeln.

(1) R. Kuhn, A. Winterstein und E. Lederer, *Z. Physiol. Chem.*, **197** (1931), 141.

(2) *Ann.*, **481** (1930), 53.

Die petrolätherische Lösung wurde mit 80% igem Methanol entmischt, gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es wurden aber keine Kristalle von Cucurbitaxanthin gewonnen.

Nach erfolgter Hydrolyse wurde alle gefärbte Substanz in Aether aufgenommen und mit 20% igem methylalkoholischem Kali noch einmal, wie oben erwähnt, behandelt. Durch diese Behandlung wurde etwas mehr Palmitinsäure und farblose Substanz gewonnen, aber kein kristallisierter Farbstoff.

Der grösste Teil der Kosten dieser Untersuchungen wurde durch Gelder aus der Kaiserlichen Akademie gedeckt. Für diese Beihilfe möchten wir auch an dieser Stelle unseren ergebensten Dank aussprechen.

Das Chemische Institut der Kaiserlichen Universität
Hokkaido, Sapporo.
