

ALFRED WINTERSTEIN^{*)}, ANDRÉ STUDER und RUDOLF RÜEGG

Neuere Ergebnisse der Carotinoidforschung

Aus der Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(Eingegangen am 18. Juli 1960)

Herrn Professor Dr. R. Kuhn zum 60. Geburtstag gewidmet

Eine ganze Reihe von Carotinoid-Aldehyden mit 20–40 C-Atomen wurden in Naturprodukten aufgefunden, dazu Mono- und Bisdehydrolycopin.

R. KUHN und Mitarbeiter¹⁾ haben sich schon in der Frühzeit der exakten Carotinoidforschung mit dem oxydativen Abbau von β -Carotin und Lycopin befaßt und sind dabei zu Abbauprodukten, wie z. B. dem Apo-6'-lycopinal (C₃₂)²⁾ gelangt, die sowohl für Probleme der Konstitutionsaufklärung als auch für gewisse Betrachtungen über die Biogenese der Carotinoide von Interesse waren.

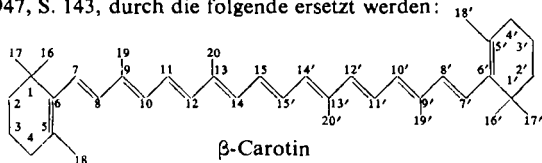
Der eine von uns machte damals im Zusammenhang mit Erörterungen über das Vorkommen von Carotinoiden³⁾ die Bemerkung: „es ist wohl möglich, daß Carotinoide, wie sie R. KUHN und Mitarbeiter beim oxydativen Abbau des Carotins erhalten haben, auch in der Natur vorkommen“. Es sollte damit zum Ausdruck gebracht werden, daß neben Azafrin (C₂₇), Bixin (C₂₅) und Crocetin (C₂₀), die nach R. KUHN⁴⁾ durch oxydative Spaltung von Carotinoiden mit 40 C-Atomen entstehen, noch weitere derartige Abbauprodukte in der Natur vorkommen könnten. In diesem Sinne äußerten sich dann auch L. ZECHMEISTER und P. TUZSON⁵⁾ sowie H. WILLSTÄDT und T. LINDQUIST⁶⁾.

25 Jahre später sollten sich diese Vermutungen in weitestem Ausmaße bestätigen: *die moderne Carotinoidforschung führt zur Erkenntnis, daß die Natur nach vollendeter Synthese des C₄₀-Skelettes letzteres in einer Art Spielerei in eine bis jetzt noch nicht ganz zu übersehende Zahl von Derivaten und Abbauprodukten umwandelt.*

^{*)} Herr Dr. A. WINTERSTEIN ist am 16. September 1960 nach kurzer schwerer Krankheit gestorben.

¹⁾ R. KUHN und H. BROCKMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 894 [1932], **66**, 1319 [1933], **67**, 885 [1934]; R. KUHN und CH. GRUNDMANN, ebenda **65**, 900 [1932].

²⁾ Betr. Nomenklatur siehe R. RÜEGG, H. LINDLAR, M. MONTAVON, G. SAUCY, S. F. SCHÄEREN, U. SCHWIETER und O. ISLER, Helv. chim. Acta **42**, 847 [1959]; die dort angegebene Numerierung des Carotingerüsts muß gemäß IUPAC Comptes rendus de la 14ième conférence, Londres 1947, S. 143, durch die folgende ersetzt werden:



³⁾ A. WINTERSTEIN, Angew. Chem. **47**, 315 [1934].

⁴⁾ J. Soc. chem. Ind. **52**, 981 [1933].

⁵⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 1878 [1936].

⁶⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **240**, 10 [1936].

Für das Auffinden von etwa einem Dutzend bisher unbekannter Carotinoide in der Natur waren folgende Momente von entscheidender Bedeutung: zunächst die Beibehaltung der klassischen Methodik der Carotinoidforschung, wie sie durch die Schulen von KUHN, KARRER und ZECHMEISTER gegeben worden sind — wobei z. B. die Verwendung des Spektroskopes aus verschiedenen Gründen nach wie vor einen wichtigen Platz einnimmt —, darüber hinaus der Einsatz der heute leicht zugänglichen synthetischen Vergleichssubstanzen⁷⁾ sowie der ebenfalls unentbehrlichen Dünnschichtchromatographie nach E. STAHL⁸⁾.

Es läßt sich heute, wie wir an anderen Orten im einzelnen zeigen⁹⁾, unschwer eine Art Systematik der Carotinoide erstellen, wobei sich die bis jetzt bekanntgewordenen 75 Pigmente dieser Klasse von α -, β - bzw. von γ -Carotin sowie von Lycopin ableiten lassen.

Als Beispiel für die großen Fortschritte, die in den letzten Jahren in der Erforschung der natürlichen Carotinoide erzielt worden sind, sei die Gruppe der Carotinoid-Kohlenwasserstoffe angeführt.

Natürliche Carotinoid-Kohlenwasserstoffe

Name	Entdeckt	I. Absorpt.-Bande in CS ₂	Zahl der konjug. Doppelbindungen		
			aliph.		Ring
α -Carotin	1931	510 m μ	9	+	1
β -Carotin	1831	520 m μ	9	+	2
γ -Carotin	1933	533 m μ	10	+	1
Lycopin	1873	548 m μ	11		
Torulin	1933/1959	563 m μ	12	+	1
Monodehydrolycopin	1959	574 m μ	13		
Bisdehydrolycopin	1959	601 m μ	15		
Isorenarieten	1957	520 m μ	9	+	6
Renarieten	1957	532 m μ	10	+	3?

Die Mannigfaltigkeit der Carotinoid-Kohlenwasserstoffe ist wesentlich größer, als man bis vor kurzem angenommen hatte. Die Gruppe der drei Carotine und des Lycopins ist zunächst zu erweitern durch das von japanischen Forschern¹⁰⁾ aus *Reniera japonica*, einem gelben Schwamm, isolierte Reniareten und das Isorenarieten.

Der von M. C. KHOSLA und P. KARRER¹¹⁾ für das Isorenarieten erbrachte Konstitutionsbeweis zeigt, daß in diesem Kohlenwasserstoff die beiden hydroaromatischen Ringe des β -Carotins vollständig aromatisiert sind und daß somit in der Natur auch Verbindungen vorkommen, deren chromophores System identisch ist mit demjenigen der synthetisch gewonnenen Diphenyl-polyene¹²⁾.

Torulin, das bis jetzt als Dimethoxyderivat eines Carotinoids angesprochen worden war, leitet sich biogenetisch offenbar vom γ -Carotin ab, aus dem es durch Elimination

⁷⁾ O. ISLER und M. MONTAVON, *Chimia* [Zürich] **12**, 1 [1958].

⁸⁾ *Chemiker-Ztg.* **82**, 323 [1958].

⁹⁾ A. WINTERSTEIN, *Angew. Chem.* **72**, [1960] (Festheft zum 60. Geburtstag von R. KUHN).

¹⁰⁾ M. YAMAGUCHI, *Bull. chem. Soc. Japan* **31**, 51, 739 [1958].

¹¹⁾ *Helv. chim. Acta* **43**, 453 [1960].

¹²⁾ R. KUHN und A. WINTERSTEIN, *Helv. chim. Acta* **11**, 87 [1928].

von 2 H-Atomen entstehen kann. Das von uns aus einem Mikroorganismus¹³⁾ kristallisiert erhaltene Torulin stimmt in seinen Eigenschaften mit einem synthetisch gewonnenen Präparat überein¹⁴⁾.

Monodehydrolycopin fanden wir in einem Mikroorganismus, Bisdehydrolycopin in spanischen Orangen. Die Identifizierung der beiden Carotinoide erfolgte durch Vergleich mit den synthetisch gewonnenen Verbindungen. Durch den Nachweis dieser beiden Kohlenwasserstoffe in der Natur erfahren unsere Vorstellungen über die Biogenese der Carotin-Kohlenwasserstoffe¹⁵⁾, wobei Dehydrierungsreaktionen offenbar von entscheidender Bedeutung sind, eine wertvolle Ergänzung. Die Annahme, daß sich das C₄₀-Kohlenstoffgerüst der Carotinoide durch Dimerisierung von zwei Geranylgeranylpyrophosphat-(C₂₀)-Einheiten zu einem ungefärbten, aliphatischen Tetraterpen, dem Lycopersen (C₄₀) bildet, ist sehr naheliegend. Ausgehend vom Lycopersen (C₄₀), das 8 nicht-konjugierte Doppelbindungen enthält, gelangen wir durch stufenweise Dehydrierung über das Lycopin (V) mit 11 konjugierten und 2 nicht-konjugierten Doppelbindungen sowie über das Monodehydrolycopin (VI) zum Bisdehydrolycopin (VII), das mit seinen 15 konjugierten Doppelbindungen das ungesättigteste aller natürlichen Carotinoide darstellt¹⁶⁾.

Die Annahme solcher Dehydrierungsreaktionen erlaubt es nun, das Vorkommen einer ganzen Reihe von Carotinoiden in der Natur zwanglos zu erklären.

Wie aus den Formeln S. 2954 hervorgeht, läßt sich der Dehydrierung des γ -Carotins (I), die zum Torulin (II) führt, diejenige des Rubixanthins (III), das in Celaxanthin¹⁷⁾ (IV) übergehen kann, an die Seite stellen.

Oxydation einer endständigen Methylgruppe am aliphatischen Teil des Torulins führt zu dem von uns in Mikroorganismen nachgewiesenen 3',4'-Dehydro-17'-oxo- γ -carotin (C₄₀; VIII), welches offenbar die Vorstufe für das Torularhodin (X) darstellt. Mit dem Nachweis des C₄₀-Aldehydes wird die Biogenese des Torularhodins verständlich. Letzteres besteht, wie wir unlängst zeigen konnten¹⁸⁾, aus einem Skelett von 40 und nicht aus einem solchen von 37 C-Atomen, wie bisher angenommen wurde, und bildet sich offenbar durch Oxydation der Carbonylgruppe aus dem C₄₀-Aldehyd.

Ein aus 37 C-Atomen aufgebautes Carotinoid, das β -Apo-2'-carotinal (IX), fanden wir in Citrusfrüchten, es läßt sich zwanglos vom Torulin durch Oxydation der endständigen aliphatischen Doppelbindung ableiten.

¹³⁾ Für die Untersuchung der von Mikroorganismen produzierten Carotinoide standen uns chromatographisch vorgereinigte Konzentrate zur Verfügung, die wir Herrn Dr. TABENKIN, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, USA, verdanken. Ausführliche Beschreibung erfolgt an anderen Orten.

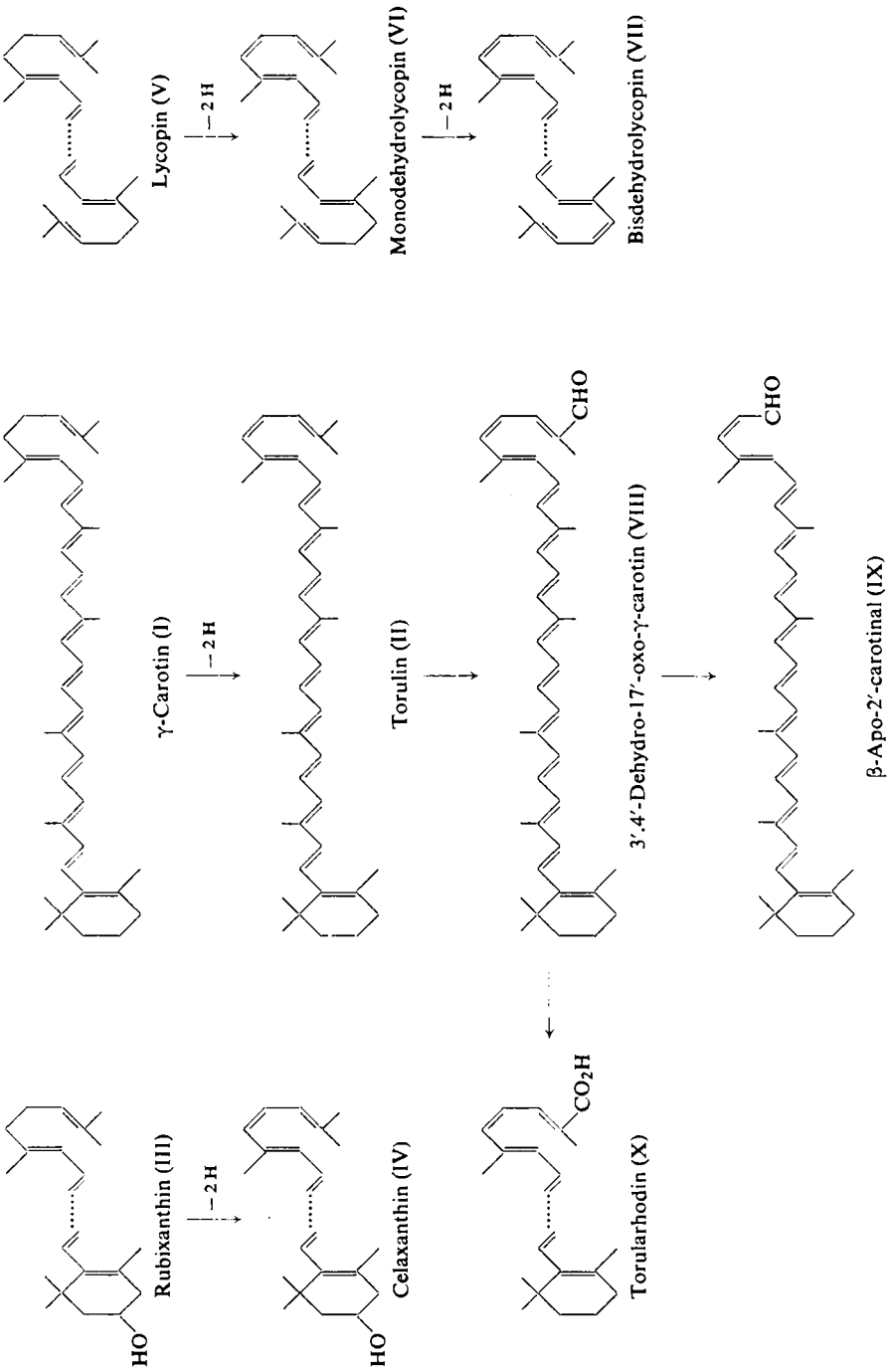
¹⁴⁾ Synthese nach R. RÜEGG und Mitarbb. (noch nicht publiziert).

¹⁵⁾ Siehe hierzu E. C. GROB, Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, 1959, 267; A. WINTERSTEIN⁹⁾.

¹⁶⁾ Synthetisch wurde in unseren Laboratorien (O. ISLER und Mitarbb., Verhandlg. Schweiz. Naturf. Ges. Basel, 1956, 101) Decapreno- β -carotin (C₅₀) mit 15 konjugierten Doppelbindungen, neuerdings auch das entsprechende Lycopinanaloge mit insgesamt 17 Doppelbindungen dargestellt.

¹⁷⁾ Die Konstitutionsformel für Celaxanthin ist noch nicht streng bewiesen. Die von A. L. LE ROSEN und L. ZECHMEISTER, Arch. Biochemistry 1, 17 [1943], vorgeschlagene Formel erhält durch diese biogenetische Betrachtung eine weitere Stütze.

¹⁸⁾ O. ISLER, W. GUÉX, R. RÜEGG, G. RYSER, G. SAUCY, U. SCHWIETER, M. WALTER und A. WINTERSTEIN, Helv. chim. Acta 42, 864 [1959].



Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß die Reihe der natürlichen Carotinoide mit noch intaktem C₄₀-Skelett durch 2 Epoxyde zu erweitern ist, nämlich durch das Lycopanthin- und das Lycopinmonoepoxyd. Diese Epoxyde glauben wir in Tomaten nachgewiesen zu haben, sie würden sich an die Seite der Epoxyde des Carotins bzw. der Xanthophylle stellen lassen.

Größer noch als die Zahl der neu aufgefundenen Carotinoide mit noch intaktem C₄₀-Skelett ist diejenige der oxydativ gebildeten Abbauprodukte. Abgesehen von einer Carotinoidcarbonsäure, welche wir in Citrusarten nachweisen konnten und die möglicherweise die dem β -Citaurin (C₃₀) entsprechende Säure mit 30 C-Atomen darstellt, konnten die in Tab. 1 aufgeführten Carbonylverbindungen als Naturprodukte nachgewiesen werden. *Einschließlich des β -Citaurins umfaßt die Gruppe der natürlichen Carotinoid-Aldehyde insgesamt nunmehr 10 Vertreter.*

Tab. 1. Natürliche Carotinoid-Aldehyde

Name	Zahl der C-Atome	I. Absorpt.-Bande in CS ₂ (m μ)	Vorkommen
3',4'-Dehydro-17'-oxo- γ -carotin	40	594	Mikroorganismen
β -Apo-2'-carotinal	37	579	Citrusfrüchte
Apo-6'-lycopinal	32	569	Tomaten
Apo-8'-lycopinal	30	546	Tomaten
Carbonylverbindung unbek. Konstitution	?	541	Citrusfrüchte, Spinat, Grünkohl
β -Apo-8'-carotinal	30	526	Citrusfrüchte, grüne Gemüse, Gras, Hagebutte, Leber, Darmmucosa
β -Apo-10'-carotinal	27	505	wie β -Apo-8'-carotinal
Azafrinaldehyd	27	489	Azafranwurzel
Retinen	20	—	wie β -Apo-8'-carotinal

Sehr förderlich für den Fortgang der Arbeiten war die Ausnützung der Carbonylfunktion zur Identifizierung der Aldehyde. Dabei erwies sich, wie wir an anderen Orten im einzelnen darlegen¹⁹⁾, die Verwendung von Rhodanin zum Nachweis des Retinens als besonders wertvoll. Das Vorhandensein von Spuren β -Apo-8'-carotinal in der Darmschleimhaut von Pferd und Rind konnte nur unter Verwendung dieses Reagenzes bewiesen werden.

Im übrigen erwies sich, wie folgendes Beispiel zeigt, die Umsetzung von Carotinoidkonzentraten mit Hydroxylamin für den Aldehydnachweis als sehr gut brauchbar: ein in üblicher Weise durch Säulenchromatographie gewonnenes Konzentrat aus Spinat, welches wir als „Aldehydfraktion“ bezeichnen, liefert im Dünnschichtchromatogramm 10 deutlich voneinander zu unterscheidende Flecken, von denen 4 nach der Behandlung mit Hydroxylamin verschwinden. Durch Zusatz der synthetischen Vergleichssubstanzen wie β -Apo-8'-, β -Apo-10'-carotinal und Retinen zur oximierten Fraktion gelingt der Nachweis der vorgenannten Aldehyde ohne wesentliche Schwierigkeiten. Auf diese Weise war es auch möglich, festzustellen, daß eine Carbonylverbindung, deren I. Absorptionsbande in CS₂ bei 541 m μ liegt (Pigment 541), nicht etwa ein Gemisch von 2 Aldehyden dargestellt, sondern eine Verbindung, für

¹⁹⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., Festheft zum 60. Geburtstag von R. KUHN, im Druck.

welche keine synthetische Vergleichssubstanz vorliegt und deren Konstitution noch unbekannt ist²⁰⁾. Bei der Überführung dieser Verbindung in das Oxim tritt eine Farbaufhellung um ca. 20 m μ (CS₂) ein; dieses Verhalten erlaubt die Annahme, daß ein Aldehyd vorliegt.

Während der Nachweis der Apocarotinale, deren kleinen Mengen wegen, in den verschiedenen Naturprodukten gelegentlich nicht unerhebliche Schwierigkeiten bereitet, ist der Nachweis der beiden Apolycopinale in Tomaten besonders einfach. Nach Abtrennung der Hauptmenge des Lycopins durch Kristallisation²¹⁾ liefern die Mutterlaugen in den obersten Schichten des Säulenchromatogrammes 5 gut ausgeprägte Zonen, von denen wir 2 orange gefärbte dem Lycopinepoxyd, bzw. dem Lycopanthinepoxyd zuschreiben möchten, während die 2 rotviolett gefärbten Apo-6'- und Apo-8'-lycopinal (C₃₂ bzw. C₃₀) enthalten.

Recht eingehend haben wir uns mit den Carotinoiden der Citrusfrüchte (*Citrus aurantium*, *Citrus madurensis*, von letzterer die tiefrotorange gefärbte Varietät, die als „Clementine“ bezeichnet wird) befaßt.

Da nach den Befunden von L. ZECHMEISTER und P. TUZSON²²⁾ in Citrusfrüchten offenbar ein Fermentsystem vorliegt, welches einen recht beträchtlichen Anteil gewisser Carotinoide mit 40 C-Atomen (Zeaxanthin, Rubixanthin, Kryptoxanthin etc.) zum 3-Hydroxy- β -apo-8'-carotinal (C₃₀; β -Citaurin) abzubauen vermag, war es naheliegend, auch nach der nichthydroxylierten Verbindung, d. h. dem β -Apo-8'-carotinal zu fahnden. Wie schon die beiden vorgenannten Autoren gezeigt haben, hängt der β -Citauringehalt der Citrusfrüchte stark von deren Varietät bzw. auch dem Reifezustand ab. Diesen Schwankungen folgt auch das β -Apo-8'-carotinal. Am meisten, nämlich 100–200 γ /kg fanden wir in Clementinen, sehr wenig in den hellorange gefärbten sizilianischen Orangen der Januarernte. Wir haben zunächst 1500 kg Orangen verschiedener Provenienz verarbeitet, wobei uns der Nachweis einiger Carotinoid-Aldehyde mittels der Oxime, des Adsorptionsverhaltens sowie der Absorptionsbanden gelang. Den strengen Beweis für das Vorkommen des β -Apo-8'-carotinals in der Natur lieferten wir durch Verwendung des ¹⁴C-markierten Semicarbazids sowie durch den röntgenographischen Vergleich der Semicarbazone von synthetisch gewonnenem β -Apo-8'-carotinal mit dem aus Citrusfrüchten isolierten²³⁾. Aus 400 kg bezüglich Farbe der Schalen ausgesuchter Orangen erhielten wir 12 mg reines ¹⁴C-markiertes Semicarbazon des β -Apo-8'-carotinals, das in allen Eigenschaften mit dem synthetischen Produkt identisch war.

Wie eingangs erwähnt, hat sich die Dünnschichtchromatographie nach E. STAHL für den Nachweis der Spurencarotinoide als unentbehrlich erwiesen.

In manchen Fällen gelang die Darstellung chromatographisch einheitlicher Carotinoidfraktionen nur durch Einsatz der Dünnschichtchromatographie in mikropräparativem Maßstabe. Unter anderem wurde auf diese Weise auch der oben be-

²⁰⁾ Mit β -Carotinon (R. KUHN und H. BROCKMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 894 [1932]), das ähnliche Absorptionsbanden aufweist, ist Pigment 541 nicht identisch.

²¹⁾ Das so gewonnene Rohlycopin enthält stets noch kleine Mengen Lycopinale.

²²⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 1966 [1937].

²³⁾ Herrn Dr. C. VON PLANTA und Herrn Dr. J. WÜRSCH danken wir für die Durchführung dieser Untersuchungen.

schriebene, durch eine bei 541 m μ (CS₂) liegende Absorptionsbande charakterisierte Aldehyd (das sog. Pigment 541) chromatographisch einheitlich erhalten.

Beim Arbeiten mit Carotinoid-Aldehyden ist deren eigentümliches Adsorptionsverhalten im Dünnschichtchromatogramm zu berücksichtigen: ihre Adsorptionsaffinitäten folgen auf der Kieselgelplatte nicht, wie bei anderen homologen Reihen von Polyenen der Zahl der Doppelbindungen, sie hängen vielmehr von anderen konstitutiven Eigenschaften (Enolisierung der Aldehydgruppe?) ab. Auf der Kieselgelplatte wird z. B. der Vitamin A₁-Aldehyd (C₂₀) stärker adsorbiert als das um 10 C-Atome bzw. 3 Doppelbindungen reichere β -Apo-8'-carotinal. Auf einer mit Paraffin imprägnierten Kieselgelplatte dagegen steigen die R_F -Werte der Carotinoid-Aldehyde — den theoretischen Erwartungen entsprechend — von 0.28 (für C₄₀-Aldehyd) allmählich auf 0.855 (für C₂₀-Aldehyd) an.

In den Wurzeln von *Escobedia scabrifolia* konnten wir neben Azafrin zwei weitere Carotinoide nachweisen, welche für die Deutung der Biogenese des Azafrins von Interesse sind. Außer β -Carotin, das offenbar die Muttersubstanz des Azafrins darstellt, konnten kleine Mengen β -Carotinepoxyd sowie ein Aldehyd nachgewiesen werden, der mit dem Azafrinaldehyd (C₂₇) identisch sein dürfte. In diesem Falle erwies sich die Verwendung von Rhodanin zum Aldehydnachweis als sehr nützlich.

Im Zusammenhang mit der Frage, auf welchem Wege β -Carotin im Organismus in Vitamin A umgewandelt wird, sind von verschiedenen Forschern²⁴⁾ entsprechende Versuche in vitro durchgeführt worden, wobei stets mehr oder weniger große Mengen Vitamin A₁-Aldehyd (C₂₀) erhalten wurden.

Es schien von Interesse, zu untersuchen, ob β -Carotin in vitro, ebenso wie in vivo nicht auch zu höheren Aldehyden abgebaut wird. Dies ist tatsächlich der Fall. Bei der Oxydation von β -Carotin mit MnO₂ unter Luftausschluß erhielten wir — bezogen auf eingesetzte Gewichtsmenge Carotin — etwa 10% Retinen, 2% β -Apo-10'-carotinal sowie etwas β -Apo-8'-carotinal und einen weiteren gefärbten noch nicht näher charakterisierten Aldehyd. Unter den gleichen Versuchsbedingungen lieferte Lycopin eine kleine Menge Apo-8'-lycopinal.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Vorbemerkungen

1. Bei sämtlichen Operationen wurden Temperaturen über 50° sowie Luftzutritt vermieden. Das Eindampfen kleinerer Mengen Lösungsmittel erfolgte in einem Laboratoriums-Rotationsverdampfer i. Vak. Das verwendete Al₂O₃, Marke Giuliani, wurde mit 10% H₂O inaktiviert. Petroläther, wo nicht anders vermerkt, Sdp. 80–105°. Der verwendete Äther war stets peroxydfrei.

2. *Dünnschichtchromatographie*: Für den Nachweis der Carotinoide und deren Derivate verwendeten wir stets 2 Sorten von Platten, die im Prinzip nach der Vorschrift von E. STAHL⁸⁾ hergestellt wurden. Die eine Sorte wurde unter Verwendung von 5 g Kieselgel G²⁵⁾ + 20 g Ca(OH)₂ bereitet. Als Laufmittel wurde in der Regel ein Gemisch von Petroläther/Benzol (1:1) verwendet, für besondere Fälle wurde der Benzolgehalt erhöht oder erniedrigt, gelegentlich erwies sich ein Zusatz von 1% Methanol zum Benzol/Petroläthergemisch als nützlich. Eine

²⁴⁾ Siehe hierzu T. MOORE, Vitamin A, Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1957.

²⁵⁾ E. Merck & Co., Darmstadt.

zweite Sorte von Platten gewannen wir durch Imprägnieren der Kieselgelschicht mit Paraffin (Kieselgel in üblicher Weise auftragen, trocknen, die Platte 2 Min. flach in eine Lösung von 5% Paraffinöl in Petroläther einlegen, in horizontaler Lage in Trockenschrank von 120° verbringen und 10 Min. dort belassen; Entwicklungsflüssigkeit: mit Paraffinöl getränktes Methanol).

Auf der mit Paraffinöl imprägnierten Kieselgelplatte (Entwicklungsflüssigkeit: mit Paraffin gesättigtes Methanol) wurden für die Carotinoid-Aldehyde folgende R_F -Werte ermittelt:

C ₄₀	C ₃₇	C ₃₅	C ₃₂	C ₃₀	C ₂₇	C ₂₅	C ₂₀
0.28	0.34	0.377	0.473	0.488	0.633	0.588	0.855

Auf der nicht-imprägnierten Platte lassen sich deutlich 2 Reihen unterscheiden: die C₄₀-, C₃₅-, C₃₀- und C₂₅-Aldehyde einerseits, die C₃₇-, C₃₂- und C₂₇-Aldehyde andererseits. Jede dieser isoprenologen Reihen liefert für sich betrachtet R_F -Werte, die den theoretischen Erwartungen entsprechen.

In manchen Fällen gelang die Abtrennung einheitlicher Carotinoidfraktionen nur auf mikropräparativem Wege. Zu diesem Zwecke wurden auf einer Platte üblicher Größe (20 × 20 cm) insgesamt 30 Substanzproben aufgetragen, von denen jede 0.1–0.3 γ Carotinoid enthielt. Nach dem Entwickeln ließen sich die einzelnen Zonen mit dem Seziermesser leicht isolieren. Die Extraktion der Carotinoide erfolgte unter Verwendung von Äther in kleinen Zentrifugengläschen und Zentrifugation. Bei Einsatz von 10–20 Platten erhielten wir meist ausreichend Substanz, um die Carotinoide identifizieren zu können.

3. Die Identifizierung der Spurencarotinoide erfolgte, wo nicht anders bemerkt, unter Verwendung reiner synthetischer Vergleichssubstanzen, wobei die Absorptionsbanden im Spektroskop nach LÖWE-SCHUMM vergleichend betrachtet wurden, ebenso wie das Adsorptionsverhalten auf den 2 verschiedenen Platten. Im Falle der Carotinoid-Aldehyde wurden auch die Oxime und Semicarbazone, sowie die Rhodaninverbindungen für den Vergleich herangezogen²⁶⁾. Die Oxime und Semicarbazone wurden durch 60 Min. langes Erhitzen (50°) der in Pyridin gelösten Aldehydfraction mit den entsprechenden Reagenzien gewonnen und nach sorgfältiger Entfernung des Pyridins weiter untersucht.

Carotinoide der Citrusfrüchte

Es wurden insgesamt 2000 kg Citrusfrüchte in Chargen von je 100 kg im Prinzip nach dem im folgenden beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Der Nachweis von 4 verschiedenen Aldehyden in ein und derselben Charge gelang nur ausnahmsweise, z. B. bei Verwendung rotorange gefärbter Paterno-Orangen.

100 kg Apfelsinen (Paterno Ernte Mai 1959) wurden geschält und die erhaltenen 10 kg Schalen im Fleischwolf feinst gemahlen. Man rührte mit 15 l Methanol an, ließ über Nacht stehen und saugte ab. Der Methanolextrakt wurde verworfen. Der Rückstand wurde zuerst 24 Stdn. mit 30 l Aceton stehengelassen und anschließend noch zweimal mit je 10 l Aceton extrahiert. Nach dem Verjagen des Acetons i. Vak. wurde der Rückstand in 3 l Äther aufgenommen, der Äther verdampft, der Rückstand (Lipoide) in Petroläther aufgenommen, von etwas Unlöslichem abgetrennt und die Lipide nach dem Verdampfen des Petroläthers in 1 l Äther + 100 ccm 10-proz. methanolischer Lauge über Nacht stehengelassen. Man wusch die Äther. Lösung 8 mal mit je 500 ccm Wasser alkalifrei, verdampfte zur Trockne und nahm den Rückstand in 500 ccm Petroläther auf. Nun wurde in üblicher Weise 12 mal mit je 50 ccm 90-proz. Methanol entmischt. Der hypophasische Anteil enthielt den größten Teil des β -Citaurins. Der epiphasische Anteil wurde aus Petrolätherlösung an 3.5 kg Al₂O₃ (\emptyset der Säule = 11 cm, Länge 70 cm) chromatographiert, wobei zunächst mit 5 l Petroläther, hier-

²⁶⁾ Siehe hierzu A. WINTERSTEIN und B. HEGEDÜS¹⁹⁾.

auf mit einem Gemisch Benzol/Petroläther (1 : 9) so lange entwickelt wurde, bis α - und β -Carotin ins Filtrat übergegangen waren (1. Zone). In den obersten 25 cm der Säule waren deutlich 7 Zonen zu erkennen, wobei die 4., gelegentlich auch die 5., durch ihre rotviolette Farbe auffielen. In diesen Zonen waren Apo-8'- und Apo-10'-carotinal angereichert, während sich Retinen eher in Zone 3 und das Pigment 541 eher in Zone 5 vorfanden. Wir haben gelegentlich beobachtet, daß Retinen in verhältnismäßig tief liegenden Zonen des Chromatogramms angereichert war, es kam auch vor, daß wir — in der Meinung, die Apo-8'-carotinal-Zone vor uns zu haben — auf das Pigment 541 stießen.

Bei der Aufarbeitung der dritten gelb gefärbten Zone auf Retinen fanden wir Mutatochrom (Absorpt. 489, 455 m μ in CS₂, HCl-Reaktion positiv), sowie ein zweites Carotinoid (Absorpt. 506, 475, 442 m μ in CS₂), das wir nicht identifizieren konnten. Dieses Pigment besitzt sehr ähnliche Adsorptionseigenschaften wie β -Apo-8'-carotinal und vermag in den meisten Fällen die Absorptionsbanden des letzteren zu verdecken, auch dann noch, wenn sich der Aldehyd im Säulenchromatogramm schon durch seine violette Farbe zu erkennen gibt. Zur Entscheidung, ob in solchen Fällen Aldehyde vorhanden sind, wird ein kleiner Teil der zu untersuchenden Fraktion, z. B. enthaltend ca. 20 γ Carotinoide, mit Hydroxylamin behandelt und analysiert: auf der nicht-impregnierten Platte bleiben die Oxime unten hängen, auf der impregnierten laufen sie rascher als die Aldehyde. Neben der Oximierung ist auch die Verwendung von Rhodanin zum Aldehydnachweis begleitend für die Untersuchungen. Bei der Aufarbeitung der 100 kg Paterno-Orangen erhielten wir in der 5. Zone chromatographisch fast einheitliches *Pigment 541*; nach zweimaliger Wiederholung der Säulenchromatographie ergab die Kontrolle auf der Platte die Einheitlichkeit dieser Carbonylverbindung (Tab. 2).

Tab. 2. Charakteristische Absorpt.-Banden (in m μ) der Carbonylverbindung unbekannter Konstitution (*Pigment 541*)

	CS ₂	541	500	455
	Benzol	515	487	
	Petroläther	502	474	
Oxim	CS ₂	523	489	
Semicarbazon	CS ₂	533	499	463

In den meisten anderen Fällen mußte dieser Aldehyd durch mikropräparative Plattenchromatographie gereinigt werden.

Das im Säulenchromatogramm zwischen *Pigment 541* und dem β -Apo-8'-carotinal liegende β -Apo-10'-carotinal²⁷⁾ (Tab. 3) hatten wir anfänglich übersehen; unter Verwendung von Rhodanin später jedoch — fast stets vergesellschaftet mit β -Apo-8'-carotinal — eindeutig nachweisen können. Die Rhodaninverbindung des β -Apo-10'-carotinals läßt sich auf der Platte leicht von derjenigen des β -Apo-8'-carotinals differenzieren.

Tab. 3. Charakteristische Absorpt.-Banden (in m μ) des β -Apo-10'-carotinals

	CS ₂	505	469	
	Benzol	487	453	
	Petroläther	472	438	
Oxim	CS ₂	487	453	
Rhodaninderivat	CS ₂	601	554	501
	Benzol	575	530	
	Petroläther	560	514	

²⁷⁾ Wir hatten das β -Apo-10'-carotinal in unserer ersten Veröffentlichung (R. RÜEGG et al., *Helv. chim. Acta* **42**, 854 [1959]) als ölig beschrieben. Es ist nun gelungen, diesen Aldehyd aus Petroläther in groben, roten Nadeln zu erhalten, die bei 97–98° schmelzen. Absorpt.-Max. 437 m μ , $E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 2550$ (in Petroläther).

Nachweis des β -Apo-8'-carotinals: Zur Isolierung des β -Apo-8'-carotinals in Form des ^{14}C -markierten Semicarbazon haben wir gemäß dem oben beschriebenen Verfahren 400 kg bezüglich Farbe der Schale besonders ausgesuchte Orangen aufgearbeitet. Die „Aldehydfraktion“ war meist durch ihre rotviolette Farbe schon im Säulenchromatogramm zu erkennen. Zur Aufarbeitung auf β -Apo-8'-carotinal wurden zunächst verhältnismäßig breite Zonen aus den Säulenchromatogrammen abgetrennt und die Säulenchromatographie — stets kontrolliert durch Dünnschichtchromatogramme — so oft wiederholt, bis die in Tab. 4 angegebenen Absorptionsbanden im Spektroskop deutlich zu sehen waren.

Tab. 4. Absorpt.-Banden (in μ) der an β -Apo-8'-carotinal angereicherten „Aldehydfraktion“

	CS_2	526	488	
	Benzol	504	470	
	Petroläther	492	459	
Oxim	CS_2	506	473	
Semicarbazone	CS_2	522	488	458
	Benzol	504	469	437
	Petroläther	490	458	430
Rhodianinderivat	CS_2	625	574	527

Wir erhielten schließlich 1.5 g eines dickflüssigen Öls, in welchem — kolorimetrisch im Vergleich zu reinem synthet. β -Apo-8'-carotinal bestimmt — 22 mg des letzteren vorhanden waren.

Das ^{14}C -markierte Semicarbazone wurde folgendermaßen dargestellt: die 1.5 g schwere β -Apo-8'-carotinal-Fraktion wurde in 45 ccm absol. Pyridin gelöst und die Lösung zu 14 mg radioaktivem Semicarbazid-hydrochlorid gegeben. Bei 1stdg. Erwärmen auf 50° und gelegentlichem Schütteln ging das Reagenz allmählich in Lösung. Nun wurden 66 mg nicht radioaktives, feinpulverisiertes Semicarbazid-hydrochlorid zugegeben und nochmals 5 Stdn. auf 50° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde mit 250 ccm Äther versetzt und zunächst 6 mal mit je 250 ccm Wasser, hierauf 5 mal mit je 200 ccm $n\text{H}_2\text{SO}_4$ und schließlich 10 mal mit je 200 ccm Wasser gewaschen. Die beim Waschen eintretenden Verluste an Äther wurden ersetzt. Nach dem Verjagen des Äthers wurden Spuren Wasser zunächst durch Zusatz von absol. Äthanol und Verdampfen i. Vak. und schließlich durch Zusatz von Petroläther und Verdampfen des letzteren i. Vak. vollständig entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 20 ccm heißem Petroläther gelöst und mit einer Spur synthet. Semicarbazone des β -Apo-8'-carotinals angeimpft. Nach 4 tägigem Aufbewahren bei $+2^\circ$ wurde das auskristallisierte radioaktive Semicarbazone abzentrifugiert, 3 mal mit je 5 ccm Petroläther und 3 mal mit je 5 ccm tiefsiedendem Petroläther gewaschen. Ausb. 14 mg. Aus den Mutterlaugen konnten durch Chromatographie noch weitere 1.7 mg Semicarbazone erhalten werden. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther schmolz das Präparat bei $204-207^\circ$ (Zers.); das synthet. β -Apo-8'-carotinal-semicarbazone schmolz bei $207-210^\circ$ (Zers.).

Für die Röntgenographie und Radioaktivitätsbestimmung wurden 9 mg des reinen ^{14}C -markierten β -Apo-8'-carotinal-semicarbazons mit 11 mg nicht markiertem synthet. Produkt in einem Zentrifugenglas mit 20 ccm Benzol auf 70° erwärmt und von einer Spur unlöslicher Anteile in einer auf 80° vorgewärmten Zentrifuge getrennt. Die klare Benzollösung wurde abgehebert und in 8 ccm 75° warmen Petroläther, der sich in einem Zentrifugenglas befand, einlaufen gelassen. Man ließ langsam erkalten und gewann das in einheitlichen Kristallen anfallende Semicarbazone durch Zentrifugation und anschließendes Waschen mit tiefsiedendem Petroläther. Es wurden 11.4 mg Kristallinat erhalten, das für die röntgenographische Untersuchung diente. Unter genau den gleichen Bedingungen wurde das Semicarbazone des synthet. β -Apo-8'-carotinals dargestellt. Der Vergleich der Röntgenbeugungsdiagramme der

beiden Semicarbazone ließ auf Identität der Kristallgitter und damit ihrer chemischen Struktur schließen.

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurde die Hauptfraktion und sämtliche aus Mutterlaugen isolierten radioaktiven Semicarbazonfraktionen vereinigt, wobei 26 mg Substanz erhalten wurden. Es wurde 4 mal aus einem Gemisch Benzol/Petroläther (2:1) umkristallisiert, von den Kristallisationen 2–4 wurde die Radioaktivität bestimmt: zu diesem Zweck wurden je 3 Meßproben zu ca. 20 γ im Tracerlab CE-1 Liquid Scintillation Counter ausgezählt. Die im folgenden angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den 3 Meßpräparaten, reduziert auf 20.0 γ .

Kristallisat	2	3	4
Imp./Min.	17403	17355	18140

Die gefundenen Werte sind, wenn man die Fehler in der Probenzubereitung und der Aktivitätsmessung berücksichtigt, als annähernd konstant anzusehen. Der etwas höhere Wert nach der 4. Kristallisation weist darauf hin, daß noch Spuren einer schwer zu entfernenden radioaktiven Beimengung anwesend sind. Trotzdem darf der Identitätsbeweis als erbracht gelten.

Nachweis von β -Apo-2'-carotinal (C_{37}) in Citrus madurensis: 80 kg Mandarinen mit orangefarbt gefärbter Schale (sog. Clementinen) wurden in oben angegebener Weise auf Aldehydfraction verarbeitet. Schon im ersten Säulenchromatogramm war über der sog. Aldehydzone eine zweite ebenfalls deutlich violett gefärbte Zone erkennbar. Nach zweimaliger Wiederholung der Säulenchromatographie erwies sich diese Zone bezüglich Carotinoidgehalt als praktisch einheitlich. Das Carotinoid ließ sich leicht als Aldehyd identifizieren, der durch seine im langwelligen Bereich des Spektrums liegenden Absorptionsbanden charakterisiert ist (Tab. 5).

Tab. 5. Charakteristische Absorpt.-Banden (in $m\mu$) des β -Apo-2'-carotinals

	CS ₂	579	544	505
	Benzol	556	515	
	Petroläther	540	504	470
Oxim	CS ₂	560	520	488
Semicarbazone	CS ₂	571	531	497

β -Apo-2'-carotinal läßt sich auf der mit Paraffin imprägnierten Platte besser nachweisen als auf der üblichen Kieselgelplatte, wo es eine Tendenz zur Schweißbildung zeigt. Der kolorimetrische Vergleich der aus 80 kg Mandarinen erhaltenen β -Apo-2'-carotinal-Fraktion mit dem synthet. Produkt ergab einen Gehalt von 40 γ . Unter Berücksichtigung der unvermeidlichen Verluste schätzen wir den Gehalt der Mandarinen an β -Apo-2'-carotinal auf 2–4 γ /kg.

In einer Charge von 100 kg Paterno-Orangen konnten wir diesen Aldehyd ebenfalls einwandfrei nachweisen.

Nachweis von Carotinoid-Aldehyden in Spinat

Die Aufarbeitung von frischem Spinat auf Aldehydfraction erfolgt nach A. WINTERSTEIN und B. HEGEDÜS¹⁹⁾.

Die dort beschriebene, über der Retinzone liegende, die höheren Aldehyde enthaltende Zone des Säulenchromatogramms wird mit Äther eluiert und zunächst im Dünnschichtchromatogramm analysiert. Dieses weist verschiedene, teils ineinander übergehende Zonen auf, wobei nur die zuunterst liegende violettrosa gefärbte die Anwesenheit eines Aldehyds vermuten läßt. Nach der Behandlung eines kleinen Teils dieser Aldehydfraction mit Hydroxylamin und erneuter Plattenchromatographie läßt sich an 4 neu auftretenden weißen Flecken im Chromatogramm unschwer erkennen, daß die untersuchte Fraktion 4 Aldehyde enthält, die als Retinen, β -Apo-10'-carotinal, β -Apo-8'-carotinal sowie Pigment 541 identifiziert werden

konnten. Zu diesem Zweck wurde die Aldehydfraktion nochmals an Al_2O_3 chromatographiert (\varnothing der Säule = 6 cm, Höhe = 60 cm) und die 3 dabei erhaltenen Hauptzonen — jede für sich — noch ein- bis zweimal der Chromatographie an Al_2O_3 unterworfen.

In einer oberen, violett gefärbten Zone fand sich Pigment 541, das durch mikropräparative Dünnschichtchromatographie von einem anderen, gelb gefärbten Carotinoid abgetrennt wurde (Absorpt.-Banden in CS_2 : 541, 499 $\text{m}\mu$, des Oxims in CS_2 : 522, 487 $\text{m}\mu$). In der darunter liegenden Zwischenzone ließ sich noch eine Spur Pigment 541, daneben etwas β -Apo-8'-carotinal nachweisen. Die Hauptmenge des letzteren fand sich in der darunter liegenden rotorange gefärbten Zone.

Absorpt.-Banden ($\text{m}\mu$) in	CS_2	Petroläther
β -Apo-8'-carotinal	526, 496, 455	494, 461
Oxim	506, 473	

In frischem Spinat, Ernte Januar 1960 fanden wir ca. 10γ β -Apo-8'-carotinal pro kg.

β -Apo-10'-carotinal liegt im Säulenchromatogramm nur wenig, aber deutlich unterhalb dem β -Apo-8'-carotinal. Die beiden Aldehyde werden am zweckmäßigsten im mikropräparativen Maßstabe auf der Platte getrennt (Absorpt.-Banden in CS_2 : 504, 466 $\text{m}\mu$, in Benzol: 486, 455 $\text{m}\mu$; des Rhodaninderivates in CS_2 : 598, 554, 501 $\text{m}\mu$, in Benzol: 575, 530 $\text{m}\mu$).

In einem Ende März 1960 geernteten Spinat fanden wir gegenüber dem im Januar geernteten deutlich mehr β -Apo-10'-carotinal als β -Apo-8'-carotinal, das in diesem Falle nur recht schwer nachweisbar war (vermutlich weniger als $3\gamma/\text{kg}$).

Nachweis von Carotinoid-Aldehyden in Gras, Klee, Grünkohl, Ackersalat, Kresse

Die vorgenannten grünen Pflanzen wurden in Mengen von 20—50 kg verarbeitet und zwar in genau der gleichen Weise wie für Spinat beschrieben.

In Gras und Klee fanden wir neben ca. 20γ Retinen/kg und Spuren β -Apo-8'-carotinal, besonders leicht nachweisbar das β -Apo-10'-carotinal. Pigment 541 konnte nicht nachgewiesen werden, dagegen in Spuren ein weiterer Aldehyd (Oximierung!), der nicht identifiziert werden konnte.

In Ackersalat ließ sich neben ca. 10γ Retinen pro kg β -Apo-8'- und auch β -Apo-10'-carotinal nachweisen. In Grünkohl fanden wir neben Retinen — verhältnismäßig gut faßbar — β -Apo-10'-carotinal sowie Spuren des Pigmentes 541, während wir β -Apo-8'-carotinal nicht mit absoluter Sicherheit identifizieren konnten. Oximierungsversuche ließen darauf schließen, daß noch eine weitere unbekannte Carbonylverbindung vorhanden war.

Bei der Aufarbeitung von 20 kg Kresse, in welcher wir neben Retinen β -Apo-8'-, β -Apo-10'-carotinal sowie Pigment 541 auffanden, stellten wir fest, daß sich aus unbekannten Gründen das β -Apo-10'-carotinal weit oberhalb und auch weit unterhalb der erwarteten Zone im Säulenchromatogramm vorfand. Mit diesem „Verschmieren“ des Chromatogramms, das z. B. beim Arbeiten mit Lycopin gelegentlich beobachtet wird, muß auch im Falle der Carotinoid-Aldehyde gerechnet werden.

Nachweis von β -Apo-8'-carotinal in der Darmmucosa

Es sind mehrere 100 kg Därme aufgearbeitet worden, bis es schließlich gelang, die Anwesenheit von β -Apo-8'-carotinal einwandfrei zu beweisen. Die Darmmucosa wurde durch Auspressen unter Verwendung eines Metallstabes gewonnen (10 kg Därme liefern ca. 2 kg Mucosa) und in der oben angegebenen Weise auf Aldehydfraktion verarbeitet. Obschon sich nach mehrfacher Säulenchromatographie an der erwarteten Stelle eine schwach aber deutlich rot-violett gefärbte Zone zeigte, gelang es mit den üblichen Methoden nicht, das gesuchte Carotinoid zu fassen. Im Dünnschichtchromatogramm konnten schließlich unter Verwendung

von Rhodanin in 4 kg Darmmucosa des Pferdes einige γ β -Apo-8'-carotinal nachgewiesen werden. Zur Abtrennung von Begleitstoffen wurde die Rhodaninverbindung an Al_2O_3 (\varnothing des Rohres 1.5 cm, Höhe 12 cm) chromatographiert. Das Rhodaninderivat des β -Apo-8'-carotinals bleibt bei Verwendung von Petroläther als Entwicklungsflüssigkeit in der obersten Zone des Chromatogrammes hängen (Absorpt.-Banden in CS_2 : 625, 576, 529 $\text{m}\mu$).

Carotinoide der Tomate

2 kg Tomatenpüree (Martorano, Parma) werden in 20 l Aceton 30 Min. gerührt, abgesaugt und der Rückstand noch 3 mal mit je 8 l Aceton extrahiert. Nach dem Verdampfen des Acetons i. Vak. wird in 4 l Äther + 400 ccm 10-proz. methanol. Kalilauge aufgenommen und über Nacht stehengelassen. Man wäscht 6 mal mit je 2 l H_2O alkalifrei und konzentriert auf 100 ccm, wobei Lycopin auskristallisiert, das abgetrennt wird (das so gewonnene bei 160–165° schmelzende Lycopin enthält kleine Mengen Lycopinale). Nach dem Verjagen des Äthers wird in üblicher Weise im System Petroläther/90-proz. Methanol 6 mal entmischt. Der epiphasische Anteil wird an Al_2O_3 (2 Rohre \varnothing 11 cm, Höhe 70 cm) chromatographiert, wobei ein Gemisch von Benzol/Petroläther (1 : 9) als Entwicklungsflüssigkeit dient. Das Lycopin geht rasch ins Filtrat über, im oberen Teil des Rohres sind deutlich 5 Zonen zu erkennen, von denen sich 2 durch rotviolette Farbe auszeichnen. Diese beiden Zonen werden durch zweimalige Chromatographie an Al_2O_3 weiter gereinigt, wobei ohne Schwierigkeiten zwei Fraktionen erhalten werden, in denen sich Apo-8'-lycopinal (C_{30}) sowie Apo-6'-lycopinal (C_{32}) nachweisen lassen.

Absorpt.-Banden ($\text{m}\mu$) in	CS_2	Benzol	Petroläther
Apo-8'-lycopinal	546, 508, 473	518, 487	507, 476
Oxim	524, 491, 458		

Wir schätzen den Gehalt des Tomatenpürees an diesem Aldehyd auf etwa 5 mg/kg.

Absorpt.-Banden ($\text{m}\mu$) in	CS_2	Benzol	Petroläther
Apo-6'-lycopinal	569, 525, 494	540, 502	527, 493, 460
Oxim	545, 496		
Semicarbazon	554, 512, 482		

Über den zwei rotviolett gefärbten Zonen fanden sich je eine gelb gefärbte, aus denen sich ohne Schwierigkeiten zwei chromatographisch einheitliche Carotinoide abtrennen ließen, die beide dieselben Absorptionsbanden aufweisen:

CS_2	Benzol	Petroläther
$\text{m}\mu$ 526, 489	505, 471	492, 458

Absorptionsbanden und Adsorptionsverhalten im Verein mit der Tatsache, daß die Tomate vorzugsweise Verbindungen vom Lycopintypus synthetisiert, lassen die Vermutung zu, daß es sich um zwei noch nicht bekannte Mono-epoxyde des Lycopins bzw. des Lycoxanthins handelt. Versuche, diese Mono-epoxyde durch O-Addition aus Lycopin synthetisch zu bereiten, schlugen fehl.

Nachweis von Bisdehydrolycopin in spanischen Orangen

Bei der Verarbeitung von 100 kg Valencia-Blutorangen beobachteten wir in den obersten Schichten des Säulenchromatogrammes eine violette Zone, die wir zunächst als β -Apo-2'-carotinal ansprachen. Bei der Behandlung mit Hydroxylamin trat jedoch keine Veränderung ein; im Dünnschichtchromatogramm bleibt das Pigment in den untersten Zonen hängen.

Ein Vergleich mit synthetisch gewonnenem Bisdehydrolycopin ergab die Identität mit letzterem:

CS ₂	Benzol	Pyridin
m μ 601, 558, 519	544, 504, 474	575, 536, 496

In den 100 kg Orangen waren schätzungsweise 50 γ Bisdehydrolycopin enthalten.

Nachweis von Torulin, Monodehydrolycopin und 3'.4'-Dehydro-17'-oxo- γ -carotin (C₄₀) in Mikroorganismen¹³⁾

Für die Untersuchung der durch gewisse Mikroorganismen produzierten Carotinoide standen uns eine größere Zahl von Konzentraten zur Verfügung, die in üblicher Weise durch Chromatographie an Al₂O₃ vorgereinigt waren. Die 3 oben angeführten Carotinoide (epiphasischer Anteil) fanden sich in den obersten Schichten der Säule, die wir als Torulin-, Monodehydrolycopin- und Aldehydzone bezeichnen.

a) *Torulin*: In der dickflüssigen Lösung, die aus der Torulinzone erhalten worden war, hatten sich 3 mg violette Kristalle abgeschieden, die nach Umkristallisieren aus Benzol/Äthanol bei 183–184° schmolzen und die durch die folgenden Absorptionsbanden charakterisiert werden konnten:

CS ₂	Benzol	CHCl ₃	Petroläther
m μ 563, 525, 491	541, 503, 470	537, 501, 467	525, 491, 459

Das Produkt stimmt nach Schmp., Mischprobe, Spektrum und Adsorptionsverhalten mit dem synthetischen Carotinoid¹⁴⁾ überein.

b) *Monodehydrolycopin* fand sich in einer über der Torulinzone liegenden Schicht des Chromatogramms, die sich durch ihre violette Farbe zu erkennen gab. Es ist durch folgende Absorptionsbanden charakterisiert:

CS ₂	Benzol	Petroläther
m μ 574, 536, 501	551, 514, 481	535, 500, 468

Das aus Mikroorganismen isolierte Pigment stimmte in Adsorptions- und Absorptionsverhalten mit dem auf folgendem Wege gewonnenen *Monodehydrolycopin* überein²⁸⁾.

5 g *Lycopin* wurden in 500 ccm CCl₄ gelöst, mit 1.75 g *Bromsuccinimid* versetzt und unter Rühren 2 Std. zum Sieden erhitzt. Nach dem Waschen mit NaHCO₃-Lösung und Wasser wurde die Lösung zur Trockne gebracht und der Rückstand an 10 kg Al₂O₃ (2 Säulen \varnothing 11 cm, Höhe 70 cm) aus einer Lösung Benzol/Petroläther (1 : 1) chromatographiert. Entwickeln mit Petroläther, Petroläther + 3% Äther, zum Schluß mit CH₂Cl₂, bis der gesamte Farbstoff ins Filtrat übergegangen war. Es wurden 1.4 g unverändertes *Lycopin* zurückerhalten. Die Fraktionen mit Absorpt.-Banden 574, 536 m μ (CS₂) wurden vereinigt und nochmals an Al₂O₃ chromatographiert. Die hierbei erhaltenen 0.55 g Substanz wurden aus 50 ccm Benzol + 50 ccm Petroläther umkristallisiert, wobei 250 mg Carotinoid vom Schmp. 185–196° erhalten wurden. Nach nochmaliger Chromatographie an Al₂O₃ und zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther wurde das *Monodehydrolycopin* in tiefvioletten feinen Nadelchen (75 mg) vom Schmp. 196° erhalten. Absorpt.-Max. 497 m μ , $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2823$ (in Petroläther). Im Dünnschichtchromatogramm ließ sich trotz der vielfachen Reinigungsoperationen noch ca. 1% einer Beimengung nachweisen.

c) *3'.4'-Dehydro-17'-oxo- γ -carotin (C₄₀)*: Eine Carotinoidfraktion enthaltend 54 mg Pigment (als Carotin bestimmt), die aus einer über dem Torulin liegenden Zone des Säulenchromatogramms stammte, wurde an Al₂O₃ chromatographiert (\varnothing der Säule 6 cm, Höhe 40 cm), wobei sich beim Entwickeln mit Petroläther 7 Zonen ausbildeten. In der untersten

Zone war noch etwas Torulin enthalten, die 3. Zone erschien deutlich violett, während die darüber liegenden 4. bis 7. Zonen gelb bis orangefarben waren.

Die 3. Zone lieferte nach zweimaliger Wiederholung der Säulenchromatographie eine bezüglich Carotinoide praktisch einheitliche Zone, die durch ihr langwelliges Absorptionsspektrum gekennzeichnet war. Das Carotinoid konnte im Vergleich mit dem synthetischen Aldehyd unschwer als 3',4'-Dehydro-17'-oxo- γ -carotin identifiziert werden.

	CS ₂	Benzol	Petroläther
m μ	594, 555, 524, 491	562, 525, 491	548, 514, 480
Oxim	574, 533, 493	548, 513, 482	533, 495

Bei der Aufarbeitung der über der C₄₀-Aldehyd-Zone liegenden gelben Schicht stießen wir auf ein Carotinoid, das seinen Adsorptions- und Absorptionseigenschaften nach vermutlich Kryptoxanthin darstellte, über diesem fand sich in einer schwach rotviolett gefärbten Zone ein weiteres Carotinoid, das möglicherweise mit Celaxanthin identisch ist. Wir fanden die Absorptionsbanden etwas höher liegend als von A. L. LERSEN und L. ZECHMEISTER¹⁷⁾ angegeben, d. h. bei 566, 525, 490 m μ (CS₂), sehr ähnlich denjenigen des Torulins.

Begleitcarotinoide des Azafrins

Der im Rohazafrin enthaltene Neutralteil ergab bei der Chromatographie an Al₂O₃ (Petroläther) vier deutlich voneinander getrennte Zonen. Die 1. Zone bestand aus β -Carotin, die 2., hellgelbe Zone aus β -Carotinmonoepoxyd (Absorpt.-Banden in CS₂: 510, 479, 447 m μ), in der 3. und 4. Zone konnte mittels Rhodanins und durch Oximierung ein Aldehyd nachgewiesen werden. Dieser wurde durch nochmaliges Chromatographieren an Al₂O₃ und mikropräparative Trennung auf 20 Platten weiter gereinigt (Absorpt.-Banden in CS₂: 489, 457 m μ). Die Ausbeute betrug weniger als 1 mg/kg Wurzel.

Ein aus Azafrin-methylester durch Reduktion mit LiAlH₄ und anschließende Oxydation mit MnO₂ bereitetes Aldehydpräparat besaß dieselben Absorpt.-Banden wie das Naturprodukt, dem somit die Konstitution des Azafrinaldehyds (C₂₇) zukommen dürfte.

Oxydation von β -Carotin und Lycopin mit MnO₂

1 g β -Carotin wurde in 2,5 l Äther gelöst und mit 10 g MnO₂ 3 Stdn. unter Luftausschluß geschüttelt. Die vom Mangandioxyd befreite Lösung wurde mit verd. Kaliumjodid-Lösung und Wasser gewaschen und i. Vak. auf 100 ccm eingengt. Das auskristallisierte β -Carotin (0,4 g) wurde abgetrennt, die Lösung zur Trockne gebracht und der Rückstand mit Petroläther an Al₂O₃ chromatographiert, bis alles Carotin eluiert war. Durch Entwickeln mit Benzol/Petroläther (1:9) bildeten sich im oberen Teil der Säule zwei Zonen aus, die auf Grund des Dünnschichtchromatogramms 5–6 Carotinoide enthielten. Durch weiteres Chromatographieren konnten Retinen, β -Apo-10'- und β -Apo-8'-carotinal abgetrennt und als Rhodaninderivate identifiziert werden.

Die analog durchgeführte Oxydation von Lycopin ergab Apo-8'-lycopinal neben weiteren, nicht näher charakterisierten Aldehyden.

²⁸⁾ Analog der Darstellung des Bisdehydrolycopins nach P. KARRER und J. RUTSCHMANN, Helv. chim. Acta 28, 793 [1945].