

Les théories actuelles de l'élasticité du caoutchouc montrent l'importance de cette étude.

Après avoir mis de côté deux effets dûs à la cristallisation du caoutchouc qui peuvent gêner l'expérimentateur, nous avons montré en étudiant optiquement l'orientation temporaire d'un colorant de poids moléculaire élevé dissous dans une lamelle de caoutchouc que l'on étend brusquement, que la constante de diffusion de ce corps au sein du caoutchouc dépend fortement du parcours sur lequel la molécule diffuse.

En combinant ce fait et les résultats antérieurement acquis sur la diffusion des substances étrangères dissoutes dans le caoutchouc, nous sommes arrivés à la conclusion que la viscosité du caoutchouc doit varier selon la grandeur du domaine que l'on y envisage.

Nous avons rattaché ce fait aux théories actuelles de l'élasticité du caoutchouc.

Ce travail a été fait en 1943—44 à l'Institut de Chimie-Physique de l'Université de Bâle. Je tiens à remercier ici M. le Prof. W. Kuhn de l'hospitalité qu'il m'a accordée, des conseils qu'il m'a prodigués et de l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail, ainsi que M. le Dr. F. Grün, avec qui les différents points expérimentaux et théoriques ont été longuement discutés, et à qui je suis redevable de nombreuses suggestions.

Institut de chimie physique de l'Université de Bâle.

---

### 197. Über Violaxanthin, Auroxanthin und andere Pigmente der Blüten von *Viola tricolor*

von P. Karrer und J. Rutschmann.

(20. X. 44.)

In den Blüten des gelben Stiefmütterchens (*Viola tricolor*) hatten wir neben dem von R. Kuhn und A. Winterstein<sup>1)</sup> darin entdeckten Violaxanthin noch zwei weitere Carotinoide aufgefunden<sup>2)</sup>: Auroxanthin  $C_{40}H_{56}O_4$  und Flavoxanthin  $C_{40}H_{56}O_3$ . Nunmehr konnte ein viertes Pigment daraus isoliert werden, das nach Analyse, Schmelzpunkt, Löslichkeit, Krystallform und Absorptionsspektrum (in Alkohol) mit Blattxanthophyll  $C_{40}H_{56}O_2$  identisch ist. Wahrscheinlich kommt auch Zeaxanthin in kleiner Menge in den Blüten vor (vgl. weiter unten).

Der eine von uns hatte früher mit U. Solmssen<sup>3)</sup> durch Hydrierungsversuche wahrscheinlich gemacht, dass Violaxanthin 10 Mol

---

<sup>1)</sup> B. 64, 326 (1931).      <sup>2)</sup> Helv. 25, 1624 (1942).

<sup>3)</sup> P. Karrer und U. Solmssen, Helv. 19, 1024 (1936).

Wasserstoff aufnimmt. Diese Hydrierungszahl-Bestimmungen wurden jetzt nachgeprüft. Die neuen Versuchsergebnisse decken sich mit den früheren. Ebenfalls neu bestätigt haben wir die frühere<sup>1)</sup> Angabe, dass Perhydro-violaxanthin von Bleitetra-acetat in Eisessig nicht oxydiert wird, somit keine vicinalen Hydroxylgruppen enthält. Zum Vergleich führten wir eine Oxydation von Perhydro-azafrin mit Bleitetra-acetat aus, das nach *R. Kuhn* und *Deutsch*<sup>2)</sup> durch dieses Reagens oxydativ aufgespalten wird. In Übereinstimmung damit fanden wir einen Verbrauch von 0,92 Atomen aktivem Sauerstoff pro Mol Perhydro-azafrin.

Violaxanthin besitzt 4 Sauerstoffatome<sup>3)</sup>, von denen sich höchstens 2—3 bei der *Zerewitinoff*-Bestimmung als Hydroxylgruppen angehörend zu erkennen gaben<sup>4)</sup>. Um näheren Einblick in die Natur dieser OH-Gruppen zu erhalten, veresterten wir den Farbstoff mit Benzoylchlorid und p-Nitrobenzoylchlorid und erhielten ein schön krystallisiertes Dibenzoat und ein ebenso gut krystallisiertes Di-p-nitrobenzoat des Violaxanthins. (Die Acetylierung des Farbstoffs verläuft wenig einheitlich.) Die beiden Violaxanthin-Ester besitzen im sichtbaren Gebiet die gleichen Absorptionsbanden wie Violaxanthin selbst. Bei der Verteilung zwischen Petroläther und Methanol verhalten sie sich vorwiegend epiphasisch und geben mit konz. wässriger Salzsäure keine Blaufärbung. *R. Kuhn* und *A. Winterstein* hatten angegeben, dass auch die in den Stiefmütterchenblüten vorhandenen Ester des Violaxanthins, im Gegensatz zum Violaxanthin selbst, die blaue Farbreaktion mit konz. wässriger Salzsäure nicht zeigen.

Im Violaxanthin-dibenzoat haben wir die noch vorhandenen aktiven H-Atome nach *Zerewitinoff* nachzuweisen versucht. Hierbei konnte kein aktiver Wasserstoff festgestellt werden. Zum Vergleich wurden entsprechende Messungen mit Azafrin-methylester  $C_{28}H_{40}O_4$  vorgenommen, der bekanntlich zwei tertiäre OH-Gruppen enthält. Gefunden: 0,59% aktiver Wasserstoff (bei Zimmertemperatur). Für 2 aktive H-Atome berechnet: 0,45%.

Violaxanthin-dibenzoat enthält somit keine mittels der Methode von *Zerewitinoff* nachweisbaren Hydroxylgruppen. Eine Nachprüfung der mit derselben Methode im Violaxanthin selbst erkennbaren OH-Gruppen ergab zu wiederholten Malen etwa 2,5—2,6.

Aus diesen Ergebnissen müssen wir folgern, dass im Violaxanthin eines, wahrscheinlich aber beide in ihrer Funktion noch nicht erkannten Sauerstoffatome nicht Hydroxylgruppen angehören. Der vorwiegend epiphasische Charakter des Dibenzoats bei der Verteilungsprobe schliesst 2 freie OH-Gruppen sicher aus.

<sup>1)</sup> *P. Karrer, A. Zubrys, R. Morf, Helv. 16, 977 (1933).*

<sup>2)</sup> *B. 66, 883 (1933).*      <sup>3)</sup> *B. 64, 326 (1931).*

<sup>4)</sup> *P. Karrer, R. Morf, Helv. 14, 1044 (1931).*

Die Beurteilung der Funktion der Sauerstoffatome ist um so schwieriger, als Violaxanthin eine auch für einen Carotinoidfarbstoff ungewöhnliche Labilität und Zersetzlichkeit zeigt. Schon durch chromatographische Adsorption wird stets ein Teil der Verbindung zerstört; die weitgehende Zersetzung bei der Acetylierung in Pyridin mit Essigsäure-anhydrid wurde oben erwähnt. Als man Hydroxylamin bei Zimmertemperatur auf Violaxanthin einwirken liess, um eine allenfalls vorhandene Carbonylgruppe nachzuweisen, musste man auch bei dieser Reaktion eine weitgehende Veränderung feststellen; eine geringe Menge Violaxanthin konnte zurückgewonnen werden, der Hauptteil des Umsetzungsproduktes war eine nicht zur Krystallisation zu bringende Substanz mit 0,7 % Stickstoffgehalt. (Für ein Monoxim des Violaxanthins berechnen sich 2,3 % N.) Der Versuch gibt daher keinen sicheren Aufschluss über An- oder Abwesenheit einer Carbonylgruppe. Ein Oximierungsversuch in der Hitze hatte ein ähnliches Ergebnis, nur war hier das gesamte Violaxanthin in das amorphe, ca. 0,7 % Stickstoff enthaltende Umwandlungsprodukt übergegangen.

Sehr eigentümlich und bemerkenswert ist das Verhalten des Violaxanthins gegen verdünnte Mineralsäuren. Wenn man zur Lösung des Farbstoffs in Methanol so viel wässrige Salzsäure setzt, dass die Flüssigkeit ca. 0,2 % HCl enthält, tritt momentan Farbumschlag nach Grün ein; giesst man dann nach einer Minute in überschüssige Natronlauge, so wird die Farbe der Lösung wieder gelb. Diese Lösung enthält indessen kein Violaxanthin mehr, sondern drei verschiedene andere Pigmente, die sich chromatographisch trennen und durch Krystallisation rein gewinnen lassen. Das in der Adsorptionssäule zuoberst liegende Pigment ist Auroxanthin  $C_{40}H_{56}O_4$ , dann folgt ein bisher unbekanntes Carotinoid  $C_{40}H_{56}O_3$ , dem wir den Namen Mutatoxanthin<sup>1)</sup> geben, und schliesslich beobachteten wir regelmässig in der dritten Farbzone etwas (sehr wenig) Zeaxanthin.

Es ist selbstverständlich, dass wir für diese Versuche, die etwa ein Dutzend mal mit dem gleichen Resultat wiederholt wurden, nur chromatographisch gut gereinigtes Violaxanthin verwendeten, welches ein sehr scharfes Absorptionsspektrum besass und aus dem sich beim Chromatographieren keine Begleitpigmente mehr abtrennen liessen. Wir glauben daher, dass der mögliche Einwand, die nach der Säureeinwirkung auf Violaxanthin erhaltenen Farbstoffe könnten im Violaxanthinpräparat vorher enthalten gewesen sein, wenigstens bezüglich des Auroxanthins und Mutatoxanthins wenig Wahrscheinlichkeit für sich hat. Dagegen sprechen auch die relativ grossen Ausbeuten an den beiden Pigmenten: aus 100 mg chromatographiertem Violaxanthin isolierten wir nach der Säureeinwirkung jeweiligen ca. 5–10 mg

<sup>1)</sup> Von mutare abgeleitet, im Hinblick darauf, dass es anscheinend Umwandlungsprodukt des Violaxanthins ist.

krystallisiertes Auroxanthin und ca. 10 mg krystallisiertes Mutatoxanthin; da durch die chromatographische Reinigung und durch das Umkrystallisieren mindestens 50 % Verluste eintreten, kann man die tatsächlich entstandenen Mengen von Auroxanthin und Mutatoxanthin mindestens auf das Doppelte der angegebenen Ausbeuten veranschlagen. Etwas anders liegen die Verhältnisse bezüglich des ebenfalls, aber nur in sehr kleinen Mengen auftretenden Zeaxanthins; hier können wir die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass es sich in diesen geringen Quantitäten im chromatographierten Violaxanthin erhalten hatte und aus irgendwelchen Gründen von diesem nicht hatte trennen lassen. Wir konnten Zeaxanthin bei der chromatographischen Reinigung des Violaxanthins aus *Viola tricolor* bisher nie nachweisen.

Die Entstehung von Auroxanthin, Mutatoxanthin und vielleicht Zeaxanthin bei der Einwirkung sehr verdünnter Mineralsäure (statt Salzsäure kann mit demselben Erfolg z. B. auch Perchlorsäure benützt werden) ist eine so eigenartige Reaktion, dass wir auch die Möglichkeit noch ins Auge fassen, dass im Violaxanthin irgend eine Verbindung der zwei oder evtl. drei nach der Säureeinwirkung auftretenden Pigmente vorliegt, die erst durch die Säure aufgespalten wird; wahrscheinlich erscheint uns diese Hypothese allerdings nicht.

Mit Bestimmtheit können wir sagen, dass krystallisiertes Violaxanthin aus *Viola tricolor*, aus dem wir beim Chromatographieren keine anderen Farbstoffe mehr abtrennen konnten und welches alle in der Literatur für dieses Pigment beschriebenen Eigenschaften besass, bei der Einwirkung 0,2-proz. methanolischer wässriger Salzsäure oder anderer Mineralsäuren zerstört wird und dass sich hierauf drei neue Carotinoide isolieren lassen: Auroxanthin, Mutatoxanthin und (sehr wenig) Zeaxanthin.

Da weder die Konstitution des Violaxanthins noch diejenige des Auroxanthins oder Mutatoxanthins heute bekannt ist, fehlt z. Z. die Möglichkeit, den Übergang des Violaxanthins in die anderen Farbstoffe konstitutionschemisch zu diskutieren und zu verstehen. Wir haben aber versucht, zur Konstitutionsaufklärung des Auroxanthins und Mutatoxanthins, soweit es die kleinen zur Verfügung stehenden Mengen erlaubten, weitere experimentelle Befunde beizubringen.

Im Auroxanthin  $C_{40}H_{56}O_4$  lassen sich nur 2 Sauerstoffatome mit der Methode von *Zerewitinoff* als Hydroxylgruppen nachweisen. Veresterungen des Farbstoffs verlaufen wenig glatt. Über die Natur der restlichen zwei Sauerstoffatome des Auroxanthins kann man noch nichts aussagen.

Wir haben früher<sup>1)</sup> mitgeteilt, dass Auroxanthin bei der katalytischen Reduktion 9 Mol  $H_2$  aufnimmt. Ob daraus die Schlussfol-

<sup>1)</sup> Helv. **27**, 320 (1944).

gerung gezogen werden darf, dass Auroxanthin 9 Äthylendoppelbindungen enthält, ist indessen nicht sicher, denn der eine von uns hat zusammen mit *E. Jucker* neuerdings festgestellt, dass auch äthylenoxydische Gruppen in Carotinoiden unter Aufnahme von 1 Mol H<sub>2</sub> hydriert werden. Falls Auroxanthin — worüber nichts bekannt ist — eine solche äthylenoxydische Gruppe enthalten sollte, würde durch diese 1 Mol H<sub>2</sub> bei der Hydrierung verbraucht.

Das neue Carotinoid Mutatoxanthin C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>3</sub> hat dieselbe Bruttoformel wie Flavoxanthin, dem es auch im Aussehen und in den Löslichkeitsverhältnissen sehr ähnlich ist. Zwischen beiden Pigmenten besteht aber ein nicht unbeträchtlicher Unterschied im Absorptionsspektrum; Mutatoxanthin absorbiert längerwellig.

	Mutatoxanthin			Flavoxanthin		
Absorpt.-max. in Schwefelkohlenstoff. .	488	459	431 mμ	478	447,5	420 mμ
„ „ „ Äthylalkohol . . . . .	457	427	mμ	450	421	mμ
„ „ „ Benzol . . . . .	468	439	mμ	458,5	430	mμ
„ „ „ Petroläther . . . . .	456	426	mμ	450	421	mμ
„ „ „ Chloroform . . . . .	468	437	mμ	458	429,5	mμ
„ „ „ Pyridin . . . . .	473	443	mμ	—	—	

Mutatoxanthin schmilzt bei 177°. Es kristallisiert in zu Drusen vereinigten kleinen Nadeln. Die Verbindung enthält mindestens 2 Sauerstoffatome als Hydroxylgruppen, die sich nach *Zerewitinoff* nachweisen lassen; gefunden wurden 2,3 aktive H-Atome. Bei der Mikrohydrierung nimmt Mutatoxanthin 10 Mol H<sub>2</sub> auf.

Die Ergebnisse der Einwirkung sehr verdünnter Säure auf Violaxanthin scheinen uns auch in anderer Hinsicht von Interesse. In einer grösseren Abhandlung „Cis-trans Isomerization and Stereochemistry of Carotenoids and Diphenylpolyens“ gibt *L. Zechmeister*<sup>1)</sup> eine Zusammenfassung über Untersuchungen, welche die Darstellung cis-trans-isomerer Carotinoide betreffen. Durch Erhitzen oder Belichten oder Einwirkung von Jod oder Einwirkung von Säuren soll die Mehrzahl der bekannten, natürlichen, stabilen Carotinoidfarbstoffe in zahlreiche labile cis-trans-isomere Formen verwandelt werden können. Diese weitgehenden Schlussfolgerungen werden gezogen, obwohl die zahlreichen neuen Isomeren in den seltensten Fällen isoliert, und bezüglich ihrer Konstitution nicht untersucht worden sind. Was sich bei einem Carotinoid unter der Wirkung von Säuren in Wirklichkeit abspielen kann, lehrt das Beispiel des Violaxanthins. Unseres Erachtens kann die Existenz der zahlreichen „neuen Stereoisomeren“ der Carotinoide erst anerkannt werden, wenn jede einzelne

<sup>1)</sup> Chem. Reviews **34**, 267 (1944).

dieser Verbindungen rein, krystallisiert, analysiert und bezüglich der Konstitution untersucht vorliegt.

Der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung* an der Universität Zürich danken wir verbindlichst für die Unterstützung dieser Untersuchung.

### Experimenteller Teil.

#### Violaxanthin-di-p-nitrobenzoat.

50 mg Violaxanthin werden in 5 cm<sup>3</sup> trockenem Pyridin mit 50 mg p-Nitrobenzoylchlorid 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Zersetzung durch wässrige Natriumbicarbonatlösung und Krystallisation des ausgefallenen Esters aus Benzol. Smp. 208° unter Zersetzung (unkorr., im evakuierten Röhrchen).

$C_{54}H_{62}O_{11}N_2$	Ber. C 72,12	H 6,95	N 3,12%
$C_{54}H_{64}O_{11}N_2$	Ber. „ 71,96	„ 7,16	„ 3,11%
	Gef. „ 72,35	„ 7,21	„ 3,13%

#### Violaxanthin-di-benzoat.

Darstellung analog der vorbeschriebenen Verbindung. Krystallisation aus Benzol-Methanol-Gemisch. Smp. 217° (unkorr., im evakuierten Röhrchen).

$C_{54}H_{64}O_6$	Ber. C 80,14	H 7,91%
$C_{54}H_{66}O_6$	Ber. „ 79,94	„ 8,20%
	Gef. „ 79,73	„ 8,05%

Nach der Methode von *Zerevitinoff* liess sich kein aktiver Wasserstoff nachweisen.

#### Einwirkung von Säure auf Violaxanthin.

Wenn man eine Lösung von etwas Violaxanthin in Methanol mit einer kleinen Menge starker Salzsäure versetzt, schlägt die Farbe sofort von Orange nach Blaugrün um. Die entstandene Verbindung, wahrscheinlich ein Carbeniumsalz, lässt sich durch Zusatz von Lauge nicht mehr in Violaxanthin zurückverwandeln. Die Lösung, jetzt hellgelb gefärbt, zeigt ein ziemlich scharfes Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 453 und 424 m $\mu$  (Schwefelkohlenstoff). Sowohl die Bildung des Säureadduktes als auch die Hydrolyse, bzw. die entsprechenden Farbumschläge, erfolgen momentan. Die Einwirkungszeit der Säure kann von 1 Sekunde bis zu 24 Stunden variiert werden, ohne dass sich im Spektrum der erhaltenen Lösung wesentliche Unterschiede feststellen lassen. Verwendet man statt Salzsäure 70-proz. Perchlorsäure, so ergibt sich ein längerwelliges, weniger scharfes Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 487 und 458 m $\mu$  (Schwefelkohlenstoff).

Auf Grund dieser Vorversuche haben wir zahlreiche Ansätze von je 100 mg Violaxanthin mit Salzsäure und weitere 100 mg mit Perchlorsäure behandelt und die Reaktionsprodukte nach der Alkalibehandlung chromatographisch getrennt. Das verwendete Violaxanthin war durch Adsorption an Zinkcarbonat aus Benzollösung gereinigt. Es zeigte sich, dass sich nach der Behandlung mit beiden Säuren 3 Farbstoffe gewinnen liessen, von denen der eine mit Auroxanthin und der zweite mit Zeaxanthin identisch war, während im dritten ein bisher unbekannter Körper der Bruttoformel  $C_{40}H_{56}O_3$  und den Absorptionsmaxima 488, 459 m $\mu$  (in Schwefelkohlenstoff) vorlag (Mutatoxanthin).

#### Ausführung der Versuche:

100 mg Violaxanthin wurden in 70 cm<sup>3</sup> reinem Methanol gelöst und bei Zimmertemperatur mit 1 cm<sup>3</sup> 20-proz. wässriger Salzsäure versetzt. Die Lösung färbte sich sofort tiefgrün und wurde nach 1 Minute mit überschüssiger methanolischer Kalilauge unter starkem Umschwenken alkalisch gemacht, und zwar so, dass der Farbumschlag nach Gelb in der ganzen Lösung möglichst gleichzeitig erfolgte. Hierauf hat man mit Äther verdünnt und wiederholt mit Wasser gewaschen. Die Ätherlösung wurde im Vakuum

zur Trockene verdampft, der harzige Rückstand in Benzol aufgenommen und unter Stickstoff an einer Säule von Zinkcarbonat ( $3 \times 15$  cm) adsorbiert. Nach längerem Entwickeln mit Benzol erhielt man folgende gut getrennte Zonen:

1. 2—3 cm, hellgelb, nach unten scharf durch einen bräunlichen Rand begrenzt, ohne scharfe Absorptionsbanden
2. 3—4 cm, hellgelb, Absorptionsmaxima in  $\text{CS}_2$  453, 423 m $\mu$ ;
3. 1—2 cm, orange, Absorptionsmaxima in  $\text{CS}_2$  488, 559 m $\mu$ ;
4. 1 cm, hellrot, Absorptionsmaxima in  $\text{CS}_2$  518, 488 m $\mu$ ;

Eine hellgelbe und eine hellrote Zone, beide sehr schwach und ohne scharfes Absorptionsspektrum, wurden durchgewaschen.

Die Schichten 2, 3 und 4 haben wir einzeln mit Methanol-Äther 1:10 eluiert, den Äther mit Wasser wiederholt gewaschen und im Vakuum zur Trockene verdampft.

Der Eindampfungsrückstand von Schicht 2 wurde in wenig 90-proz. Methanol gelöst und die Lösung auf wenige cm<sup>3</sup> eingengt. Den beim Stehen im Eisschrank auskristallisierten Farbstoff haben wir abgenutscht und aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute 5—10 mg pro Ansatz. Das Produkt schmilzt bei 191—192° (unkorr., i. V.) und lässt sich im Mischchromatogramm nicht von Auroxanthin trennen. Es kristallisiert wie dieses aus Methanol in feinen gelben Nadeln und verhält sich gegen verdünnte Salzsäure gleich.

$\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_4$	Ber. C 79,94	H 9,41%
$\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_4$	Ber. „ 79,70	„ 9,72%
	Gef. „ 79,49	„ 9,37%

Schicht 3 wurde wie oben aufgearbeitet und lieferte das gut kristallisierende Mutatoxanthin vom Smp. 177°. Ausbeute: ca. 10 mg.

$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_3$	Ber. C 82,05	H 9,65%
	Gef. „ 82,22; 81,98	„ 9,88; 9,79%

Die Bestimmung des aktiven Wasserstoffs nach Zerevitinoff ergab 2,3 akt. Wasserstoff-Atome (0,39%).

Bei der Mikrohydrierung nahmen 3,87 mg bei 16° und 725 mm 1,63 cm<sup>3</sup> Wasserstoff auf, was 10,0 Doppelbindungen entspricht.

Eine Lösung des Farbstoffes in Äther gibt mit 25-proz. Salzsäure nach einigen Minuten eine schwache Blaufärbung.

Schicht 4 lieferte 2 bis 3 mg Zeaxanthin, Smp. 206°.

$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$	Ber. C 84,43	H 9,95%
	Gef. „ 83,95	„ 9,86%

Die hier angegebenen Ausbeuten an reinen Farbstoffen sind viel kleiner als die wirklich entstehenden Mengen, da besonders beim Auroxanthin die Verluste beim Chromatographieren und Kristallisieren sehr gross werden. Insgesamt dürften etwa 50% des Violaxanthins in Auroxanthin und den neuen Farbstoff umgewandelt werden. Der Rest, der grösstenteils in der Schicht 1 des Chromatogramms festgehalten wird, konnte nicht in identifizierbarer Form isoliert werden.

Chemisches Institut der Universität Zürich.