

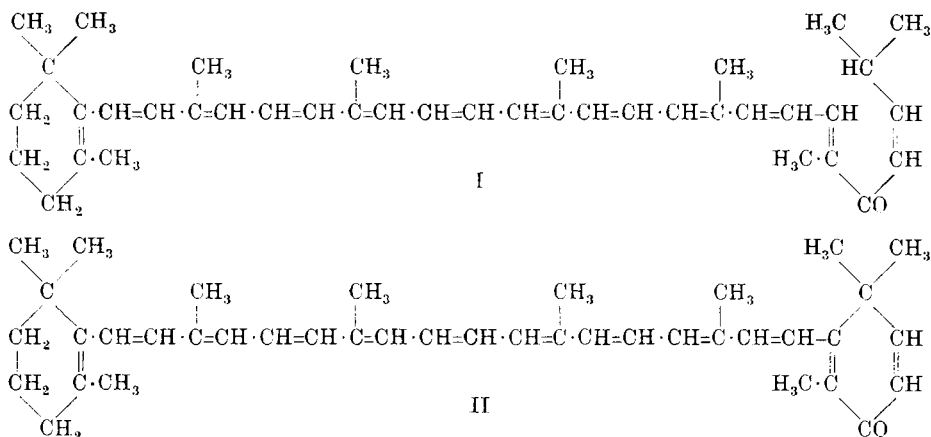
198. Beitrag zur Kenntnis der Carotinoide aus *Oscillatoria rubescens*

von P. Karrer und J. Rutschmann.

(20. X. 44.)

Aus der Alge *Oscillatoria rubescens* haben *J. Heilbron* und *Lythgoe*¹⁾ zwei Carotinoidfarbstoffe, Myxoxanthin und Myxoxanthophyll isoliert. Für ersteres fanden sie die Zusammensetzung $C_{40}H_{54}O$ und stellten die Konstitutionsformel I auf, die sich auf verschiedene Untersuchungsergebnisse stützt. Myxoxanthophyll entspricht nach der Arbeit der genannten Forscher der Zusammensetzung $C_{40}H_{56}O_7$; weiter reicht die Kenntnis dieses Pigments zur Zeit nicht.

Wir haben die Farbstoffe von *Oscillatoria rubescens* ebenfalls einer Untersuchung unterworfen und können bezüglich Myxoxanthin und Myxoxanthophyll die Befunde von *Heilbron* und *Lythgoe* bestätigen. Das schön krystallisierte Myxoxanthin gab Analysenwerte, die am besten mit der vorgeschlagenen Formel $C_{40}H_{54}O$ übereinstimmen. Beim Abbau mit Ozon fanden wir kein Aceton, was mit der angenommenen Konstitution I harmonisiert. Bei diesem Abbau mit Ozon liessen sich indessen auch kein Isobuttersäure-aldehyd und keine Isobuttersäure nachweisen, wodurch die Struktur I wieder in Frage gestellt wird. Wir haben daher auch an die bicyclische Formel II für Myxoxanthin gedacht, die 2 Wasserstoffatome weniger aufweist; die Analysen der Verbindung stimmen allerdings etwas besser auf die wasserstoffreichere Bruttoformel, wenn auch die Differenzen nicht gross sind.



¹⁾ Soc. 1936, 1376.

Die Analysen des Myxoxanthophylls stimmen auf die Formel $C_{40}H_{56}O_7$ oder $C_{40}H_{58}O_7$, zwischen welchen eine sichere Entscheidung nicht möglich ist. Der Schmelzpunkt dieses Pigments liess sich auf 182° (unkorr.) erhöhen. Bei der Mikrohydrierung nahm Myxoxanthophyll 11 Mole H_2 auf. Es enthält 4 durch Essigsäure-anhydrid veresterbare Hydroxylgruppen, die somit sekundären oder primären Charakter haben werden. Das Tetra-acetat besitzt noch 2 nach *Zerewitinoff* nachweisbare OH-Gruppen, die wahrscheinlich, da sie der Veresterung widerstanden, tertiären Charakter haben. Über das siebente Sauerstoffatom des Myxoxanthophylls besteht noch keine Klarheit. Nach dem langwelligen Spektrum des Farbstoffs zu schliessen, könnte dieser eine mit den Kohlenstoffdoppelbindungen in Konjugation stehende Carbonylgruppe enthalten. Durch Aluminiumisopropylat-Isopropylalkohol liess er sich indessen nicht reduzieren und die Frage, ob sich ein Oxim darstellen lässt, konnte infolge Materialmangel noch nicht eindeutig entschieden werden.

Neben Myxoxanthophyll und Myxoxanthin enthält das von uns bearbeitete *Oscillatoria rubescens*-Material Zeaxanthin (*Heilbron* und *Lythgoe* hatten Xanthophyll gefunden), ferner β -Carotin und schliesslich einen sauren Carotinfarbstoff, welcher der Beobachtung bisher entging und dem wir die Bezeichnung *Oscillaxanthin* geben wollen. Diese Verbindung ist in so geringen Mengen in den Algen enthalten und so schwer von den Begleitstoffen zu trennen, dass es uns bisher nicht gelang, sie rein darzustellen. Trotzdem kann man zu ihrer Charakterisierung heute schon einige Eigenschaften angeben.

Oscillaxanthin ist in Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff und Petroläther praktisch unlöslich, leicht löslich dagegen in Alkoholen, Pyridin und Aceton. In dem vorliegenden Reinheitsgrad löst es sich in Essigester relativ schwer, in Chloroform noch schwerer. Ester des Farbstoffs werden von Äther, Benzol, Pyridin und Chloroform leicht aufgenommen, kaum dagegen von Alkohol.

Wie bereits erwähnt, ist der Farbstoff sauer und in Alkalien löslich. Die $SbCl_3$ -Reaktion ist blaugrün, konz. Schwefelsäure und Perchlorsäure bewirken Blaufärbung, konz. Salzsäure ruft eine sehr unbeständige Blaufärbung hervor.

Die Absorptionsbanden des Oscillaxanthins liegen langwellig. Folgende Maxima wurden beobachtet:

in Schwefelkohlenstoff	568	528	494 $m\mu$
in Methanol	531	496	464 $m\mu$
in Pyridin	552	514	483 $m\mu$

Das Spektrum in Schwefelkohlenstoff wurde an einer Lösung gemessen, die durch Verdünnen eines Tropfens der alkoholischen Lösung mit viel Schwefelkohlenstoff erhalten worden war.

Durch die hier genannten Eigenschaften unterscheidet sich Oscillaxanthin von allen bisher bekannten Carotinoiden.

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

Ferner danken wir den Beamten und Angestellten des Wasserwerkes der Stadt Zürich für die Hilfe bei der Beschaffung des Algenmaterials.

Experimenteller Teil.

Extraktion des Myxoxanthins und Myxoxanthophylls.

Als Ausgangsmaterial diente im März gesammelter Klärschlamm aus den Filteranlagen der Stadt Zürich, der sehr reich an *Oscillatoria rubescens* war. Durch Zentrifugieren befreite man die Algen vom Hauptteil des Wassers, legte sie hierauf in Alkohol, zentrifugierte neuerdings ab und trocknete das Material im Vakuum bei 60°. 900 g dieser Trockensubstanz wurden hierauf mit 4 l Methanol und anschliessend dreimal mit je 4 l Äther kurz aufgekocht, die vereinigten Extrakte auf 1 l eingengt und mit wässriger Kalilauge während 4 Stunden auf dem Wasserbad verseift. Dann zog man die alkalische Lösung mit viel Äther aus und verdunstete die Ätherlösung im Vakuum zur Trockene.

Dieses Rohprodukt haben wir nun zwischen 1 l Petroläther und 1 l 95-proz. Methanol verteilt und so die epiphasischen von den hypophasischen Farbstoffen getrennt.

Die Petrolätherschicht wurde auf 200 cm³ eingengt. Nach mehrstündigem Stehen krystallisierte eine beträchtliche Menge Carotin aus. Die von diesen Krystallen abgetrennte Lösung wurde jetzt an einer Aluminiumoxydsäule (ø 3 cm, Höhe 40 cm) adsorbiert und das Chromatogramm mit Petroläther entwickelt. Das Nachwaschen wurde so lange fortgesetzt, bis die Carotin-Zone durch die Adsorptionssäule hindurchgespült war. Aus diesem Durchlauf wurden 150 mg β -Carotin isoliert. Die in der Säule zurückgebliebene violettbraune Myxoxanthinschicht wurde mit einer Mischung von Benzol-Methanol eluiert und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels der Rückstand aus einer Mischung von Pyridin und Methanol krystallisiert. So erhielt man 30 mg Myxoxanthin vom Smp. 168—169°.

Die hypophasische Methanolschicht haben wir stark eingengt, mit Wasser versetzt und ausgeäthert. Ein Teil des dabei auftretenden hellroten Niederschlags ging nicht in Lösung und wurde abgenutscht. Es gelang jedoch nicht, das spektroskopisch darin nachgewiesene Myxoxanthophyll direkt zu krystallisieren. Deshalb haben wir den Niederschlag und den Eindampfungsrückstand der Ätherlösung in Chloroform aufgenommen und auf Zinkcarbonat chromatographiert (Säule ø 3 cm, Höhe 20 cm). Myxoxanthophyll fand sich in der violettroten Zone; ein weiterer Farbstoff (Zeaxanthin) wurde durch die Säule hindurchgewaschen. Das in der Absorptionssäule festgehaltene Myxoxanthophyll liess sich durch Methanol eluieren und wurde hierauf aus Pyridin durch Zusatz von Benzin und Benzol ausgefällt. Nach mehrmaligem Krystallisieren aus Aceton mit Ligroin-zusatz und schliesslich aus Aceton allein haben wir die Verbindung in roten Nadeln erhalten, die den Smp. von 182° (unkorr.) besaßen.

Die durch die Absorptionssäule durchgewaschene Chloroformlösung wurde eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Benzol ausgekocht. Aus den Benzollösungen schied sich beim Erkalten der Farbstoff in glitzernden Drusen aus; aus Methanol wurde er in hellen, gelben Blättchen erhalten. Nach Aussehen, Absorptionsspektrum (in CS₂ Absorpt.-max. bei 518 und 487 m μ) und nach dem Smp. (204°, uncorr.) lag Zeaxanthin vor.

Untersuchung des Myxoxanthins und Myxoxanthophylls.

a) Myxoxanthin.

C ₄₀ H ₅₄ O	Ber. C 87,19	H 9,88%
	Gef. „ 86,68; 86,94	„ 9,85; 9,91%

Bei der Acetonbestimmung durch Abbau¹⁾ mit Ozon bildeten sich nur Spuren von Aceton bzw. eine Verbindung, die mit Jod Jodoform liefert (weniger als $\frac{1}{10}$ Mol pro Mol Myxoxanthin). Die Prüfung auf Aceton muss daher als negativ bezeichnet werden.

¹⁾ Vgl. z. B. *Pregl-Roth*: Die quantitative organische Mikroanalyse.

Es ist auch nicht gelungen, Isobuttersäure oder Isobutyraldehyd oder eine andere mittlere Fettsäure beim Abbau mit Ozon nachzuweisen.

b) Myxoxanthophyll.

$C_{40}H_{56}O_7$	Ber. C 74,01	H 8,71%
$C_{40}H_{58}O_7$	„ 73,78	„ 8,98%
	Gef. „ 73,76	„ 8,93%

Mikrohydrierung: 3,25 mg Myxoxanthophyll nahmen bei 27° und 724 mm 1,415 cm³ Wasserstoff auf, was einem Verbrauch von 10,9 Molen entspricht. Die ersten 10 Mole wurden innerhalb 8 Minuten, das 11. innerhalb 30 Minuten aufgenommen.

Myxoxanthophyll-acetat: 25 mg Myxoxanthophyll wurden in 5 cm³ Pyridin mit 200 mg Essigsäure-anhydrid 24 Stunden stehen gelassen. Nach dem Verdünnen mit Wasser zog man mit Äther aus und kristallisierte nach dem Verdampfen des Äthers den Rückstand aus Methanol. Das so erhaltene Myxoxanthophyll-acetat bildet glänzende violette Blättchen. Smp. 131—132°.

$C_{40}H_{52}O_7(COCH_3)_4$	Ber. C 70,53	H 7,90%
$C_{40}H_{54}O_7(COCH_3)_4$	„ 70,37	„ 8,12%
	Gef. „ 70,55; 70,76	„ 8,42; 8,52%

Die Zerewitinoff-Bestimmung ergab 0,225% akt. H entsprechend 1,8 akt. H-Atomen. Myxoxanthophyll besitzt demnach 4 durch Essigsäure-anhydrid veresterbare und 2 mit Essigsäure-anhydrid nicht reagierende, offenbar tertiäre, Hydroxylgruppen.

Das Acetat ist bei der Verteilung zwischen Benzin und Methanol hypophasisch und besitzt in Schwefelkohlenstoff die Absorpt.-max. 544, 508, 479 mμ.

Myxoxanthophyll-benzoat (dargestellt durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf den in Pyridin gelösten Farbstoff) haben wir nicht kristallisiert und daher nicht ganz rein erhalten. Die Bestimmung des akt. H in dem Benzoat ergab 1,8 akt. H-Atome pro Mol. Auch das Benzoat scheint demnach 4 Estergruppen und 2 unveresterte Hydroxyle zu enthalten.

Ein Versuch, Myxoxanthophyll durch 10-stündiges Kochen mit Isopropylalkohol und Aluminiumisopropylat zu reduzieren, ergab keine Änderung des Spektrums.

Der saure Farbstoff aus *Oscillatoria rubescens*.

Bei der vorstehend beschriebenen Isolierung der Carotinoide aus *Oscillatoria rubescens* ist die evtl. Anwesenheit von sauer reagierenden Pigmenten nicht berücksichtigt. Es hat sich gezeigt, dass in der alkalischen, wässrig-methanolischen, verseiften Lösung der Algenextrakte noch mindestens ein saures Carotinoid vorhanden ist. Versuche, dieses zu isolieren, haben wir in mannigfacher Abänderung ausgeführt. Im folgenden wird nur ein Weg beschrieben, der sich am besten bewährte. Da die Menge des vorhandenen sauren Farbstoffs sehr gering ist, ist eine Reindarstellung bisher nicht geglückt.

Die Algen wurden durch Zentrifugieren vom Hauptteil des Wassers abgetrennt und mit Alkohol zu einem dünnen Brei verrührt. Nach dem Abzentrifugieren des Alkohols hat man das Pflanzenmaterial in frischen Alkohol eingelegt, 4—5 Tage darin liegen lassen und dann abgenutscht. Der gut abgepresste Kuchen wurde durch Zerreiben mit den Händen möglichst fein verteilt, bei 50° getrocknet und gemahlen. Hierauf haben wir das Algenpulver (1750 g) zweimal durch einstündiges Kochen mit der doppelten Menge Methanol extrahiert, diese Extrakte und den Alkohol, der zum Entwässern der Algen diente, stark eingengt und durch vierstündiges Kochen mit wässriger Kalilauge verseift. Die verseifte Lösung wurde nach dem Verdünnen mit Wasser mehrmals mit viel Äther ausgezogen, die wässrige Phase durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure fast auf den Neutralpunkt gebracht und hierauf im Vakuum so lange eingengt, bis die Flüssigkeit frei von Methanol war. (Die Entfernung des Methanols darf erst nach dem alkalischen Ausäthern erfolgen, da Myxoxanthophyll nur bei Gegenwart von Methanol durch Äther extrahiert wird.) Die auf diese Weise erhaltenen wässrigen Lösungen, die grössere Mengen

eines schwarzen, harzigen Niederschlags enthielten, wurden mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert ($\text{pH} = 4-5$) und erneut mit Äther ausgezogen. So liess sich ein grosser Teil der Verseifungsprodukte des Chlorophylls abtrennen. Schliesslich haben wir den sauren Carotinoidfarbstoff, noch mit Chlorophyll verunreinigt, mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösungen sahen braun, in dünner Schicht orange aus. Sie wurden eingedampft, der Rückstand getrocknet, 5mal mit je 100 cm^3 Aceton ausgekocht, und diese Lösungen, die den Farbstoff enthielten, auf 100 cm^3 eingengt. Diese Lösung haben wir in einer Zinkcarbonatsäule chromatographiert und das Chromatogramm durch Nachspülen mit einer Aceton-Methanol-Mischung (20:1) entwickelt. Es zeigten sich folgende, durch farblose Schichten getrennte Zonen:

1. 5 cm grünlich-braun
2. 10 cm rot-violett
3. 1 cm orange (Myxoxanthophyll).

Die Zone 2 enthält den sauren Carotinoidfarbstoff. Sie wurde mit Methanol-Eisessig (100:1) eluiert, die Lösung auf ein Viertel eingengt, mit Essigester verdünnt und mit Wasser säurefrei gewaschen. Hierauf engten wir die Essigesterlösung auf wenige cm^3 ein und setzten Äther hinzu. Dabei schied sich ein dunkelrotes, schnell erstarrendes Harz ab, das von der Gefässwandung abgekratzt und abgenutscht werden konnte.

In diesem Präparat ist der saure Carotinoidfarbstoff in angereicherter Form enthalten. Versuche zur weiteren Reinigung über das Natriumsalz, durch Benzoylierung, durch Herstellung eines Nitrobenzoats u. s. w. führten nicht zum Erfolg. Wenn man zur Essigesterlösung des rohen Farbstoffs Jod hinzusetzt, fällt ein schwarzes Perjodid der Verbindung aus. Dessen Menge ist aber sehr gering. Daraus geht hervor, dass unsere rohen Farbstoff-Präparate noch sehr viele Begleitsubstanzen enthalten und dass der neue saure Carotinoidfarbstoff nicht mehr als etwa 10–20% des Gesamtpräparates ausmacht.

Über die Löslichkeiten des Farbstoffs finden sich Angaben in der Einleitung zu dieser Abhandlung.

Kürzeres Kochen mit Eisessig zerstört den Farbstoff nicht. Zinkstaub in Pyridin-Eisessigsäure bewirkt keine Veränderung des Spektrums, bei längerer Einwirkung des Reduktionsmittels wird der Farbstoff zerstört. Er scheint in der Alge in der beschriebenen Form vorzukommen, da ein aus unverseiftem Algenextrakt gewonnenes Präparat die gleichen Eigenschaften wie die aus Verseifungslösungen erhaltenen Produkte zeigte.

Chemisches Institut der Universität Zürich.

199. Vorläufige Mitteilung über ein neues Carotinoid aus Orangenschalen: Citroxanthin

von P. Karrer und E. Jucker.

(20. X. 44.)

Bei der Isolierung des Kryptoxanthins aus Orangenschalen¹⁾ fanden wir in den Mutterlaugen der Umkrystallisation des Kryptoxanthins in kleiner Menge ein Carotinoid, das eine ähnliche oder um 2 Wasserstoff-Atome reichere empirische Formel als Kryptoxanthin besitzt, aber bedeutend kurzwelliger absorbiert (vgl. das Absorptionsspektrum Fig. 1).

¹⁾ L. Zechmeister und P. Tuzson, B. 69, 1878 (1936).