

122. Über die Phytoxanthine der Löwenzahnblüten. Flavoxanthin

von P. Karrer und J. Rutschmann.

(23. VII. 42.)

Die Carotinoide der Löwenzahnblüten (*Taraxacum officinale*) sind schon wiederholt untersucht worden. *Palmer*¹⁾ wies darin spektroskopisch neben Carotin mindestens drei Phytoxanthine nach, von denen eines in alkoholischer Lösung mit Salzsäure Blaufärbung zeigte. Vermutlich dieser letztere Hinweis bewog *Zechmeister*²⁾ zu der Annahme, dass unter diesen Phytoxanthinen auch Violaxanthin enthalten ist, das sich bekanntlich in konz. wässriger Salzsäure blau färbt. Die Isolierung eines Phytoxanthins aus den Blüten gelang erstmals 1930³⁾; es war Xanthophyll, mit dem Carotinoid aus grünen Blättern identisch. Durch Anwendung des chromatographischen Reinigungsverfahrens erhielten *R. Kuhn* und *Lederer*⁴⁾ später aus dem rohen Carotinoidgemisch neben Xanthophyll einen zweiten Farbstoff, das Taraxanthin, dem die Formel $C_{40}H_{56}O_4$ zukommt.

In der Absicht, das letztgenannte Pigment herzustellen, haben wir 103000 Löwenzahnblüten, Ernte 1942, verarbeitet. Die Blüten wurden in der Nähe von Zürich und im Kanton Aargau gesammelt und frisch extrahiert. Zu unserer Überraschung konnten wir aber in diesem Material keine nachweisbare Menge Taraxanthin feststellen, dagegen neben Xanthophyll relativ viel Flavoxanthin. Man wird daher annehmen müssen, dass unsere Löwenzahnblüten einer anderen Varietät von *Taraxacum* entstammen als die von *Kuhn* und *Lederer* untersuchten oder dass die Umweltsbedingungen der Pflanzen verschiedene Einflüsse auf die Zusammensetzung des Carotinoidgemisches ausübten. Nach dieser Feststellung ist vorauszusehen, dass Natur und Mischungsverhältnis von Carotinoiden auch in anderen Pflanzen gelegentlich variieren werden.

Flavoxanthin ist erstmals in den Blüten des scharfen Hahnenfusses (*Ranunculus acer*) aufgefunden worden⁵⁾; nach qualitativen Versuchen soll es auch im Frühlingskrenzkraut (*Senecio vernalis*) auftreten, sonst aber wenig verbreitet sein. Es scheint aber, dass es doch häufiger vorkommt als man bisher glaubte, denn wir konnten es nicht nur aus Löwenzahnblüten, sondern auch aus gelben Stiefmütterchen (*Viola tricolor*) isolieren.

1) *L. S. Palmer*, Carotinoids and related Pigments, New York 1922, S. 70.

2) *L. Zechmeister*, Carotinoide, Berlin 1934, S. 208.

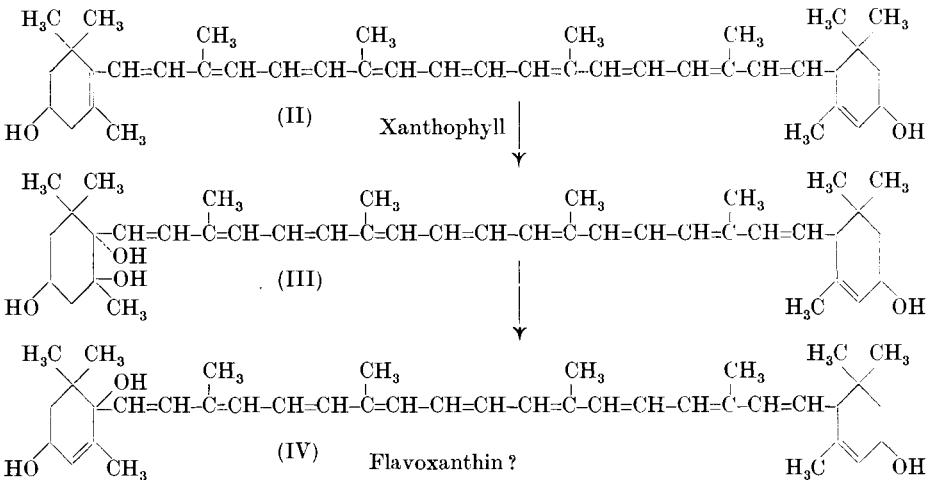
3) *P. Karrer* und *Salomon*, Helv. **13**, 1063 (1930).

4) *Z. physiol. Ch.* **200**, 108 (1931).

5) *Kuhn* und *Brockmann*, *Z. physiol. Ch.* **213**, 192 (1932).

Die tertiären C-Atome in der aliphatischen Kette kommen als Sitz einer Hydroxylgruppe nicht in Betracht, weil sonst Flavoxanthin Enol-Eigenschaften haben müsste. Man kann daher für Flavoxanthin das Strukturbild IV in Betracht ziehen, das natürlich noch durch weitere Abbauprobungen gestützt werden muss.

Über die Bildung des Flavoxanthins könnte man sich auf Grund der Formel IV folgende Vorstellung machen: Das Pigment tritt in der Pflanze zusammen mit Xanthophyll (II) auf. Wenn letzteres an der β -Jonon-Kohlenstoff-Doppelbindung oxydiert wird, kann eine Tetraoxyverbindung III entstehen, welche durch Verlust von Wasser (tertiäres Hydroxyl!) in das Trioxyderivat IV (Flavoxanthin?) übergeht. Es ist durch zahlreiche Versuche an α -Carotin und Xanthophyll bewiesen, dass die Oxydation dieser Verbindungen vorzugsweise am β -Jononkohlenstoffring, nicht am α -Jononring einsetzt, wie dies auch in unserer Hypothese der Flavoxanthinbildung der Fall ist:



Die vorstehende hypothetische Flavoxanthinformel könnte alle bis jetzt bekannten Eigenschaften dieser Verbindung erklären. Sie soll nach Beschaffung von neuem Material weiter geprüft werden.

Flavoxanthin gibt mit 25-proz. wässriger Säure eine wenn auch nicht sehr lange beständige Blaufärbung¹⁾. Die von Palmer²⁾ an den Carotinoiden aus Löwenzahnblüten beobachtete blaue Farbreaktion mit Salzsäure wird daher vermutlich auf den Flavoxanthingehalt zurückzuführen sein und nicht auf Violaxanthin, für dessen Vorkommen in diesen Blüten bisher keine Anhaltspunkte vorliegen.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **200**, 108 (1931).

²⁾ l. c.

Experimenteller Teil.

Extraktion der Farbstoffe.

Die abgeschnittenen gelben Kronblätter der frisch gepflückten Löwenzahnblüten wurden getrocknet und nachher zerrieben. 1,5 kg dieses Blütenmehls übergossen wir mit 8 Liter einer Mischung von Petroläther und Aceton (1:1) und liessen die Masse 3 Tage unter Kohlendioxyd in verschlossener Flasche stehen. Hierauf wurde die dunkelgelbe Lösung abgenutscht, der Rückstand ein zweites Mal in gleicher Weise extrahiert. Dann erfolgte Entmischung der Auszüge durch Wasserzusatz; durch mehrmaliges Ausschütteln der Petrolätherschicht mit Wasser liess sich diese von Aceton befreien.

Da das pflanzliche Material nach dieser Behandlung noch bedeutende Mengen von Farbstoff zu enthalten schien, haben wir es im Extraktionsapparat mit Petroläther erschöpfend extrahiert. Einem zweiten Ansatz von 1,5 kg Löwenzahnblüten wurden hierauf die Carotinoide durch 20-stündige Petroläther-Extraktion direkt entzogen. Die so gewonnenen Auszüge wurden zusammen auf 8 Liter eingengt und mit 1200 cm³ 12-proz. alkoholischer Kalilauge bei Zimmertemperatur verseift. Die Einwirkung der Lauge dauerte 16 Stunden. Bei der Entmischung mit Wasser ging der grösste Teil der Farbstoffe in die Alkoholschicht. Diese engten wir hierauf im Vakuum so weit ein, als es das starke Schäumen zuließ. Hierauf wurden sie ausgeäthert, der Ätherauszug mit Wasser alkalifrei gewaschen und der Äther abdestilliert. Es blieb ein dunkelrotes Harz zurück, das sich durch zweimaliges Abdampfen mit Benzol von Alkohol vollständig befreien liess.

Das so gewonnene Rohprodukt wurde in Benzol gelöst und an zwei Säulen von Aluminiumoxyd adsorbiert (Durchmesser der Adsorptionsschicht 4 cm, Höhe 40 cm). Für die Entwicklung des Chromatogramms wurden zunächst je 2 Liter Benzol, hierauf 2 Liter einer Mischung von Benzol und Äther (1:1) verwendet. Nach der Entwicklung enthielten die Adsorptionssäulen eine ca. 25 cm lange, von oben nach unten an Farbstärke zunehmende gelbe Zone, die ohne Trennung mit heissem Methanol eluiert wurde. Beim starken Einengen der Methanolextrakte krystallisierte das rohe Farbstoffgemisch aus. Die Mutterlauge, aus denen eine weitere Krystallisation nicht mehr zu erzielen war, haben wir eingedampft und die Rückstände aus Benzol-Lösung in analoger Weise in einer Aluminiumoxyd-Säule gereinigt. Nach mehrmaligen Wiederholungen dieser Operation hatten wir 860 mg krystallisierten Farbstoff in Händen, der hauptsächlich aus Xanthophyll und Flavoxanthin bestand.

Trennung der Carotinoide.

Die Trennung des Carotinoid-Gemisches in seine Bestandteile geschah in folgender Weise:

Durch Krystallisation aus Methanol wurde eine Fraktion erhalten, die zum grössten Teil aus Xanthophyll bestand, während die Mutterlauge, wie der Spektralbefund zeigte, hauptsächlich Flavoxanthin enthielt. Die Mutterlauge wurde daher eingedampft, der Rückstand in Benzol gelöst und diese Lösung in einer Zinkcarbonat-Säule chromatographiert. Flavoxanthin wird von Zinkcarbonat etwas stärker absorbiert als Xanthophyll. Die oberen Adsorptionsschichten des Chromatogramms erwiesen sich daher nach der Elution und Krystallisation spektroskopisch als reines Flavoxanthin. Aber auch aus den krystallisierten Xanthophyll-Fractionen konnte durch Chromatographie an Zinkcarbonat (Benzol-Lösung) eine weitere Menge Flavoxanthin aus den oberen Adsorptionsschichten abgetrennt werden. Rohausbeute an Methanol-haltigem krystallisiertem Flavoxanthin: ca. 160 mg.

Dieser Farbstoff wurde hierauf in Benzol gelöst, die Benzollösung mit destilliertem Wasser mehrmals ausgeschüttelt, hierauf im Vakuum zur Trockene verdampft und der Rückstand nochmals aus Methanol krystallisiert. Nach dem Trocknen bei 100° im Vakuum von 0,02 mm betrug die Ausbeute an Methanol-freiem reinstem Flavoxanthin 80 mg.

Smp. im evakuierten Röhrchen 178° (unkorr.).

$C_{40}H_{56}O_3$	Ber. C 82,14	H 9,62	akt. H. 0,51%
	Gef. „ 82,22	„ 9,81	„ „ 0,48%

Das Präparat war methoxyfrei.

Die Absorptionsbanden in Schwefelkohlenstoff lagen bei 479, 449 und 420 m μ , in Petroläther und Methanol bei 450 und 421 m μ . Der Farbstoff zeigte beim Schütteln der ätherischen Lösung mit 25-proz. wässriger Salzsäure blaue Färbung, die indessen weniger intensiv als diejenige des Violaxanthins ist.

Bei der Mikrohydrierung unseres Flavoxanthin-Präparates wurden etwas mehr als 11 Mol Wasserstoff aufgenommen.

Diacetyl-flavoxanthin.

25 mg Flavoxanthin wurden in 1,5 cm³ reinstem Pyridin gelöst und mit 200 mg Essigsäure-anhydrid während 45 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt. Dann verdünnte man die Lösung mit 10 cm³ Äther und schüttelte die Ätherschicht mehrmals mit Wasser aus. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels des ätherischen Auszuges wurde das gebildete Diacetyl-flavoxanthin zweimal aus Methanol umkrystallisiert und hernach unter 0,02 mm bei 100° getrocknet. Es bildet glänzende orange-rote Blättchen, die im evakuierten Röhrchen bei 157° (unkorr.) schmolzen. Ausbeute 12 mg.

$C_{44}H_{60}O_5$	Ber. C 78,98	H 9,04%
	Gef. „ 78,89	„ 9,18%

Für Flavoxanthin-monoacetat berechnen sich: C 80,45, H 9,33 %. Für Flavoxanthin-triacetat wären die entsprechenden Werte: C 77,62, H 8,82 %.

Die Analyse spricht somit eindeutig für das Vorliegen des Diacetats. Eine zweite Acetylierung von Flavoxanthin ergab ein Diacetat, das nach Eigenschaften und Analyse genau mit der Verbindung der ersten Herstellung übereinstimmte.

Dass das Acetylierungsprodukt des Flavoxanthins ein freies Hydroxyl enthält, geht weiterhin aus dem positiven Ausfall der *Zerewitinoff*-Bestimmung hervor und ferner aus dem Verteilungsquotienten der Substanz im Methanol-Petroläther-Gemisch. Verteilt man die Verbindung zwischen Petroläther und 90-proz. Methanol, so werden beide Schichten annähernd gleich stark angefärbt.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

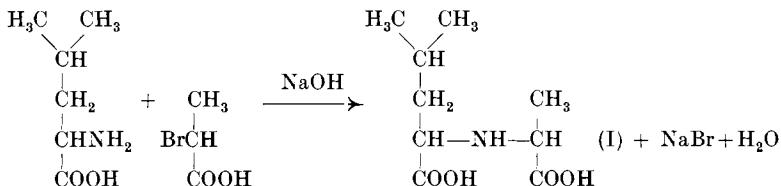
123. Weitere Versuche über die Einwirkung von Fermenten auf α, α' -Imino-dicarbonsäuren

von P. Karrer und R. Appenzeller.

(25. VII. 42.)

In Fortführung früherer Versuche¹⁾ haben wir weitere α, α' -Imino-dicarbonsäuren hergestellt und ihr Verhalten gegen die *d*-Aminosäureoxydase und *l*-Aminosäureoxydase aus frischem Leber- und Nierenbrei untersucht. Die betreffenden Verbindungen sind die folgenden:

1) Racemische α, α' -Imino-isocaproinsäure-propionsäure (Formel I), dargestellt aus *d, l*-Leucin und *d, l*- α -Brompropionsäure, entsprechend folgender Reaktionsgleichung:



2) (+) α, α' -Imino-*l*-caproinsäure-propionsäure (Formel I), erhalten aus (–) *l*-Leucin und *l*- α -Brompropionsäure. In dieser Verbindung ist die Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms, das dem Propionsäurerest angehört, unbekannt.

3) α, α' -Imino-*l*-caproinsäure-propionsäure (Formel I) erhalten aus (–) *l*-Leucin und *d*- α -Brompropionsäure. Diese Säure liess

¹⁾ P. Karrer und R. Appenzeller, Helv. **25**, 595 (1942).