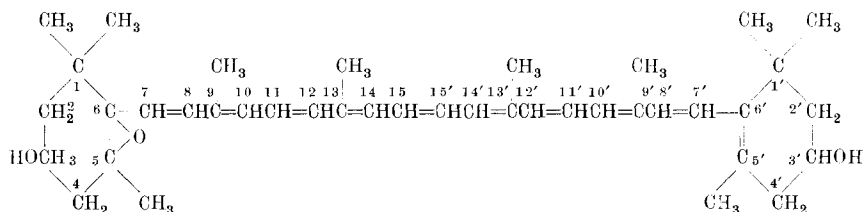


10. Über die Carotinoide aus den Staubbeuteln von *Lilium candidum*. Cis-Antheraxanthin

von G. Tappi und P. Karrer.

(2. XII. 48.)

Vor längerer Zeit sind in unserem Laboratorium aus den Staubbeuteln von *Lilium tigrinum* Capsanthin und Antheraxanthin isoliert worden¹⁾. Die Konstitution des Antheraxanthins konnte erst viel später aufgeklärt und der Farbstoff durch Partialsynthese aus Zeaxanthin dargestellt werden²⁾. Die Verbindung ist das mono-Epoxyd des Zeaxanthins:



Wir waren nunmehr in der Lage, die Staubbeutel einer anderen Lilien-Art, von *Lilium candidum*, auf ihre Farbstoffe näher zu untersuchen. Diese sind von dem einen von uns (G. T.) in Turin gesammelt worden. Wie die Antheren von *Lilium tigrinum* erwiesen sich auch jene von *Lilium candidum* reich an Carotinoidpigmenten, doch waren letztere von den in *Lilium tigrinum* gefundenen verschieden³⁾.

Das Hauptcarotinoid der Staubbeutel von *Lilium candidum* war hypophasisch und erwies sich als ein cis-Isomeres des Antheraxanthins, das wir daher als cis-Antheraxanthin bezeichnen. Die Beweise dafür sind folgende:

Die Verbindung schmilzt bei 110° (unkorr.) im evakuierten Röhrchen, (trans) Antheraxanthin bei 205°. L. Zechmeister und Mitarbeiter haben in zahlreichen Abhandlungen gezeigt, dass die cis-Formen der Carotinoide stets tiefere Schmelzpunkte als die trans-Formen besitzen.

¹⁾ P. Karrer und A. Oswald, Helv. **18**, 1303 (1935).

²⁾ P. Karrer und E. Jucker, Helv. **28**, 300 (1945).

³⁾ Es ist eine durch viele Beispiele belegte Tatsache, dass die Natur und die Menge der Carotinoide in der gleichen Pflanzenart durch die äusseren Bedingungen, unter denen die Pflanze wächst, stark beeinflusst werden. Man findet daher häufig in Pflanzen derselben Art, die aus verschiedenen Gegenden stammen oder nicht zur selben Jahreszeit geerntet wurden, verschiedene Carotinoidpigmente.

Unser cis-Antheraxanthin absorbiert um ca. 4–6 m μ kürzerwellig als gewöhnliches (trans) Antheraxanthin. In verschiedenen Lösungsmitteln wurden die folgenden Absorptionsmaxima beobachtet:

	trans-Antheraxanthin	cis-Antheraxanthin
CS ₂ . . .	510 479 m μ	506 476 m μ
Benzol . .	492 462 m μ	487 457 m μ
Äthanol .	476 450 (420) m μ	472 445 (418) m μ

Die Absorptionskurve Fig. 1 lässt ausserdem erkennen, dass im U.V.-Gebiet die trans-Verbindung bei 270 m μ (daneben sehr schwach bei 335 m μ), das cis-Isomere bei 268 und 331 m μ Absorptionsmaxima besitzt (in Äthanollösung). Das Maximum 331 m μ ist der „Cis-Gipfel“, den *L. Zechmeister* als charakteristisch für Carotinoide mit Cis-Konfiguration erkannt hat¹⁾. Auch die Forderung ist erfüllt, dass der Cis-Gipfel ca. 142 (\pm 2) m μ vom längerwelligen Absorptionsmaximum entfernt liegen soll¹⁾.

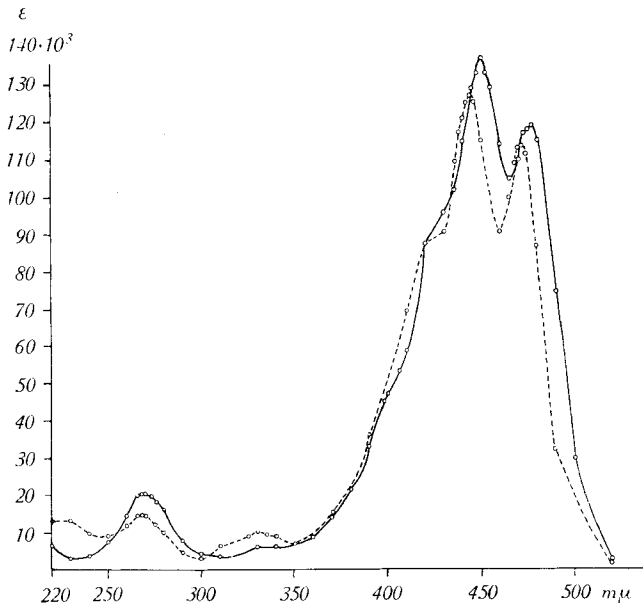


Fig. 1.

— trans-Antheraxanthin (synthetisch)
 - - - cis-Antheraxanthin (aus Pollen von *Lilium cand.*)
 in Alkohol

¹⁾ Vgl. z. B. *L. Zechmeister*, Chem. Rev. **34**, 267 (1944).

Der Charakter einer cis-Form unseres neuen Carotinoids wird weiterhin durch die Tatsache bewiesen, dass es unter der Einwirkung geringer Mengen Jod isomerisiert wird¹⁾; hierbei verschieben sich die Absorptionsmaxima in der Schwefelkohlenstofflösung um ca. 3 $m\mu$ in der Richtung der längeren Wellen, d. h. sie fallen praktisch mit denjenigen des trans-Antheraxanthins fast zusammen. Die geringe, zur Verfügung stehende Menge an cis-Antheraxanthin hat uns noch nicht erlaubt, diese Isomerisierung präparativ auszuwerten und das durch die Umlagerung gebildete trans-Antheraxanthin zu isolieren; vermutlich wird das Reaktionsprodukt neben der trans-Form noch sehr geringe Mengen der cis-Verbindung enthalten, da sich in ähnlichen Fällen meistens auch ein Gleichgewicht zwischen den Isomeren einstellt.

Ein weiterer Beweis für die chemische Natur des neuen Carotinoids aus den Staubbeuteln von *Lilium candidum* liegt in der Beobachtung, dass der Farbstoff durch HCl-haltiges Chloroform in Mutatoxanthin umgelagert wird, d. h. in dasselbe furanoide Oxyd, das sich auch durch Umlagerung des gewöhnlichen trans-Antheraxanthins bildet²⁾. Dieses Umlagerungsprodukt haben wir in kristallisiertem Zustand isoliert. Es stimmte im spektralen Verhalten mit Mutatoxanthin völlig überein. Sein Schmelzpunkt (172°) lag noch ca. 4° unter demjenigen des reinsten Mutatoxanthins, hätte sich aber zweifellos um diese Differenz noch erhöhen lassen, wenn wir mehr Substanz dafür hätten einsetzen können.

Bei der Umlagerung des 1,2-epoxydischen cis-Antheraxanthins in das furanoid-oxydische Mutatoxanthin findet somit gleichzeitig Umlagerung der cis- in die trans-Konfiguration statt. Die durchgehende trans-Konfiguration ergibt sich darin erneut als die beständige Form zu erkennen.

Labile cis-Isomere lassen sich bekanntlich häufig durch Bestrahlung teilweise in die Transformen isomerisieren. Wir haben daher untersucht, wie sich cis-Antheraxanthin bei der Bestrahlung mit Ultraviolettlicht verhält. Nach mehrstündiger Bestrahlung in Methanollösung wurde das Pigment wieder in kristallisierter Form isoliert; die Krystalle schmolzen jetzt bei ca. 140° (cis-Antheraxanthin 110°, trans-Antheraxanthin 205°) und die Absorptionsmaxima lagen in Schwefelkohlenstofflösung bei 509, 479 $m\mu$ (trans-Antheraxanthin 510, 480 $m\mu$). Es handelte sich somit um eine Mischung von viel trans- und weniger cis-Antheraxanthin, d. h. die Ultraviolettbestrahlung hatte eine teilweise Umlagerung der cis- in die trans-Form bewirkt.

¹⁾ Die Umlagerung eines cis-Carotinoids in das trans-Isomere durch Jod wurde erstmals beim Isomerenpaar cis- und trans-Bixin beobachtet. *P. Karrer, A. Helfenstein, R. Widmer und Th. B. van Itallie*, *Helv.* **12**, 741, 754 (1929).

²⁾ *P. Karrer und E. Jucker*, *Helv.* **28**, 300 (1945); *P. Karrer und J. Rutschmann*, *Helv.* **27**, 1684 (1944).

Cis- und trans-Antheraxanthin unterscheiden sich in den Absorptionsspektren durch die Verschiebung der Absorptionsmaxima von nur 4—6 $m\mu$ (je nach Lösungsmittel). Diese geringe Differenz deutet darauf hin, dass im cis-Antheraxanthin nur an einer Kohlenstoffdoppelbindung cis-Konfiguration besteht. Stabiles und labiles Bixin, deren Unterschied ebenfalls auf der Konfigurationsänderung an einer Kohlenstoffdoppelbindung beruht¹⁾, zeigen bezüglich der Lage der Absorptionsmaxima analoge Differenzen: stabiles Bixin 526,5, 491 $m\mu$, labiles Bixin 523,5, 489 $m\mu$ (in Schwefelkohlenstoff). — Schwieriger zu beantworten ist die Frage, welche Kohlenstoffdoppelbindung in der Molekel des cis-Antheraxanthins cis-Konfiguration besitzt. Der grosse Unterschied in den Schmelzpunkten des trans-Antheraxanthins (205°) und cis-Antheraxanthins (110°) deutet darauf hin, dass ein sehr wesentlicher Unterschied im Molekelbau der beiden Isomeren bestehen muss. Wir halten es daher für wahrscheinlich, dass der konfigurative Unterschied durch eine Kohlenstoffdoppelbindung bedingt wird, die nicht peripher, sondern zentral in der Kette der konjugierten Doppelbindungen liegt. Vielleicht ist es die mittelständige, zwischen den C-Atomen C¹⁵ und C^{15'} liegende.

Cis-Antheraxanthin ist das erste in der Natur aufgefundene Epoxyd mit cis-Konfiguration. Es ist kaum zu bezweifeln, dass es für die Pflanze eine bestimmte physiologische Bedeutung besitzt; es wird vor allem untersucht werden müssen, ob es beim Befruchtungsvorgang eine Rolle spielt.

Die epiphasischen Pigmente der Staubbeutel von *Lilium candidum* treten der Menge nach gegenüber den hypophasischen stark zurück. Wir versuchten, sie durch mehrmalige Adsorption an Calciumhydroxyd aus Benzollösung zu reinigen. Das Chromatogramm liess stets nur eine, gleichmässig gelb gefärbte Zone erkennen, aus der wir keinen krystallisierten Farbstoff isolieren konnten. Das Carotinoid besass in Schwefelkohlenstoff scharfe Absorptionsmaxima bei 504, 474 $m\mu$. Wenn man zu dieser Lösung eine Spur Jod hinzufügte, trat innerhalb 1—2 Minuten eine Verschiebung der Absorptionsbanden nach 508, 478 $m\mu$ ein. Auf Grund dieser Beobachtung besteht die Möglichkeit, dass im epiphasischen Carotinoid der Staubbeutel von *Lilium candidum* eine cis-Form des α -Carotins vorliegt, womit auch das adsorptive Verhalten im Einklang stände. Sichereres können wir aber darüber noch nicht aussagen, da weder der Farbstoff mit den Absorptionsmaxima 504, 474 $m\mu$ noch derjenige, der sich unter der Jodeinwirkung bildete, krystallisiert erhalten worden ist.

Vorliegende Untersuchung wurde z. T. mit Mitteln aus den Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes ausgeführt, wofür wir unseren besten Dank aussprechen.

Der eine von uns (G.T.) ist dem *Consiglio Nazionale delle Ricerche (Roma)* für ein Stipendium zu grossem Dank verpflichtet.

¹⁾ P. Karrer und U. Solmssen, Helv. **20**, 1396 (1937).

Experimenteller Teil.

Das Ausgangsmaterial zu unserer Untersuchung bestand aus 110 g Staubbeuteln von *Lilium candidum* der Ernte 1947 und 195 g der Ernte 1948. Die Pflanzen waren in Turin gewachsen.

Dieses, im Vakuum getrocknete Pulver haben wir zunächst dreimal mit je 900 cm³ siedendem Petroläther (Sdp. 40–60°) unter Zusatz von etwas CaCO₃ extrahiert (Extrakt I), hierauf einmal mit 800 cm³ Benzol ausgekocht (Extrakt II) und schliesslich im Soxhlet-Apparat mit Methanol erschöpfend ausgezogen (Extrakt III). Dann wurde das pflanzliche Material zweimal mit n. Natronlauge bei Zimmertemperatur extrahiert, der tief gelb gefärbte Extrakt schwach angesäuert, der hierbei gebildete Niederschlag N abzentrifugiert, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

Extrakt I (Petrolätherauszüge). Der Rückstand des Extraktes I wurde mit 5-proz. methanolischer Kalilauge zur Verseifung der Ester eine Stunde im Stickstoffstrom auf 60° erwärmt, hierauf das Reaktionsgemisch mit 200 cm³ Wasser verdünnt und ausgeäthert. Den Ätherextrakt hat man nach dem Waschen und Trocknen verdampft und den carotinoidreichen Rückstand A, wie nachstehend beschrieben, weiter verarbeitet. In der alkalischen wässrigen Phase blieb neben Fettsäuren etwas Farbstoff gelöst; die Flüssigkeit wurde mit Essigsäure angesäuert und mit Äther ausgezogen. Nach dem Verdampfen dieser Ätherlösung blieb ein gelb gefärbter Rückstand B, der noch nicht untersucht wurde.

Der Rückstand A, welcher die Hauptmenge der Carotinoide aus den Staubbeuteln enthielt, wurde in 150 cm³ Petroläther gelöst und durch Zusatz von 90-proz. Methanol eine Trennung in epiphasische und hypophasische Pigmente vorgenommen.

Die hypophasischen Carotinoide haben wir in Benzollösung an einer Säule von Zinkcarbonat chromatographiert (4 × 35 cm; die Säule hatten wir vorher mit Petroläther, der etwas gasförmiges NH₃ gelöst enthielt, durchgewaschen, um vorhandene saure Verunreinigungen, die allenfalls im Zinkcarbonat vorhanden sein könnten, zu neutralisieren). Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte ebenfalls mittels Benzol. Es liess folgende Schichten erkennen:

(oben) Schicht a	gelb	}	sehr schmale Schichten (1–3 mm)	
..	b			gelb
..	c			gelb
..	d			orange
..	e			gelb
Schicht 1	gelb	2 cm	
..	2	orange 0,5 cm	
..	3	gelborange 1 cm	
..	4	orange 4 cm	
..	5	orange 1 cm	
..	6	orange 2 cm	
..	7	orange 0,5 cm	
..	8	gelb 0,2 cm	

Die Elution der einzelnen Schichten erfolgte mit einem Gemisch von Äther und 5% Methanol. Die überwiegende Pigmentmenge fand sich in der Schicht 4.

Der Farbstoff aus der Schicht 4 liess sich direkt aus Methanol krystallisieren, aus dem er sich in langen, feinen, rotgelben Nadeln abschied. Nach dreimaliger Krystallisation aus Methylalkohol lag der Smp. bei 110° im evakuierten Röhrchen (unkorr.) und liess sich nicht weiter steigern. Die Substanz ist das *cis*-Antheraxanthin. Es löst sich leicht in Benzol, Schwefelkohlenstoff, Äther, ziemlich leicht in warmem Methanol, sehr wenig in Petroläther.

C₄₀H₅₆O₃ (584,45) Ber. C 82,1 H 9,6% Gef. C 81,6 H 9,2%

Absorptionsmaxima: in CS₂ 506 476 mμ
 in Benzol 487 457 mμ
 in Äthanol 472 445 mμ

Beim Schütteln einer ätherischen Lösung des cis-Antheraxanthins mit konz. Salzsäure nimmt letztere eine blaue, ziemlich beständige Färbung an.

Über die Einwirkung von Jod und Ultraviolettlicht auf cis-Antheraxanthin wurde schon in der Einleitung zu dieser Abhandlung berichtet.

Die Umwandlung des cis-Antheraxanthins in Mutatoxanthin erfolgte in der für solche Umlagerungen üblichen Weise: die Substanz wurde in Chloroform, das sehr wenig HCl enthielt, gelöst, drei Minuten darin gelassen, hierauf die Chloroformlösung mit verdünnter Natronlauge und Wasser gewaschen, eingedampft und der Rückstand aus Benzollösung an Zinkcarbonat chromatographiert. Die die Absorptionsmaxima des Mutatochroms zeigende Mittelschicht ergab nach der Elution mit Äther-Methanolgemisch ein Pigment, das nach zweimaliger Krystallisation aus Methanol bei ca. 172° schmolz (unkorr., evakuiertes Röhrchen) und in Schwefelkohlenstoff die Absorptionsmaxima des Mutatoxanthins, nämlich 488, 459 m μ besass. Der Smp. des reinsten Mutatoxanthins liegt bei 176—177°, doch stand uns nicht genügend Substanz zur Verfügung, die Schmelzpunktsdifferenz von 4—5°, um die unser Präparat noch zu tief schmolz, durch eine weitere Krystallisation zum Verschwinden zu bringen.

Aus den Schichten 2 und 3 des ersten Chromatogramms konnte nach erneuter Chromatographie ebenfalls etwas krystallisiertes cis-Antheraxanthin abgeschieden werden. Smp. 110°. Absorpt.-Maxima in CS₂: 505, 475 m μ , nach Umlagerung in Mutatoxanthin bei 488, 459 m μ . — Aus einer über dem cis-Antheraxanthin liegenden Farbstoffzone liess sich kein krystallisiertes Pigment gewinnen; wahrscheinlich enthielt sie neben etwas cis-Antheraxanthin Oxydationsprodukte dieses Farbstoffs.

Die Pigmente der Schicht 5 des ersten Chromatogramms versuchten wir durch erneute Chromatographie zu reinigen. Die Gewinnung eines reinen Carotinoids aus diesen mengenmässig geringen Farbstoffanteilen gelang uns aber nicht. Die einzelnen Schichten des zweiten Chromatogramms hatten ziemlich unscharfe Absorptionsspektren; in Schwefelkohlenstoff lagen die Absorptionsmaxima bei 496—499 und 466—469 m μ , nach der Umlagerung mit HCl-haltigem Chloroform bei 486—492 und 452—465 m μ (unscharf). Es handelte sich demnach wenigstens teilweise um Epoxyde. Ob in diesen noch unreinen Fraktionen das cis-Antheraxanthin vom Smp. 110° oder vielleicht auch andere cis-trans-Isomere des Antheraxanthins enthalten waren, kann nicht gesagt werden.

Die Schichten 6 und 7 des ersten Chromatogramms wurden erneut aus Benzol an Zinkcarbonat chromatographiert und in sieben neue Zonen unterteilt. Deren Spektren waren indessen sehr unscharf. Reine Substanzen konnten nicht daraus isoliert werden. Einige dieser Zonen zeigten die Farbreaktion der Epoxyde mit konz. Salzsäure, andere (insbesondere die untersten) nicht.

Zusammenfassung.

In Staubbeuteln von *Lilium candidum* wurde als Hauptpigment ein cis-Antheraxanthin gefunden, das gut krystallisiert, durch chlorwasserstoffhaltiges Chloroform in Mutatoxanthin und durch Jod und Belichtung teilweise in trans-Antheraxanthin übergeführt wird. Es ist das erste in der Natur gefundene Carotinoid-epoxyd mit cis-Konfiguration.

Der epiphasische Carotinoidfarbstoff aus *Lilium candidum* konnte bisher nicht rein und krystallisiert gewonnen werden. Nach seinem Verhalten zu Jod scheint er ebenfalls eine cis-Konfiguration zu besitzen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.