

109. 1,2-Epoxycarotinoide

3. Mitteilung

Isolierung von 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin aus Tomaten

von Daniel Berset¹⁾ und Hanspeter Pfander*

Institut für organische Chemie der Universität Bern, Freiestr. 3, CH-3012 Bern

(22.VIII.83)

1,2-Epoxycarotenoids: Isolation of 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopene from Tomatoes

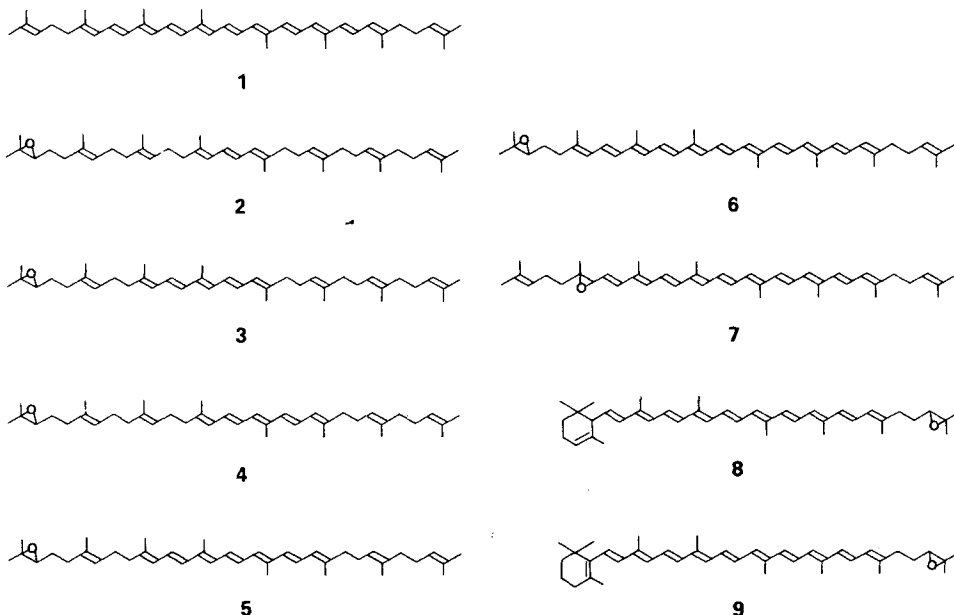
Summary

The optically active 1,2-epoxy-1,2-dihydrolycopene was isolated from tomatoes. Its constitution was established by comparison with the racemic synthetic compound.

1. Einleitung und Problemstellung. – Die Carotinoide aus Tomaten sind schon seit langer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Die Konstitutionsaufklärung von Lycopin (ψ,ψ -Carotin, **1**), welches der Hauptfarbstoff der Tomaten ist, wurde bereits um 1930 von *Karrer et al.* durchgeführt [1]. Der Gehalt und die Zusammensetzung der Carotinoide in Tomaten sind im wesentlichen von der Sorte, den Anbau- und Wachstumsbedingungen sowie dem Reifezustand abhängig [2]. Im allgemeinen gilt, dass die Carotine (Kohlenwasserstoffe) über 90% des Gesamtcarotinoidgehaltes ausmachen. Doch wiesen u. a. bereits *Kuhn & Grundmann* [3] auf Xanthophylle (O-haltige Carotinoide) hin, und sie postulierten Lutein und Zeaxanthin als Hauptkomponenten.

Vor einiger Zeit isolierten *Britton & Goodwin* [4–6] aus Tomaten erstmals Carotinoide, die eine Epoxyfunktion in der acyclischen ψ -Endgruppe aufwiesen. Die vorgeschlagenen Konstitutionen **2–9** stützen sich wegen der geringen Mengen an isoliertem Material (*ca.* 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) lediglich auf UV/VIS- und Massenspektren sowie auf das chromatographische und chemische Verhalten. Mit Ausnahme von **7** gehören alle Verbindungen zu den 1,2-Epoxycarotinoiden, und sie unterscheiden sich einerseits in der Zahl der konjugierten Doppelbindungen und andererseits in der Struktur der zweiten Endgruppe. Die Epoxide von δ - und γ -Carotin (**8** resp. **9**) wurden dabei ausschliesslich aus der δ -Mutante, bei der nicht Lycopin, sondern δ -Carotin als Hauptpigment auftritt, isoliert. Die biologische Bedeutung der 1,2-Epoxycarotinoide ist bisher unbekannt. Immerhin gibt es Hinweise, dass diese Verbindungen nicht Artefakte darstellen, die bei der Isolierung entstehen.

¹⁾ Teil der geplanten Dissertation von *D. Berset*.



Im Hinblick auf den Beweis der postulierten Konstitution haben wir vor kurzem über die Synthesen von racemischen 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin (1,2-Epoxy-1,2-dihydro- ψ,ψ -carotin; (\pm)-**6**), 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- γ -carotin (1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- β,ψ -carotin; (\pm)-**9**) und 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- δ -carotin (1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- ε,ψ -carotin; (\pm)-**8**) [7] [8] berichtet. Das Ziel der von uns begonnenen Arbeiten besteht in der Isolierung mehrerer der 1,2- bzw. 1',2'-Epoxide **2-9** aus einer grösseren Menge von Tomaten sowie in deren Charakterisierung durch hochauflösende $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Im weiteren sollen die chiroptischen Daten der isolierten Verbindungen durch den Vergleich mit den entsprechenden synthetischen, optisch aktiven Farbstoffen [9] die Zuordnung der Konfiguration an den Zentren C(2) bzw. C(2') ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über unsere Befunde für 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin (**6**).

2. Ergebnisse und Diskussion. - Unsere Voruntersuchungen zeigten, dass die von Britton & Goodwin [4-6] angewendete Extraktionsmethode (Zerkleinern des Pflanzenmaterials, mehrmalige Extraktion mit Aceton) keine quantitative Farbstoffextraktion ergab. Die geringe Konzentration der Epoxycarotinoide liessen es zudem angezeigt erscheinen, von einer grösseren Menge von Tomaten auszugehen. Deshalb wurden 190 kg Tomaten vorerst tiefgefroren, anschliessend wieder aufgetaut und das Wasser abgepresst. Die restliche Tomatenpulpe wurde wiederum tiefgefroren, zerkleinert und anschliessend lyophilisiert. Das resultierende rosa gefärbte Material (4,6 kg) wurde gemahlen und mit einem Gemisch von Aceton/Toluol/Petroläther 4:1:1 und $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 1:1 extrahiert. Beiden Gemischen wurde «*tert*-Butylhydroxytoluol» als Antioxydans beigegeben. Durch die beschriebene Methode konnte eine vollständige Extraktion der Carotinoide aus den Tomaten erreicht werden. Nach dem Eindampfen des Extraktes

wurde zwischen $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ verteilt und die organische Phase verseift. Zur weiteren Reinigung wurde der Extrakt zweimal mit *Bio-Beads S-X8* gelchromatographiert (Laufmittel Toluol). Auf diese Weise konnten mengenmässig bis zu 90% der Begleitsubstanzen abgetrennt werden, und es resultierten *ca.* 6 g tiefrotes, honigartiges Material. Die Auftrennung in Carotine, Epoxy- und Monohydroxy- und Dihydroxycarotinoide erfolgte säulenchromatographisch (neutrales Aluminiumoxid, Toluol/Petroläther 1:1). Anschliessend wurde die Epoxidfraktion im DC (Kieselgel; Petroläther/Toluol/EtOH 50:50:6) weiter aufgetrennt, wobei mehrere farbige Zonen beobachtet wurden. Die Hauptzone, die polaritätsmässig dem 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin entsprach (Vergleich mit synthetischem Racemat (\pm)-6 [7]), ergab aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 0,3 mg Kristalle. Vor der Kristallisation zeigte die isolierte Verbindung im HPLC unter verschiedenen Bedingungen identische Retentionszeiten wie das synthetische Racemat (\pm)-6. Insbesondere konnten im System *LiChrosorb SI 60* und Hexan/*tert*-Butylmethyläther/*N*-Äthyldiisopropylamin 100:4:0,1, welches die Abtrennung von (7*Z*)- resp. (7'*Z*)-1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin gestattet [10], keine (*Z*)-Isomeren beobachtet werden. Die spektroskopischen Daten (UV/VIS, $^1\text{H-NMR}$ und MS) der isolierten Verbindung sind in völliger Übereinstimmung mit synthetischem (all-*E*)-1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin [9], insbesondere gibt das 270-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum keinen Hinweis auf (*Z*)-Isomere. Damit kann die von *Britton & Goodwin* postulierte Konstitution des (all-*E*)-1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopins (6) als gesichert gelten. Das CD-Spektrum bei -180° weist ein signifikantes Maximum im nahen UV-Bereich bei 298 nm auf, während im sichtbaren Bereich positive Maxima bei 369, 456, 485, 503 und 522 nm auftreten sowie ein negatives Maximum bei 542 nm. Dieser Kurvenverlauf ergibt den Beweis, dass die isolierte Verbindung kein Racemat darstellt und deshalb als natürliches Produkt angesehen werden kann. Eine eingehende Diskussion der CD-Spektren und der Vergleich mit synthetischem optisch aktivem 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin erfolgt in der folgenden Arbeit [9].

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* sowie der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, Basel, für die Unterstützung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. *H. Mayer* und seiner Gruppe für die anregenden Diskussionen und den Herren Dres. *K. Noack*, *G. Englert* und *W. Vetter* sowie Herrn *W. Meister* für die Aufnahme von Spektren. Ferner danken wir Herrn Dr. *J. P. Pauchard* von der *Eidg. Forschungsanstalt Liebefeld* für die Mithilfe beim Lyophilisieren.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Sämtliche Operationen wurden unter Ar oder N_2 durchgeführt. Die Extrakte wurden bei 5° aufbewahrt. Für die Extraktion wurden Lösungsmittel der Qualität *purum* verwendet; für alle anderen Operationen wurden die Lösungsmittel nach üblichen Methoden [11] vorgereinigt und destilliert. UV/VIS-, $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektren siehe [7]. CD-Spektren mit *Dichrograph II* (Fa. *Jobin-Yvon*); Angabe von Wellenlänge in nm ($\Delta\epsilon$). Lyophilisator Typ *FCFV 750* (Fa. *Secfroid*). EPA = $\text{Et}_2\text{O}/\text{Isopentan}/\text{EtOH}$ 5:5:2

Extraktion. Die 191 kg Freilandtomaten (*Landwirtschaftliche Genossenschaft Ins*) wurden unter N_2 in Plastiksäcke abgefüllt und bei -48° tiefgefroren. Nach dem Auftauen unter N_2 wurden die Tomaten ohne vorgängige Zerkleinerung auf einer Presse bei 100 bar in grobmaschigen Tüchern ausgepresst. Der abgepresste gelbliche Saft (135 kg) wurde verworfen. Die restliche Tomatenpulpe wurde auf Bleche verteilt, bei -48° eingefroren und dann auf einer Mühle auf Kaffeegranatgröße zerkleinert. Das tiefgefrorene Granulat wurde in einem Lyophilisator bei einer Endtemp. von 15° während 2–3 Tagen gefriergetrocknet. Der Druckausgleich am Schluss geschah durch Zuführung von N_2 . Aus der Trocknung resultierten 4,6 kg Granulat (hellrosa) mit einem H_2O -

Gehalt von ca. 5,6%. Das Granulat wurde gemahlen und mit Aceton/Toluol/Petroläther 4:1:1 unter Zugabe von 0,5% «*tert*-Butylhydroxytoluol» (= 2,6-Di(*tert*-butyl)-*p*-cresol; BHT) 6 Std. und dann mit Et₂O/EtOH 1:1 (inkl. BHT) über Nacht extrahiert. Die dunkelrote Flüssigkeit wurde filtriert, i. RV. eingedampft und i. HV. getrocknet (98 g hochvisköses Material).

Reinigung und Trennung. Der Eindampfrückstand wurde in Et₂O aufgenommen und durch Verteilung in Et₂O/H₂O weiter aufgearbeitet, wobei die Et₂O-Phase 10–20mal mit H₂O ausgezogen wurde. Nach der Verseifung in 10% KOH/MeOH während 24 Std. bei RT. und Aufarbeitung erhielt man 70 g rotbraune Masse. Nach 2maliger Gelchromatographie blieben nach dem Eindampfen 6 g trockenes Pulver. Bedingungen für die Gelchromatographie: Säule Typ *Quick Fit*, $d = 4$ cm, $l = 120$ cm; Füllmaterial *Bio-Beads S-X8* (Firma *Biorad*), davon 450 g in 2,5 l Toluol aufschlänmen und 35 Std. quellen lassen; Säule nach dem vorsichtigen Füllen 35 Std. stehen lassen und vor dem Auftragen mit 1,5 l Toluol spülen; Arbeitsdruck ca. 1 bar. Die Vortrennung des Carotinoidgemisches erfolgte säulenchromatographisch an Al₂O₃ (neutral, Akt. 3) mit Petroläther/Toluol 1:1. Die Trennung der Epoxidfraktion erfolgte im DC (Kieselgel *G*, *Merck*, Art. 5721) mit Petroläther/Toluol/EtOH 50:50:6. Bei dieser Trennung wurden 5 Banden beobachtet, wobei diejenige Bande, welche polaritätsmässig mit dem synthetischen 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin übereinstimmte, mengenmässig überwog. Nach der Desorption wurde die Substanz **6** aus CH₂Cl₂/MeOH kristallisiert. UV/VIS und MS: mit [7] übereinstimmend. CD (EPA, –180°): 542,4 (–1,95), 522,5 (9,52), 510,2 (0,32), 503 (2,6), 498,8 (1,59), 484,9 (7,68), 456 (6,30), 369,3 (1,07), 297,7 (–3,28), 254,8 (0,96). ¹H-NMR: mit [7] übereinstimmend, aber keine Signale für (*Z*)-Verbindungen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. Karrer & R. Widmer, *Helv. Chim. Acta* 11, 751 (1928); P. Karrer, A. Helfenstein & R. Widmer, *ibid.* 11, 1201 (1928); P. Karrer & W. E. Bachmann, *ibid.* 12, 285 (1929); P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli & A. Wettstein, *ibid.* 13, 1084 (1930); P. Karrer, A. Helfenstein, B. Pieper & A. Wettstein, *ibid.* 14, 435 (1931).
- [2] K. Herrmann, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 169, 179 (1979).
- [3] R. Kuhn & C. Grundmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 65, 1880 (1932); siehe auch: U. W. Porter & F. P. Zscheile, *Arch. Biochem.* 10, 537 (1946); H. H. Trombly & J. W. Porter, *Arch. Biochem.* 43, 443 (1953); A. L. Curt, *J. Food Sci.* 26, 106 (1961).
- [4] G. Britton & T. W. Goodwin, *Phytochemistry* 8, 2257 (1969).
- [5] A. Ben-Aziz, G. Britton & T. W. Goodwin, *Phytochemistry* 12, 2759 (1973).
- [6] G. Britton & T. W. Goodwin, *Phytochemistry* 14, 2530 (1975).
- [7] H. Pfander, M. Kamber & Y. Battegay-Nussbaumer, *Helv. Chim. Acta* 63, 1367 (1980).
- [8] H. Pfander & M. Kamber, *Helv. Chim. Acta* 63, 1792 (1980).
- [9] M. Kamber, H. Pfander & K. Noack, *Helv. Chim. Acta* 67, 968 (1984).
- [10] M. Kamber & H. Pfander, *J. Chromatogr.*, im Druck.
- [11] R. K. Müller & R. Keese, 'Grundoperationen der präparativen organischen Chemie', Juris Verlag, Zürich, 1981.