

### 39. 1,2-Epoxycarotinoide

6. Mitteilung

#### Isolierung von 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotin aus der 'Delta-Mutanten'-Tomate

von Daniel Berset<sup>1)</sup> und Hanspeter Pfander\*

Institut für Organische Chemie der Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern

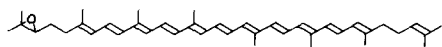
(23.IX.85)

#### 1,2-Epoxycarotenoids

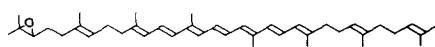
##### Isolation of 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotene from a 'Delta Mutant' Tomato

From 'Delta Mutant' tomatoes, optically active 1',2'-epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotene (**7**) was isolated. According to the CD data, the configuration is 6*R* and presumably 2'*S*.

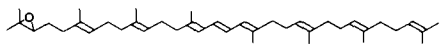
**Einleitung.** – Kürzlich haben wir über die erfolgreiche Isolierung von 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin (**1**) aus handelsüblichen roten Tomaten berichtet [1]. Im Verlaufe dieser Untersuchungen wurde klar, dass die Anwesenheit und die Konzentrationen der acyclischen 1,2-Epoxycarotinoide **1–5**, die erstmals von *Britton* und *Goodwin* [2] [3] beschrieben worden waren, sehr stark sowohl vom jeweiligen Zustand der Früchte (Reifungsgrad) als auch von der Herkunft, der Anbauart und dem Klima abhängig sind. So konnten in den verschiedenen Extrakten von *Lycopersicum esculentum* L., welche im Freiland kultiviert worden waren, teilweise keine 1,2-Epoxycarotinoide oder lediglich das 1,2-Epoxid von Lycopin nachgewiesen werden. Aus einer 'Delta-Mutanten'-Tomate isolierten *Britton*



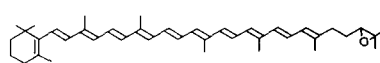
1



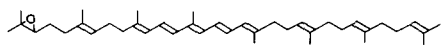
5



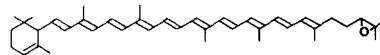
2



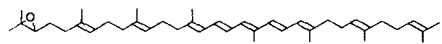
6



3



7



4

<sup>1)</sup> Teil der Dissertation von D. Berset.

und Goodwin [4] zwei 1,2-Epoxyde, welchen sie aufgrund der UV/VIS- und Massenspektren und des chemischen und chromatographischen Verhaltens die Konstitution von 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\beta,\psi$ -carotin (6) und 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\varepsilon,\psi$ -carotin (7) zuordneten. Diese beiden 1',2'-Epoxy-carotinoide konnten in handelsüblichen roten Tomaten bisher nicht nachgewiesen werden. Bei der 'Delta-Mutanten'-Tomate tritt  $\varepsilon,\psi$ -Carotin und nicht Lycopin (=  $\psi,\psi$ -Carotin) als Hauptfarbstoff auf. Die Frucht weist demzufolge eine orange Farbe auf.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die endgültige Aufklärung der Konstitution der aus der 'Delta-Mutanten'-Tomate isolierten Verbindungen 6 und 7 mittels hochauflösender NMR-Spektroskopie und die Ermittlung der Konfiguration dieser Farbstoffe.

**Ergebnisse und Diskussion.** – Die Verarbeitung von 4,4 kg der 'Delta-Mutanten'-Tomaten bis zum Lyophilisat wurde wie in [1] beschrieben vorgenommen. Das orange Material (231 g) wurde mit einem Gemisch von Et<sub>2</sub>O/Aceton/EtOH 1:1:1 unter Zugabe von 2,6-Di(*tert*-butyl)-4-methylphenol (BHT) als Antioxydant extrahiert. Die Schlussextraktion erfolgte mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis zur praktischen Farblosigkeit des Rückstandes. Nach Eindampfen des Extraktes wurde zwischen Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O verteilt und die org. Phase verseift. Der gereinigte Extrakt wurde darauf in warmem MeOH gelöst, in der Kälte stehen gelassen und das ausgefallene Carotinoid-Gemisch abfiltriert. Die Auftrennung in Carotine, Epoxy- und Monohydroxy-/Dihydroxycarotinoide erfolgte säulenchromatographisch (neutrales Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Toluol/Petrolether 1:1). Die Epoxidfraktion wurde hierauf mittels DC (Kieselgel, Petrolether/Toluol/EtOH 50:50:3) weiter aufgetrennt, wobei zwei farbige Zonen beobachtet wurden. Das Gemisch wurde dann mittels HPLC auf Umkehrphase (RP-18) getrennt (Fig. 1). Neben 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin (1) konnte über-

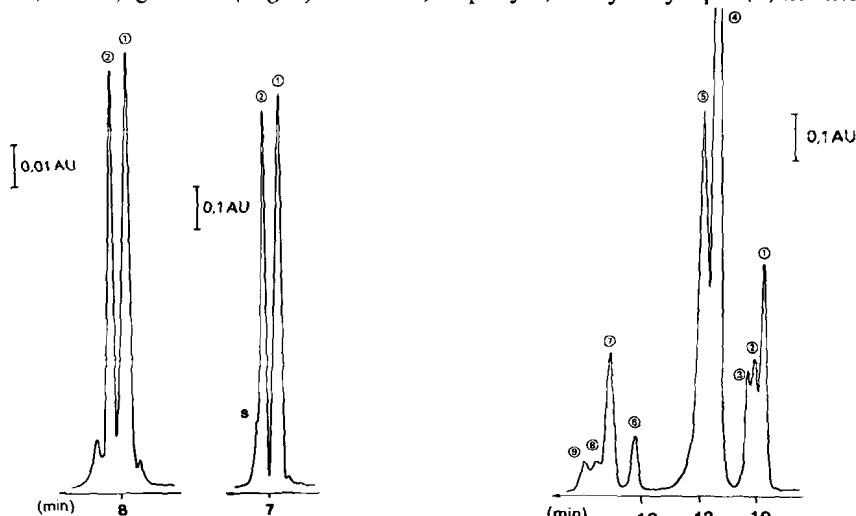


Fig. 1. HPLC-Trennung der 1,2-Epoxy-carotinoide. A: Spherisorb ODS 5  $\mu$ m, 100% CH<sub>3</sub>CN, 1,8 ml/min; Detektion: 480 nm. B: Spherisorb ODS 2 5  $\mu$ m, CH<sub>3</sub>CN/EtOAc 3:2, 0,9 ml/min; Detektion: 480 nm, 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopin ①, 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\varepsilon,\psi$ -carotin ②.

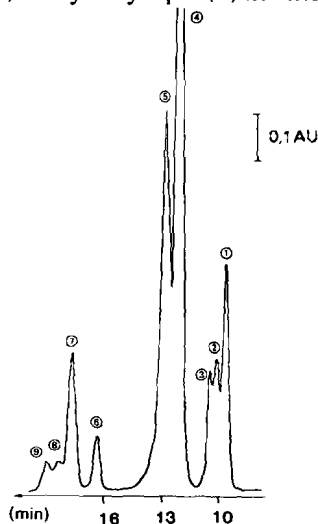


Fig. 2. HPLC-Trennung der Carotenwasserstoffe. Spherisorb ODS 5  $\mu$ m, EtOAc/CH<sub>3</sub>CN 1:4, 1,5 ml/min; Detektion: 450 nm; (all-*E*)-Lycopin ①, (*Z*)-Isomere von (all-*E*)-Lycopin ②, ③, (all-*E*)- $\varepsilon,\psi$ -Carotin ④, (*Z*)-Isomere von (all-*E*)- $\varepsilon,\psi$ -Carotin ⑤, (all-*E*)- $\beta,\varepsilon$ -Carotin ⑥, (all-*E*)- $\beta,\beta$ -Carotin ⑦, (*Z*)-Isomere von (all-*E*)- $\beta,\beta$ -Carotin ⑧, ⑨.

raschenderweise nur 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotin (**7**) gefunden werden, während sich 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\beta,\psi$ -carotin (**6**) nicht nachweisen liess. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigte die Analyse der aus der 'Delta Mutanten' isolierten Carotine mittels HPLC [5] die Abwesenheit von  $\beta,\psi$ -Carotin, welches als mögliche Vorstufe von **6** in Frage kommt (Fig. 2). Die spektroskopischen Daten des isolierten 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopins (**1**) stimmen mit denjenigen der synthetischen, optisch aktiven (all-*E*)-Verbindung überein [6]. Im 360-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des natürlichen 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotins (**7**; Fig. 3) erkennt man u.a. die charakteristischen Signale der terminalen  $\epsilon$ -Endgruppe, und zwar die geminalen  $\text{CH}_3$ -Gruppen an C(1) bei 0,82 und 0,90 ppm, H-C(4) bei 5,41 ppm und H-C(6) bei 2,18 ppm, während das Signal des Epoxyprotons H-C(2') erwartungsgemäss bei 2,73 ppm auftritt. Damit kann die von Britton und Goodwin postulierte Konstitution von **7** bestätigt werden. Das CD-Spektrum von **7** (Fig. 4) zeigt den typischen nicht-konservativen Charakter. Alle signifikanten Cotton-Banden weisen sowohl bei RT. als auch bei  $-160^\circ$  positive  $\Delta\epsilon$ -Werte auf. Wie im Falle des natürlichen 1,2-Epoxy-1,2-dihydrolycopins (**1**) zeigt auch das CD-Spektrum von **7** eine ausgesprochene Temperaturabhängigkeit, indem die Intensitäten der Cotton-Banden beim Kühlen sowohl im UV- als auch im VIS-Bereich deutlich zunehmen. Ein Vergleich des CD-Spektrums von **7** mit dem von isoliertem

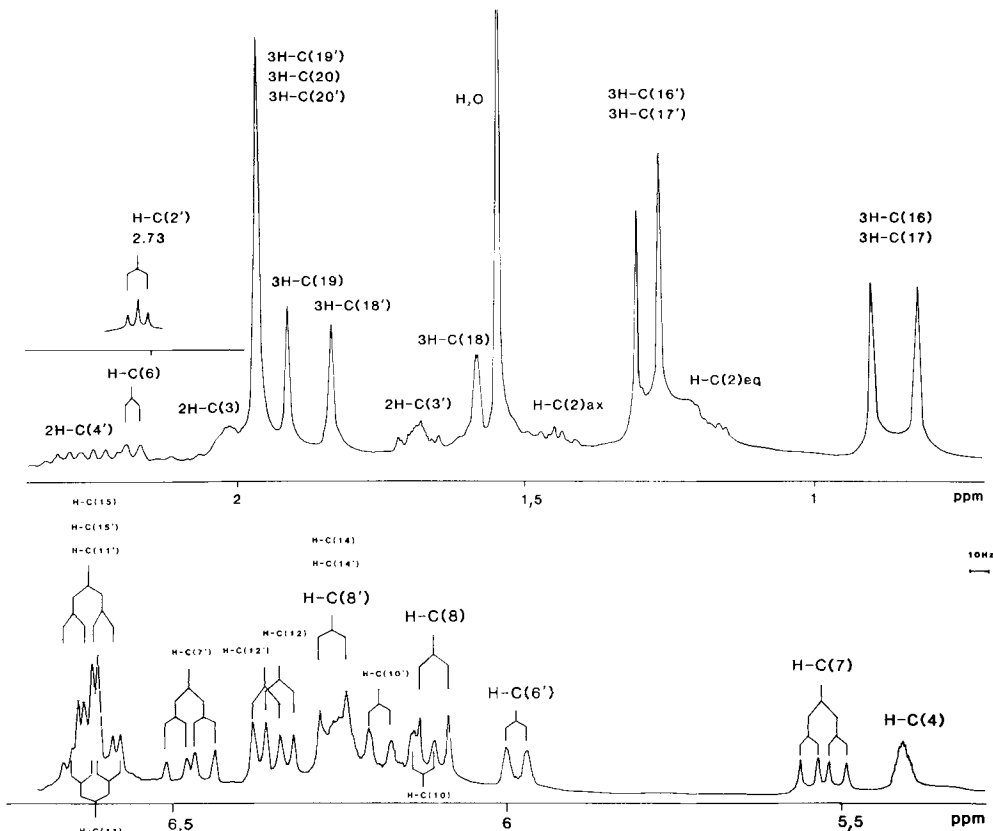


Fig. 3. 360-MHz- $^1\text{H-NMR}$  von 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotin (**7**)

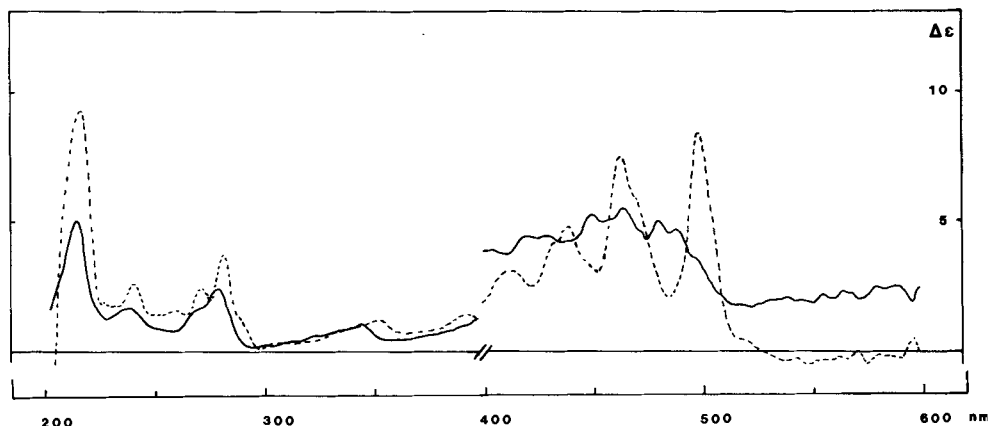


Fig. 4. CD-Spektrum von 1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon,\psi$ -carotin (7) in EPA (= Et<sub>2</sub>O/Isopentan/EtOH 5:5:2).  
— RT.; - - - - -160°.

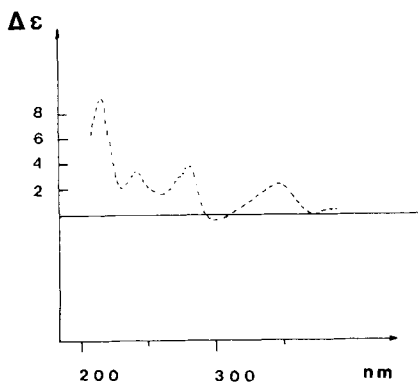


Fig. 5. CD-Spektrum von natürlichem (+)- $\epsilon,\psi$ -Carotin in Dioxan [7]

(+)- $\epsilon,\psi$ -Carotin [7] zeigt gute Übereinstimmung (Fig. 5). Daraus kann auch für 7 die (R)-Konfiguration an C(6) abgeleitet werden. Das asymmetrische Zentrum C(2') scheint auf das CD-Spektrum keinen Einfluss zu haben, da dieses im Vergleich zum Zentrum C(6) weit vom Konjugationssystem entfernt ist. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der Tatsache, dass der CD von optisch aktiven 1,2- resp. 1',2'-Epoxy-carotinoiden relativ schwach ist [6] [8]. In Analogie zum natürlichen 1,2-Epoxid von Lycopin wird für C(2') von 7 die (S)-Konfiguration vorgeschlagen.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sowie der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, für die Unterstützung der Arbeit. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Noack und Herrn W. Meister für die Aufnahme der CD- und Massenspektren. Ferner danken wir den Herren Thommen und Brauchli von der Firmenich SA, Genf, für die Aufnahme der 360-MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren.

#### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Sämtliche Operationen wurden unter Ar oder N<sub>2</sub> durchgeführt. Die Extrakte wurden bei 4° aufbewahrt. Für die Extraktion wurden Lsgm. der Qualität *purum* verwendet. Für alle anderen Operationen wurden die Lsgm. nach üblichen Methoden [9] vorgereinigt und destilliert. Weitere exper. Details sind in [10] beschrieben. CD-Spektren: *Dichrograph II* (Fa. Jobin-Yvon); Angabe von  $\lambda$  in nm ( $\Delta\epsilon$ ).

*Ausgangsmaterial und Extraktion.* Samen der 'Delta-Mutanten'-Tomate<sup>2)</sup> wurden in kleine Torfmüllgefäße mit Anzuchtsubstrat bei RT. zur Keimung gebracht. Nach 8 Wochen wurden die Jungpflanzen in einem Garten in Bern angepflanzt. Als Schutz vor Nässe wurden die Pflanzenbeete mit einem Plastikdach überdeckt. Die 4,4 kg orangen Tomaten wurden über Nacht bei  $-20^{\circ}$  tiefgefroren, dann wieder aufgetaut und die freigewordene, gelbe H<sub>2</sub>O-Schicht abdekantiert. Die so stark geschrumpften Früchte wurden hierauf im Mixer zerkleinert, in grobmaschigen Tüchern ausgepresst, wieder tiefgefroren und während 4 Tagen lyophilisiert. Das Trockengranulat (231 g) wurde zuletzt gemahlen und mit Et<sub>2</sub>O/Aceton/EtOH 1:1:1 unter Zugabe von 0,5% BHT 6 h ein 1. Mal extrahiert und danach über Nacht ein 2. Mal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, welches vorgängig an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (basisch, Akt. 1) von Säurespuren befreit worden war. Der noch leicht gefärbte Rückstand wurde mit Et<sub>2</sub>O farblos gewaschen. Die tieforangenen Flüssigkeiten wurden jeweils filtriert, i. RV. eingedampft und i. HV. getrocknet.

*Reinigung und Trennung.* Der Eindampfungsrückstand wurde in Et<sub>2</sub>O aufgenommen und durch Verteilung in Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O weiter aufgearbeitet, wobei die Et<sub>2</sub>O-Phase 10mal mit H<sub>2</sub>O ausgezogen wurde. Nach der Verseifung in 10proz. KOH/MeOH während 24 h bei RT. wurde wie oben aufgearbeitet. Der gereinigte Extrakt wurde darauf im warmem MeOH gelöst und 12 h bei  $-18^{\circ}$  stehen gelassen. Die ausgefallenen Carotinoide (Carotine und Carotinoide-Epoxide) wurden mit einer G4-Glasfilternutsche abfiltriert. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Ausfällung mehr eintrat. Die Vortrennung des Carotinoide-Gemisches erfolgte säulenchromatographisch an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (neutral, Akt. 3) mit Petrolether/Toluol 1:1 mit steigendem Toluolgehalt bis 100%. Die Eluierung der Carotinoide-Epoxide erfolgte mit Toluol/Et<sub>2</sub>O 9:1. Die Trennung der Epoxidfraktion erfolgte mittels DC (Kieselgel G, Merck, Art. 5721) mit Petrolether/Toluol/EtOH 50:50:3. Die beiden Hauptbanden wurden darauf mit HPLC getrennt. Bedingungen siehe Fig. 1 (bei ODS 2 handelt es sich um eine Stationärphase, die gegenüber ODS eine höhere Besetzung der freien OH-Gruppen mit Octadecylketten besitzt (12%)).

(*all-E,S*)-1,2-Epoxy-1,2-dihydro- $\psi$ , $\psi$ -carotin (1). Die UV/VIS-, MS-, <sup>1</sup>H-NMR-, und CD-Daten sind in Übereinstimmung mit [6].

(*all-E,6R,2'S*)-1',2'-Epoxy-1',2'-dihydro- $\epsilon$ , $\psi$ -carotin (7). Im HPLC zeigte die Verbindung im System A (Fig. 1) identische Retentionszeiten wie die synthetische racemische Verbindung ( $\pm$ )-7. UV/VIS (Hexan): 488, 458, 432, 280. CD (EPA,  $-160^{\circ}$ ): 580 (8,4), 464 (7,5), 440 (4,8), 413 (3,1), 392 (1,9), 394 (1,5), 353 (1,2), 283 (3,8), 273 (2,5), 260 (1,6), 242 (2,6), 217 (9,3). CD (EPA, RT.): 489 (4,7), 486 (4,5), 481 (5,0), 475 (4,4), 465 (5,5), 438 (4,2), 429 (4,5), 411 (3,7), 400 (1,3), 345 (1,0), 280 (2,4), 240 (1,7), 216 (5,1). <sup>1</sup>H-NMR (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,82, 0,90 (2s, CH<sub>3</sub>(16), CH<sub>3</sub>(17)); 1,15–1,21 (m, H<sub>eq</sub>-C(2)); 1,27, 1,31 (2s, CH<sub>3</sub>(16'), CH<sub>3</sub>(17')); 1,40–1,48 (m, H<sub>ax</sub>-C(2)); 1,58 (d, J = 1,5, CH<sub>3</sub>(18)); 1,64–1,74 (m, CH<sub>2</sub>(3')); 1,84 (s, CH<sub>3</sub>(18')); 1,91 (s, CH<sub>3</sub>(19)); 1,96 (s, CH<sub>3</sub>(19'), CH<sub>3</sub>(20), CH<sub>3</sub>(20')); 1,99–2,04 (m, CH<sub>2</sub>(3)); 2,18 (d, J = 9, H-C(6)); 2,20–2,32 (m, CH<sub>2</sub>(4')); 2,73 (t, J = 6,5, H-C(2')); 5,41 (m, H-C(4)); 5,53 (dd, J = 9,5, 15, H-C(7)); 5,99 (d, J = 11, H-C(6')); 6,11 (d, J = 15, H-C(8)); 6,13 (d, J = 11, H-C(10)); 6,19 (d, J = 11, H-C(10')); 6,22–6,29 (m, H-C(14), H-C(14')); 6,24 (d, J = 15, H-C(8')); 6,34 (d, J = 15, H-C(12)); 6,36 (d, J = 14, H-C(12')); 6,48 (dd, J = 11, 15, H-C(7')); 6,62 (dd, J = 11, 15, H-C(11)); 6,63 (dd, J = 11, 15, H-C(11')); ca. 6,64 (m, H-C(15), H-C(15')). MS: 552 (80, M<sup>+</sup>), 534 (5, M<sup>+</sup> - 18), 496 (2, M<sup>+</sup> - 56), 460 (8), 446 (5), 429 (2), 197 (20), 159 (20), 157 (40), 145 (56), 143 (38), 133 (40), 131 (24), 123 (51), 121 (32), 119 (61), 109 (30), 107 (42), 105 (63), 95 (39), 93 (48), 91 (53), 83 (33), 81 (72), 79 (31), 71 (40), 69 (65), 67 (28), 57 (43), 55 (82), 43 (100), 41 (74).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Berset, H. Pfander, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 964.
- [2] G. Britton, T. W. Goodwin, *Phytochemistry* **1969**, *8*, 2257.
- [3] A. Ben Aziz, G. Britton, T. W. Goodwin, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2759.
- [4] G. Britton, T. W. Goodwin, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2530.
- [5] H. Pfander, H. Schurtenberger, V. R. Meyer, *Chimia* **1980**, *34*, 179.
- [6] M. Kamber, H. Pfander, K. Noack, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 968.
- [7] R. Buchecker, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 327.
- [8] C. Arm, H. Pfander, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 1540.
- [9] R. K. Müller, R. Keese, 'Grundoperationen der präparativen organischen Chemie', Juris Verlag, Zürich, 1981.
- [10] H. Pfander, M. Kamber, Y. Battegay-Nussbaumer, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 1367.

<sup>2)</sup> Wir danken Herrn Dr. G. Britton, University of Liverpool, Liverpool, für die Überlassung der Samen.