

51. Struktur der Valencixanthine und Valencichrome

von Edith Märki-Fischer und Conrad Hans Eugster*

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich

(17.I.90)

Structure of the Valencixanthins and Valencichromes

Valencixanthin, a carotenoid first isolated from *Californian Valencia* orange juice in 1952/1954 by American scientists, was re-isolated from fresh Spanish 'Navelinas' and shown, by spectroscopical and chiroptical examination, to have the unexpected (9Z)-10'-apo-11',12'-dihydroviolaxantin-10'-ol structure **6**. A further, very minor component represents the (all-E)-structure **7**. Therefore, the valencichromes are the furanoid rearrangement products of **6** and **7** and, thus, stereoisomers of the 10'-apo-11',12'-dihydroauroxanthin-10'-ols **8**. Valencixanthin represents a modification of the common cleavage of carotenoids in higher plants according to the scheme $C_{40} \rightarrow C_{27} + C_{13}$, insofar as the reduction step not only includes the aldehyde function but also the subsequent conjugated double bond.

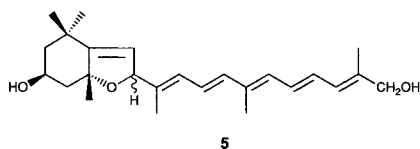
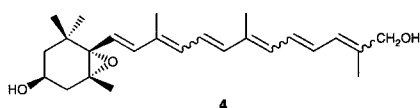
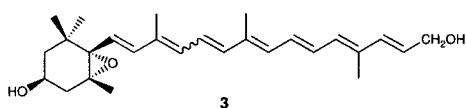
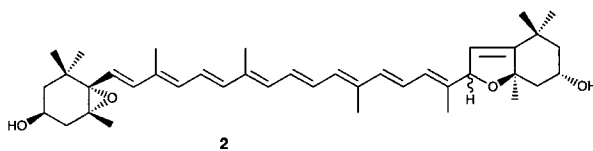
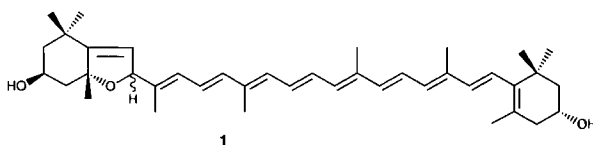
Einleitung. – *Natarajan* und *Mackinney* entdeckten 1952 im Saft von californischen *Valencia Orangen* ein neues Carotinoïd mit der kurzwelligen Absorption bei 350, 369, 390 nm in Hexan [1]. Zwei Jahre später gelang es *Curl* und *Bailey* [2], das komplizierte Gemisch der Carotinoïde aus demselben Ausgangsmaterial durch *Craig*-Verteilung und Säulenchromatographie an MgO zu trennen und mehrere bis dahin nicht bekannte Carotinoïde, nämlich die *Mutatoxanthine* a und b, die *Luteoxanthine* a und b und ein (Z)-*Luteoxanthin*, das *Sinensixanthin*, sowie zwei weitere, welche sie *Valencixanthin* und *Valencichrom* nannten, zu isolieren. Bei Valencixanthin wiesen sie auf die wahrscheinliche Identität mit dem unbekanntem, in [1] beschriebenen Farbstoff hin. Später fanden sie, dass zwei Valencichrome mit gleichen Elektronenspektren vorkommen.

Seither sind nicht nur die Konstitutionen der genannten Verbindungen, mit Ausnahme von Valencixanthin und Valencichrom, sondern in neuester Zeit auch die Strukturen geklärt worden: *Mutatoxanthin*, ein Gemisch der C(8)-Epimeren, hat Struktur **1** [3]. Den *Luteoxanthinen* kommt Struktur **2** zu [4]. *Sinensixanthin* hat Struktur **3** [5][6].

Valencixanthin und Valencichrom sind unseres Wissens seit ihrer Entdeckung strukturell nicht mehr bearbeitet worden. Sie werden in der Literatur auch kaum erwähnt¹⁾, obschon ihre Verbreitung in verschiedenen Früchten ziemlich gut belegt ist²⁾. Sämtliche Angaben darüber stammen von den ursprünglichen Entdeckern.

¹⁾ In [7–9] nicht erwähnt, in [10–12] unter 'unknowns', in [13][14] mit unvollständigen Angaben über Vorkommen.

²⁾ In Saft und Schale von *Valencia Orangen* aus Californien [1][2]; Vorkommen von zwei Valencichromen [15][16]; in Mandarinen (tangerine; *Citrus reticulata* cv.) [17]; 'ruby red grapefruit' (*Citrus paradisi* cv.) [18]; in Kaki (japanese persimmon; *Diospyros kaki* cv.) [19]; *Navel Orangen* [20]; Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) [21]; Feigen [21].



Konstitution von Valenciaxanthin und Valenciachrom. – Aufgrund der UV-Spektren erkannten *Curl* und *Bailey* die Anwesenheit von sechs konjugierten (C=C)-Bindungen im Valenciaxanthin und seine säurekatalysierte Umlagerung in das furanoide Valenciachrom mit fünf konjugierten (C=C)-Bindungen. Daraus schlossen sie auf eine (C(5)–C(6))-Epoxy-Gruppe. Aus der Polarität der Verbindungen im Verteilungs- und Chromatographie-Verhalten konnten sie auf die Anwesenheit von mindestens zwei OH-Funktionen schliessen [1][22]. Erkannt wurde ferner eine auffällige gelborange Fluoreszenz im UV von Valenciaxanthin und einer hellgrünen von Valenciachrom. Dies entsprach genau, wie ebenfalls bemerkt wurde, dem Verhalten von Persicaxanthin und Persicachrom aus gelb fleischigen Pfirsichen [23]. Die Verschiedenheit dieser Verbindungspare ergab sich aus dem chromatographischen Verhalten: Valenciaxanthin haftet deutlich stärker als Persicaxanthin. Diese Beobachtungen dürften *Gross* und *Eckardt* später bewegen haben, anzunehmen, dass Valenciaxanthin ein (*Z*)-Isomeres von Persicaxanthin darstelle [24].

Bei der erneuten Untersuchung der Persicaxanthine und Persicachrome aus Pfirsichen [25] bestätigten wir die Strukturen von **4** und **5**, konnten aber keine Identität von Valenciaxanthin mit den aufgefundenen Stereoisomeren von **4** feststellen. Da wir aber kein (9Z)-Persicaxanthin fanden, blieb die wahre Natur von Valenciaxanthin weiterhin ungeklärt. Dies bot uns Anlass, eine erneute Isolierung dieser Verbindung zu versuchen.

Isolierung und Strukturaufklärung von Valenciaxanthin. – Da uns keine californischen Valencia-Orangen zur Verfügung standen, extrahierten wir frische 'Navelinas' spanischer Herkunft und erhielten nach Verseifung und einer SC-Trennung an Kieselgel eine im UV₃₆₆ gelborange fluoreszierende Zone, welche aus ca. 90% Sinensiaxanthin/Sinensiachrom bestand. Die weitere Anreicherung der Nebenkomponenten gelang durch DC an desaktivierten Kieselgel-Platten; HPLC dieser angereicherten Fraktion, s. Fig. 1.

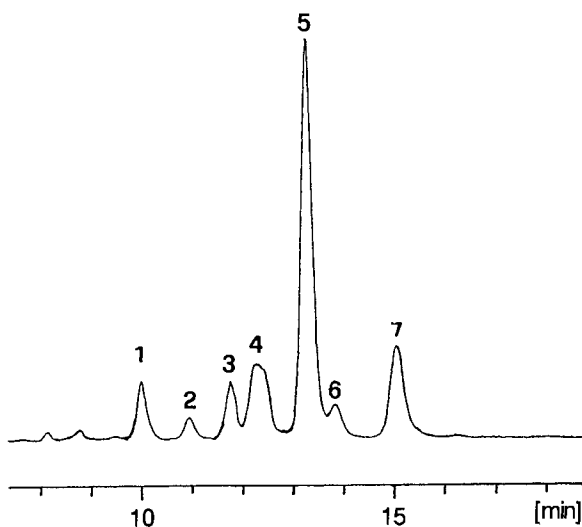


Fig. 1. HPLC einer mit Valenciaxanthinen angereicherten Fraktion

Mischchromatogramme mit stereoisomeren Persicaxanthinen zeigten, dass zwar (all-*E*)-Persicaxanthin mit Pik 1 cochromatographierte, dass aber die (9Z,13Z)-, (13Z)- und (15Z)-Isomeren deutlich grössere t_R -Werte aufwiesen als der Pik 5. Die reinen Valenciaxanthine wurden schliesslich aus den Piken 1 und 5 durch präparative HPLC gewonnen.

Aus den UV-Daten der Verbindungen am Pik 1 und 5 (s. Fig. 2) konnte in Übereinstimmung mit [2] auf einen Chromophor mit sechs konjugierten (C=C)-Bindungen geschlossen werden. Mit HCl/CHCl₃ trat die erwartete Umlagerung zu einem Produkt mit λ_{\max} 328, 345, 365 nm ein. Aufgrund einer stufenweise erfolgten Acetylierung wurden mindestens zwei acetylierbare OH-Gruppen nachgewiesen. Der naheliegende Schluss auf das Vorliegen eines Apoviola-xanthols wurde durch die CD-Kurven bestätigt (Fig. 3):

Substanz aus Pik 1 zeigt einen fast deckungsgleichen Verlauf mit (*all-E*)-Persicaxanthin (s. zum Vergleich die Kurve 6 in [25]), Substanz aus Pik 5 ist andererseits chiroptisch sehr nahe verwandt mit (*9Z,13'Z*)-Persicaxanthin (s. Fig. 6 in [25]), mit Ausnahme des Bereiches um 270 nm. Hier verlaufen die Kurven mit entgegengesetztem Vorzeichen. Wir hatten in [25] allerdings die Vermutung geäußert, dass ausgeprägte Neigung von (*9Z,13'Z*)-Persicaxanthin zur Stereomutation die Ursache für das Auftreten einer negativen Bande in diesem Bereich sein könnte. Im Gegensatz dazu zeigte die Substanz aus Pik 5 diese Neigung zur Stereomutation in verdünnter Lösung kaum oder in sehr viel geringerem Ausmass.

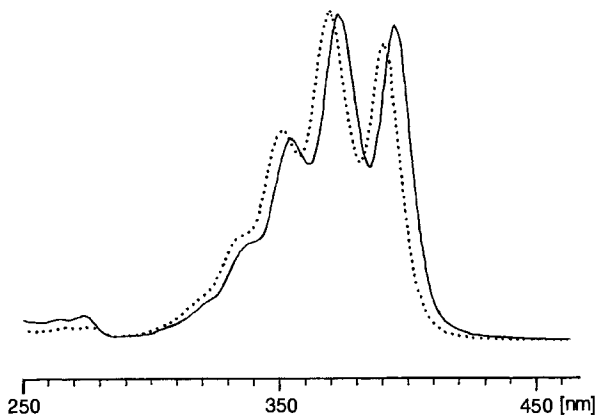


Fig. 2. UV-VIS-Spektren (qual. im HPLC-Lsgm.) von (*9Z*)-Valencixanthin aus Pik 5 (.....) und von (*all-E*)-Valencixanthin aus Pik 1 (—)

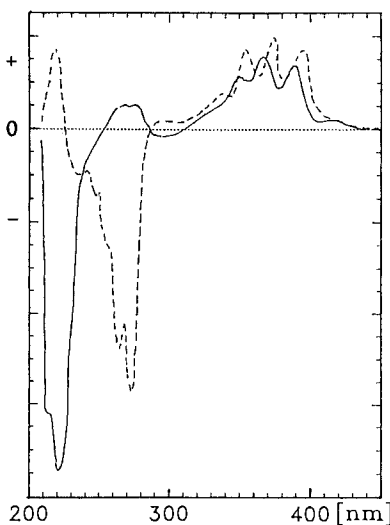


Fig. 3. CD-Spektren (qual. in EPA) von (*9Z*)-Valencixanthin (—) und von (*all-E*)-Valencixanthin (- - -)

Alle diese Beobachtungen liessen das Vorliegen eines (9Z)-Persicaxanthins immer noch als möglich erscheinen. Im CI-MS trat aber anstelle des erwarteten $[M + 1]^+$ -Piks (m/z 385) ein solcher von m/z 413 auf. Die Unterbringung von C_2H_4 konnte mit dem 1H -NMR-Spektrum gelöst werden: einerseits folgte daraus die Violaxanthin-Teilstruktur mit einer (9Z)-konjugierten (C=C)-Bindung aus der Übereinstimmung mit den Signalen von (9Z)-Sinensiaxanthin (3), andererseits fiel sofort das Fehlen der allylischen OH-Gruppe auf (s. z. B. [26]). An ihrer Stelle wurde ein relativ komplizierter Signalkomplex gefunden mit einem *triplett*-artigen Signal bei 2,16, einem *quintett*-artigen bei 1,74, sowie einem weiteren *triplett*-artigen bei 3,66 ppm (s. Fig. 4). Mit Einstrahlungs- und Entkopplungsexperimenten liess sich der Signalkomplex als ABM_2X_2 -Spinsystem deuten. Ein solches hatten wir vor kurzem für Fredericon B gefunden [27]. Tatsächlich ist die Erscheinungsform der Signale in beiden Fällen sehr ähnlich.

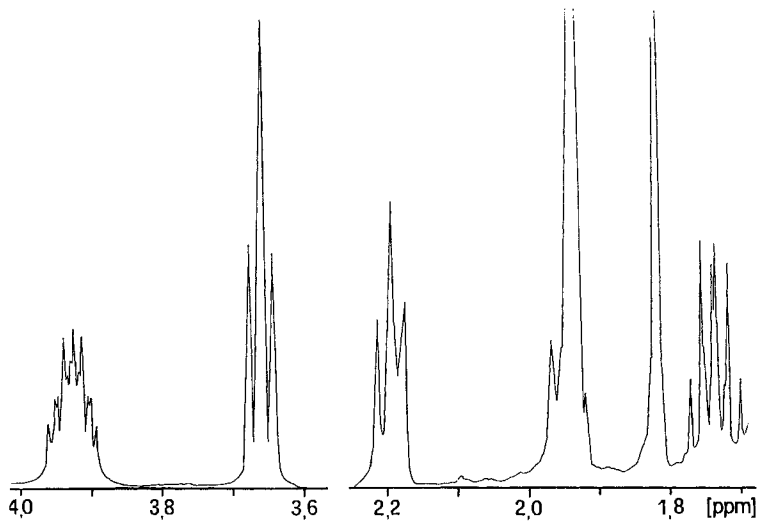
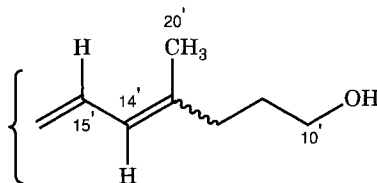


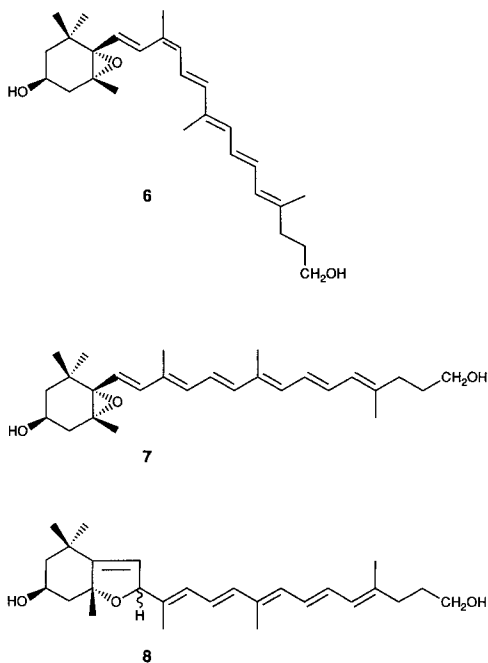
Fig. 4. Ausschnitte aus dem 1H -NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz) von (9Z)-Valencixanthin

Daraus folgt nun, dass die Verbindung aus Pik 5 kein (9Z)-Persicaxanthin darstellt, das weiterhin unbekannt bleibt, sondern eine C_{27} -Verbindung mit einer 3-Hydroxypropyl-Endgruppe sein muss:



Dabei bildet 2 H-C(12') den AB-Teil (2,16 ppm, $^3J = 7,5$), 2 H-C(11') den M_2 -Teil (1,74 ppm, $^3J = 6,5$ und $7,5$) und 2 H-C(10') den X_2 -Teil (3,66 ppm, $^3J = 6,5$). Die Konfiguration der (C(13)=C(14))-Bindung liess sich mit einem NOE-Experiment klären. Einstrahlen auf CH₃(20') bewirkte eine Signalerhöhung von H-C(15'), während H-C(14') keine solche zeigte. Daraus folgt die (*E*)-Konfiguration der endständigen (C=C)-Bindung.

Daher ergibt sich, dass die Verbindung aus Pik 5 des HPLC Struktur **6** des (9*Z*)-11',12'-Dihydrosinensiaxanthins bzw. (9*Z*)-10'-Apo-11',12'-dihydroviolaxanthin-10'-ols (= (1'*S*,2'*R*,4'*S*,9*Z*)-15-(1',2'-Epoxy-4'-hydroxy-2',6',6'-trimethylcyclohexyl)-4,9,13-trimethylpentadeca-4,6,8,10,12,14-hexaenol) besitzt. Die Nebenkomponente aus Pik 1, von der kein NMR-Spektrum aufgenommen werden konnte, weist sehr wahrscheinlich die (all-*E*)-Struktur **7** auf.

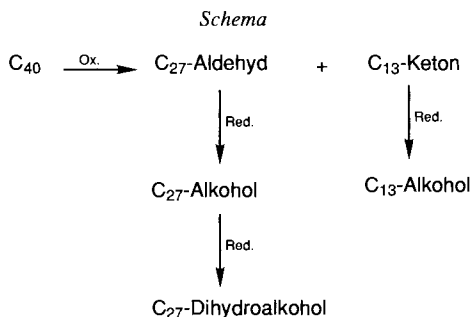


Die von uns nicht isolierten *Valenciachrome* sind demnach Stereoisomere der Struktur **8**, mit Isomerie an C(8) und wohl auch an den (C=C)-Bindungen an C(9) oder C(13) oder C(15) entsprechend der bei Violaxanthinen, Luteoxanthinen und Auroxanthinen beobachteten Verhältnisse.

Die Identität unserer Verbindungen aus den Piken 1 und 5 des HPL-Chromatogramms mit Valenciaxanthin von *Curl* und *Bailey* kann heute nicht mehr durch einen direkten Vergleich gesichert werden. Sie ist aber aufgrund des Vorkommens, der Spektren und der Fluoreszenz doch sehr wahrscheinlich. In Übereinstimmung mit den Befunden in [2] fanden wir neben **6** und **7** in den 'Navelinas' kein Persicaxanthin, und in Mandarinen

ebenfalls **6**, **7** und **8**. ‘Shamouti-Orangen’ (Israel) enthielten keine Valenciaxanthine und Valenciachrome, hingegen konnten diese in ‘Sanguinellas’ aus Spanien nachgewiesen werden.

Die Valenciaxanthine und die Valenciachrome sind wie die Sinensiaxanthine Abbauprodukte von Violaxanthin oder Antheraxanthin. Sie bilden sich nach dem in Früchten, Blüten, *etc.* weitverbreiteten Abbauschema (*Schema*).



Die Reduktion des C_{27} -Aldehyds dürfte wohl nach dem Typus einer 1,4-Hydrid-Addition mit nachfolgender 1,2-Reduktion der (C=O)-Gruppe erfolgen.

Es ist unseres Wissens das erste Mal, dass ein solcher Carotinoid-Typus in Pflanzen entdeckt worden ist.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. *Umberto Piantini* aus der NMR-Gruppe von Prof. *W. v. Philipsborn* für seine Hilfe bei der Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren und Herrn *N. Bild* für Massenspektren.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [26].

1. Extraktion. Frische ‘Navelinas’ (10 kg) spanischer Herkunft, Ernten 1987 und 1988, wurden geschält, dann halbiert und unter Zugabe von CaCO_3 -Pulver und ges. NaHCO_3 -Lsg. mit dem Stabmixer homogenisiert. Nach der Filtration durch Gaze wurde das wässr. Filtrat mit Et_2O extrahiert und der Filterkuchen mit Aceton/MeOH 17:3 bis zur Farblosigkeit extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Teilvakuum eingedampft, der erhaltene Rückstand mit 10% KOH in MeOH bei RT. über Nacht verseift. Nach üblicher Aufarbeitung erhielten wir 170 mg Rohcarotinoide, die ein fast sauberes Violaxanthin-Spektrum ergaben. Bei allen Aufarbeitungsschritten wurde Tageslicht vermieden und möglichst rasch gearbeitet. Wo möglich wurde unter N_2 gearbeitet.

2. Trennungen. Das Rohcarotinoid-Gemisch wurde an 4×25 cm Kieselgel (*Merck* 40–63 μ) mit Hexan/Aceton (9:1)- bis (5:5)-Gemisch, das zusätzlich 0,05% (i-Pr) $_2$ NEt enthielt, vorgentrennt und die im UV_{366} gelb-orange fluoreszierende Zone isoliert. Ausbeute an hellgelbem Öl: 10 mg. Nach HPLC lagen vor allem Sinensiachrome vor. Eine weitere Anreicherung wurde auf Kieselgel-Platten (*Merck*, 0,5 mm) mit Hexan/Aceton/MeOH 30:20:1 erreicht. Für HPLC dieser Anreicherungsstufe s. *Fig. 1* (Pik 2 = Violaxanthin, Pik 3 = Sinensiaxanthin, Pik 4 = Sinensiachrom, Pik 6 = (9Z)-Sinensiaxanthin, Pik 7 = (9Z)-Violaxanthin).

Präp. HPLC-Trennung an *Spherisorb S-5 μ CN* (4,6 \times 250 mm) mit A (= Hexan mit 0,1% (i-Pr)₂NEt) und B (= CH₂Cl₂/2% MeOH), wobei A/B = 33:17, flow 1,5 ml/min. Ausbeuten: ca. 0,1 mg (all-*E*)-Valencixanthin als hellgelbes Öl aus Zone 1; 1 mg (9*Z*)-Valencixanthin als hellgelbes Öl aus Zone 5.

3. *Mikroteste*: nach bekannten Standardverfahren.

4. *Spektraldaten*. *Valencixanthin* (7): UV (EPA, qual.): 352, 370, 392. UV (A/B = 33:17) 356, 374, 369. CD (EPA, qual.): 217 (+), 227 (0), 262 (-), 272 (-), 290 (0), 354 (+), 373 (+), 394 (+), 430 (0). CI-MS: 413 ([M + 1]⁺).

(9*Z*)-*Valencixanthin* (6): UV (Hexan, qual.): 282, 348, 366, 388. UV (A/B = 33:17): 352, 370, 392. CD (EPA): 210 (0), 223 (-), 251 (0), 265–275 (+), 281 (0), 285 (-), 302 (0), 345 (+), 363 (+), 378 (+), 420 (0). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 1,01 (s, CH₃(16)); 1,167 (s, CH₃(17)); 1,21 (s, CH₃(18)); 1,74 (*quint.*-artig, M₂, ³J = 6,5, 7,5, 2 H-C(11)); 1,81 (s, CH₃(20)); 1,928, 1,936 (2 s, CH₃(19), CH₃(20)); 2,16 (br. t, AB, ³J = 7,5, 2 H-C(12)); 3,66 (*t*-artig, X₂, ³J = 6,5, 2 H-C(10)); 3,92 (*m*, H-C(3)); 5,92 (*d*, J = 15,5, H-C(7)); 6,01 (*dd*, J = 9,5, 1,5, H-C(14)); 6,06 (*d*, J = 11, H-C(10)); 6,19 (*dd*, J = 9,5, 1,5, H-C(14)); 6,27 (*d*, J = 15, H-C(12)); 6,48 (*m*, H-C(15), H-C(15)); 6,73 (*dd*, J = 15, 11, H-C(11)); 6,83 (*d*, J = 15,5, H-C(8)). CI-MS: 413 ([M + 1]⁺), 395 ([M + 1]⁺ - H₂O).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. P. Natarajan, G. Mackinney, *J. Sci. Industr. Res. (New Delhi)* **1952**, 11B, 416.
- [2] A. L. Curl, G. F. Bailey, *Agric. Food Chem.* **1954**, 2, 685.
- [3] E. Märki-Fischer, R. Buchecker, C. H. Eugster, G. Englert, K. Noack, M. Vecchi, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 2198.
- [4] E. Märki-Fischer, R. Buchecker, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 2143; C. H. Eugster, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 639.
- [5] E. Märki-Fischer, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 24.
- [6] P. Uebelhart, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 1983.
- [7] P. Karrer, E. Jucker, 'Carotinoide', Birkhäuser, Basel, 1948.
- [8] T. W. Goodwin, 'The Comparative Biochemistry of the Carotenoids', Chapman & Hall, London, 1952.
- [9] J. Gross, 'Pigments in Fruits', Academic Press, New York, 1987.
- [10] O. Straub, H. Pfander, 'Key to Carotenoids', Birkhäuser, Basel, 1987.
- [11] O. Isler, H. Gutmann, U. Solms, 'Carotenoids', Birkhäuser, Basel, 1971.
- [12] O. Straub, 'Key to Carotenoids', Birkhäuser, Basel, 1976.
- [13] T. W. Goodwin, 'The Biochemistry of the Carotenoids', Chapman & Hall, London, 1980, Vol. 1.
- [14] V. Tamas, G. Neamtu, 'Pigmenti Carotenoidici si Metaboliti', Editura Ceres, Bucuresti, 1986.
- [15] A. L. Curl, G. F. Bailey, *Food Res.* **1955**, 20, 371.
- [16] A. L. Curl, G. F. Bailey, *Agric. Food Chem.* **1956**, 4, 156.
- [17] A. L. Curl, G. F. Bailey, *Agric. Food Chem.* **1957**, 5, 605.
- [18] A. L. Curl, G. F. Bailey, *Food Res.* **1957**, 22, 63.
- [19] A. L. Curl, *Food Res. (J. Food Sci.)* **1960**, 25, 670.
- [20] A. L. Curl, G. F. Bailey, *J. Food Sci. (Food Res.)* **1961**, 26, 442.
- [21] A. L. Curl, *J. Food Sci. (Food Res.)* **1964**, 29, 241.
- [22] A. L. Curl, G. F. Bailey, *J. Agric. Food Chem.* **1961**, 9, 403.
- [23] A. L. Curl, *Food Res.* **1959**, 24, 413.
- [24] J. Gross, G. Eckardt, *Phytochemistry* **1981**, 20, 2267.
- [25] E. Märki-Fischer, C.H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 1689.
- [26] E. Märki-Fischer, C.H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1988.
- [27] Zhen-Yan Zhu, H. Nayeshiro, R. Prewo, P. Rüedi, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 577.