

Die γ -Bestrahlung von synthetischem β -Carotin*

Physikochemische und dünn-schichtchromatographische
Untersuchungen an Radiolyseprodukten

Von

E. Bancher, J. Washüttl und P. Riederer

Aus dem Institut für Botanik, Technische Mikroskopie und Organische Rohstofflehre der Techn. Hochschule Wien

(Eingegangen am 20. August 1970)

The γ -Irradiation of Synthetic β -Carotene. Some Physico-Chemical and Thin-Layer Chromatographic Studies of Radiolysis Products

Solid β -carotene is remarkably stable to γ -irradiation. In an oxygen atmosphere doses as high as 12 Mrad were required to bring about significant losses of β -carotene, whereas in air even larger doses had to be applied in order to effect a comparable degree of radiolysis. Cleavage products which arose in O_2 at a dose of 12 Mrad and which could be separated from each other by thin-layer chromatography were isozeaxanthin, β -carotene-5,6-5',6'-diepoxide, β -apo-12'-carotenal, β -apo-10'-carotenal, 3,3',6'-trihydroxy- α -carotene-5,8-epoxide and vitamin A_1 . It is notable that some of the radiolysis products (e.g., vitamin A_1 , β -apo-12'-carotenal and β -apo-10'-carotenal) possess vitamin A activity.

Das feste β -Carotin ist gegen γ -Strahlung ziemlich stabil. Bei Bestrahlung unter Sauerstoffbegasung treten deutliche β -Carotin-Verluste erst bei der hohen Dosis von 12 Mrad auf; bei Bestrahlung an der Luft werden ähnliche Radiolyseerscheinungen erst durch wesentlich höhere Strahlendosen ausgelöst. Spaltungsprodukte, die bei 12 Mrad und Sauerstoffbegasung auftraten und dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt werden konnten, waren Isozeaxanthin, β -Carotin-5,6-5',6'-diepoxid, β -Carotin-5,8-5',8'-diepoxid, β -Apo-12'-carotinal, β -Apo-10'-carotinal, 3,3',6'-Trihydroxy- α -carotin-5,8-epoxid und Vitamin-A-Alkohol. Es ist bemerkenswert, daß ein Teil der Radiolyseprodukte (z. B. Vitamin- A_1 -Alkohol, β -Apo-12'-carotinal und β -Apo-10'-carotinal) Vitamin-A-Wirksamkeit besitzt.

* Herrn Prof. Dr. O. Hromatka zum 65. Geburtstag gewidmet.

Einleitung

Über das strahlenchemische Verhalten (^{60}Co - γ -Bestrahlung) von pulverförmigem β -Carotin fanden sich in der uns zugänglichen Literatur keine Angaben; es konnten weder Werte bezüglich einer Abnahme des Provitamins in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (nicht einmal bei einer Einzeldosis) noch Hinweise auf entstehende Spaltungsprodukte gefunden werden. Die Möglichkeit von Zusätzen des festen Provitamins-A zu festen Lebens- und Futtermitteln und vielleicht deren γ -Bestrahlung in Hinblick auf Konservierung, Sterilisierung, Schädlingsbekämpfung usw. geben diesen Untersuchungen als Modellfall einige Bedeutung.

Zur Identifizierung von Spaltungsprodukten des β -Carotins nach γ -Bestrahlung dienten dünn-schichtchromatographische Methoden unter Heranziehung weiterer physikochemischer Verfahren. Analoge Analysemethoden haben in der Carotinoidechemie unter anderen *Hromatka*¹, *Isler*², *Grob*³, *Karrer*⁴, *Goodwin*⁵ und *Zechmeister*⁶ beschrieben.

Auf die exakte Identifizierung mittels IR-Spektren und Schmelzpunkten wird nur kurz hingewiesen werden; die ausführlichen Angaben finden sich bei *Riederer*⁷. Weiters wird auch noch die quantitative Abnahme von β -Carotin und die Menge der auftretenden Spaltungsprodukte bei einer Strahlendosis als Beispiel bestimmt und beschrieben.

Material und Methodik

Nach der Strahleneinwirkung (Gammazell 220; Dosisleistung 540 Krad/h) auf die mit O_2 schwach begasten Proben wurde die Analyse der Radiolyseprodukte vorgenommen; die Auftrennung des Reaktionsgemisches war mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie relativ einfach durchzuführen. Die prinzipiellen Schritte dieser Methode sind von *Stahl*^{8, 9} beschrieben worden.

Nach der Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte deren Identifizierung mit Hilfe der Spektren im sichtbaren, ultravioletten und infraroten Wellenlängenbereich sowie durch spezifische Sprühreagentien und die Feststellung der Schmelzpunkte.

Die Spektren der Radiolyseprodukte, welche mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie angereichert worden waren, wurden mit Hilfe der Spektralphotometer Beckman DK-2 sowie Beckman IR-12 aufgenommen. Für die Aufnahmen im ultravioletten und sichtbaren Bereich erwiesen sich 1-cm-Küvetten am geeignetsten. Die quantitative Bestimmung wurde in einem Spektralkolorimeter „Inula 1009“ durchgeführt.

Zur Auswertung der erhaltenen Absorptionskurven konnten Arbeiten von *Goodwin*⁵, *Zechmeister*⁶, *Hager* und *Meyer-Bertenrath*¹⁰, *Isler*², *Nicoapa*¹¹, *Slovokhotova*¹² sowie *Bellamy*¹³ herangezogen werden.

Zum orientierenden Nachweis in der den einzelnen Substanzen vorkommenden funktionellen Gruppen (Hydroxyl-, Keto-, Epoxidgruppen etc.) wurden noch auf den Dünnschichtplatten chemische Reaktionen mittels verschiedener Sprühreagentien ausgeführt.

Die Herstellung der Sprühreagentien, ihre Spezifität und ihre Reaktionsfarbe werden bei *Stahl*⁹ ausführlich beschrieben (Tab. 1).

Tabelle 1. Die Sprühreagentien, ihre Spezifität sowie Reaktionsfarben

	Reagens	Spezifisch für	Reaktionsfarbe
A	Konz. Schwefelsäure	Carotinoide	blau
B	<i>Carr—Price</i> -Reagens	Carotinoide, Vitamin A	blau
C	Rhodaminreagens	Aldehyde	rot-orange
D	Indandionreagens	Aldehyde	blau bis violett UV: orange
E	2,4-Dinitrophenyl- hydrazin	Aldehyde Ketone	orange
F	o-Dianisidinreagens	Aldehyde Ketone	orange blau
G	Ammon-Cer(IV)nitrat- reagens	Hydroxyl	gelbgrüne Flecken auf rotem Unter- grund
H	Ammoniakal. AgNO ₃	Hydroxyl	schwarz
I	Konz. HCl in Methanol ¹⁴	Hydroxycarotinoide Carotine	gelbgrün keine Färbung
J	Konz. wäßr. HCl ¹⁴	5,6-Epoxide 5,8-Epoxide Flavoxanthin β -Citaurin Capsorubin Carotine	grün bis blau tiefblau blau blau violett keine Färbung
K	Konz. Ameisensäure ¹⁴	Lutein Bixin Carotine Violaxanthin Capsanthin Azafrin	tiefgrün blau tiefblau rosa violett
L	N,N-Dimethyl-p- phenylen-diammonium- dichlorid	Peroxide	purpurrot

Nach der qualitativen Trennung der erhaltenen Reaktionsprodukte von bestrahltem pulverförmigem β -Carotin (12 Mrad; O₂-Begasung) und der Identifizierung der Substanzen konnte eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden. Die Anreicherung der einzelnen Produkte erfolgte mittels der quantitativen Dünnschichtchromatographieausrüstung der Desaga (Heidelberg), die eine gleichzeitige Entwicklung von 10 Platten (20 × 40 cm) ermöglicht und ein einwandfrei streifenförmiges Aufbringen des Extraktes gewährleistet.

Tabelle 2

Schicht (0,25 mm)		S_1	S_2	S_3^*
Fließmittel		F_1	F_2	F_3
Zone**		nach <i>Bolliger</i> ¹⁶	hR_f -Werte nach eigenen Angaben ⁷	nach <i>Stahl</i> ¹⁷
1	β -Carotin	85 (84)	99	98 (97)
2	Isozeaxanthin	—	97	0—3 (0)
3	β -Carotin-5,8-5',8'-diepoxid	—	90	0—3 (0)
4	β -Carotin-5,6-5',6'-diepoxid	—	76	0—3 (0)
5	β -Apo-12'-carotinal	—	45	69 (70)
7	β -Apo-10'-carotinal	—	32	52 (53)
8	3,3',6'-Trihydroxy- α - carotin-5,8-epoxid	—	24	0—3 (0)
10	Vitamin-A-alkohol	10 (10)	0—5	—

Schicht (0,25)		S_4^*	S_5^*	S_6^*
Fließmittel		F_4	F_5	F_6
Zone**		nach <i>Demole</i> ¹⁸	nach <i>Varma</i> ¹⁹	nach <i>Riley</i> ²⁰
1	β -Carotin	96 (96)	—	87 (87)
2	Isozeaxanthin	62 (63)	—	—
3	β -Carotin-5,8-5',8'-diepoxid	—	—	—
4	β -Carotin-5,5'-5',6'-diepoxid	—	—	—
5	β -Apo-12'-carotinal	—	—	—
7	β -Apo-10'-carotinal	—	—	—
8	3,3',6'-Trihydroxy- α - carotin-5,8-epoxid	—	—	23
10	Vitamin-A-alkohol	—	45 (45)	—

* Vor der Chromatographie erfolgte jeweils eine Abtrennung der übrigen Carotinoide mit Hilfe des Trennsystems S_2 — F_2 . Die abgetrennten Carotinoide werden als „Bindestrich“ symbolisiert. Die Literatur- hR_f -Werte beziehungsweise die hR_f -Werte der Standards werden in Klammer angegeben.

** Zone 6 und 9 konnten nicht identifiziert werden.

S_1 = Kieselgel G

S_2 = Kieselgel GF₂₅₄, aktiviert, Kammersättigung

S_3 = sekundäres Magnesiumphosphat, aktiviert, Kammersättigung

S_4 = Kieselgel G — Reisstärke (98 : 2), aktiviert

S_5 = Kieselgel G, 30 Min. bei 100 °C getrocknet

S_6 = Kieselgel G, aktiviert

F_1 = Cyclohexan : Äther (80 : 20)

F_2 = Dichlormethan p. A.

F_3 = Tetrachlorkohlenstoff p. A.

F_4 = n-Hexan : Diäthyläther (30 : 70) p. A.

F_5 = Cyclohexan : Äthanol (97 : 3) p. A.

F_6 = Petroläther_{60-80 °C} : Essigester : Diäthylamin (58 : 30 : 12)

Nach der Anreicherung der einzelnen Fraktionen konnten diese beim Maximum des Spektrums im sichtbaren Wellenlängenbereich colorimetrisch ausgemessen werden. Der Gehalt der einzelnen Substanzen wurde jeweils aus drei Bestimmungen ermittelt.

Für die Berechnung der Carotinoidmengen konnte das *Bouguer—Beer—Lambertsche* Gesetz herangezogen werden¹⁵, wobei die $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ -Werte den Tabellen von *Goodwin*⁵ entnommen wurden.

Ergebnisse

1. Qualitative Analyse

Zur Auftrennung der Gemische von sauerstoffhaltigen Carotinoiden benutzten wir teils bekannte, teils in unserem Laboratorium entwickelte Trennsysteme. Die Trennsysteme, die sich bei den Radiolyseprodukten des β -Carotins bewährten, sowie die hR_f -Werte der nachgewiesenen Substanzen findet man in Tab. 2.

Die Resultate der Versuche mit spezifischen Sprühreagentien werden in Tab. 3 angegeben.

Tabelle 3. Reaktionen der aus bestrahltem, pulverförmigem β -Carotin erhaltenen Radiolyseprodukte mit spezifischen Sprühreagentien

Zone**	Sprühreagens*											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
2	++	++	—	—	—	—	++	++	+	—	++	—
3	++	++	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—
4	++	++	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—
5	++	++	++	+	++	+	—	—	—	—	—	—
6	++	++	—	—	—	—	—	—	—	+	—	++
7	++	++	++	+	++	+	—	—	—	—	—	—
8	++	++	—	—	—	—	—	—	—	+	—	++
9	++	++	—	—	—	—	++	++	+	++	+	—
10	++	++	—	—	—	—	++	+	+	—	—	—

* Entsprechend Tab. 1.

** Bezogen auf Dünnschichtchromatogramm Kieselgel G, Laufmittel Methylenchlorid ($S_2—F_2$, Tab. 2).

++ stark positiv; + positiv; — negativ.

Die erhaltenen Radiolyseprodukte zeigten deutliche Unterschiede in der Reaktionsbereitschaft. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde versucht, mit Hilfe von Spektren im sichtbaren, ultravioletten und infraroten Wellenlängenbereich sowie durch Feststellung der Schmelzpunkte (Tab. 4, 5 und 6) bis zur Identifizierung vorzudringen.

Tabelle 4. Absorptionsbanden (nm) im Sichtbaren und im UV

Zone*		max	
1	427 s	451,5	479,5
2	427	450,0	478,0
3	387	409	434
4	426	451	481
5	—	414	434 s
6**	—	—	—
7	—	435	462 s
8	377 ss, 400	423	450 s
9**	—	—	—
10	—	325—326	—

* Bezogen auf $DC S_2-F_2$, Tab. 2.

** Bei den Substanzen der Zone 6 und 9 handelt es sich um äußerst reaktionsfähige Produkte. Eine Anreicherung der in sehr geringen Mengen vorkommenden Substanzen konnte aus diesem Grunde nicht durchgeführt werden. Die Sprühversuche zeigten das Vorhandensein von Peroxidgruppen an.

s = Schulter; ss = schwache Schulter.

Obwohl die Spektren der Radiolyseprodukte im sichtbaren und ultravioletten Wellenlängenbereich bereits einige Schlüsse bezüglich des Molekülaufbaues zuließen, wurde dennoch versucht, mittels der Infrarot-Spektroskopie weitere Anhaltspunkte für das Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen zu erhalten.

Tab. 5 gibt die charakteristischen Schwingungen der einzelnen Substanzen im infraroten Wellenlängenbereich wieder (Lösungsmittel CCl_4).

Tabelle 5. IR-Befund; funktionelle Gruppen, bei cm^{-1}

Zone*	OH Valenz- schwingung	C=O Valenz- schwingung	CH=CH Deformations- schwingung	CH Valenz- schwingung	Epoxid (cycl. C—O—C)
1	—	—	965	2900	—
2	3605	—	970	2930	—
3	—	—	970	2890	1070
4	—	—	968	2850	1070
5	—	1725	972	2900	—
6**	—	—	—	—	—
7	—	1725	972	2890	—
8	3605	—	970	2910	1070
9**	—	—	—	—	—
10	3380	—	961	2850	—

* Bezogen auf $DC S_2-F_2$, Tab. 2.

** Die Zonen 6 und 9 konnten aus den bei Tab. 4 erwähnten Gründen nicht angereichert werden.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen recht gut mit jenen der Sprühreaktionen überein, so daß eine Identifizierung der Spaltprodukte nach Feststellung der Schmelzpunkte vorgenommen werden konnte.

In Tab. 6 sind daher die Schmelzpunkte der einzelnen Substanzen sowie die auf Grund aller Analysenergebnisse vermuteten Abbauprodukte von β -Carotin nach γ -Bestrahlung zusammengefaßt.

Tabelle 6

Zone *	Schmp., °C	mikroskopisches Bild	Radiolyseprodukt.
1	187—180	gelborange, rhombische Blättchen aus Petroläther	β -Carotin
2	148—149	rote Nadeln aus Petroläther	4,4'-Dihydroxy- β -carotin
3	185—187	gelbe Blättchen aus Benzol-Methanol (1/1)	β -Carotin-5,8-5',8'-diepoxid
4	181—184	gelbe bis orange Plättchen	β -Carotin-5,6-5',6'-diepoxid
5	86—89	gelbe Prismen aus Petroläther	β -Apo-12'-carotinal
6**	—		
7	95—98	rötliche Nadeln aus Petroläther	β -Apo-10'-carotinal
8	204—216	hellgelbe Kristalle aus Benzol	3,3',6'-Trihydroxy- α -carotin-5,8-epoxid
9**	—		
10	61—63	gelbe Prismen aus Methanol	Vitamin-A ₁ -Alkohol

* Bezogen auf S_2 — F_4 , Tab. 2.

** Für die Substanzen der Zonen 6 und 9 konnten aus den oben (Tab. 4) erwähnten Gründen keine Schmelzpunkte ermittelt werden.

2. Quantitative Analyse

Die Abnahme des β -Carotingehaltes (der β -Carotingehalt der Reinstanz wurde spektralcolorimetrisch mit 97% ermittelt) und die Zunahme der Reaktionsprodukte nach γ -Bestrahlung (12 Mrad; unter schwacher O_2 -Begasung) sind der Tab. 7 zu entnehmen.

Als Spaltungsprodukte, die dünnschichtchromatographisch aufgetrennt werden konnten, traten bei einer Dosis von 12 Mrad unter schwacher Sauerstoffbegasung Isozeaxanthin, β -Carotin-5,6-5',6'-diepoxid, β -Carotin-5,8-5',8'-diepoxid, β -Apo-12'-carotinal, β -Apo-10'-carotinal, 3,3',6'-Trihydroxy- α -carotin-5,8-epoxid und Vitamin-A-Alkohol auf. Quantitativ betragen die genannten Radiolyseprodukte etwa 42%, während das unzerstörte β -Carotin etwa 54% ausmacht. Die Epoxide

bilden zusammen den größten Teil der Reaktionsprodukte. Bemerkenswert scheint noch zu sein, daß die Spaltung des β -Carotinmoleküls nur zu 11,4% erfolgt (Carotinale sowie Vitamin-A-Alkohol).

Tabelle 7

Carotinoid	rel. % s = max \pm 12%
Unverändertes β -Carotin	53,6
Isozeaxanthin	10,2
β -Carotin-5,8-5',8'-diepoxid	6,8
β -Carotin-5,6-5',6'-diepoxid	9,3
β -Apo-12'-carotinal	3,1
β -Apo-10'-carotinal	2,9
3,3',6'-Trihydroxy- α -carotin- 5,8-epoxid	4,1
Vitamin-A ₁ -Alkohol	5,4

Bei einer Bestrahlung von β -Carotin ohne Sauerstoffbegasung treten die ersten Reaktionsprodukte bei 18,5 Mrad auf (Isozeaxanthin, β -Carotin-5,6-5',6'-diepoxid). Bei einer Bestrahlungsdosis von 33 Mrad findet man dieselben Bestrahlungsprodukte wie nach 12 Mrad unter Sauerstoffbegasung. Diese Versuche wurden nur qualitativ durchgeführt.

Diskussion

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß die Bildung der Carotinoidradiolyseprodukte mit dem Angebot an Sauerstoff gekoppelt ist. Außerdem ist die Entstehung der Reaktionsprodukte bei Bestrahlung des β -Carotins an der Luft auch von der Dosisleistung der Bestrahlungseinrichtung abhängig, da es nicht gleich ist, ob z. B. eine Dosis von 33 Mrad mit einer Quelle, deren Dosisleistung bei 540 Krad/h liegt, erreicht wird, oder ob diese Dosis durch eine γ -Cell, welche eine Dosisleistung von nur 40 Krad/h hat, appliziert wird. Rückschlüsse auf das strahlenchemische Verhalten pulverförmigen β -Carotins bei Zusatz zu festen Lebens- und Futtermitteln, die einer γ -Bestrahlung unterzogen werden (z. B. zwecks Konservierung, Sterilisierung usw.), dürfen auf Grund der Modelluntersuchung an reinem festem β -Carotin nur beschränkt gezogen werden. Sekundärreaktionen, ausgelöst durch die γ -Bestrahlung der im komplexen System der Futter- und Lebensmittel enthaltenen Inhaltsstoffe, können nämlich weitere, sogar hohe Verluste an β -Carotin bedingen. In Lebens- und Futtermitteln, deren einzelne Komponenten strahlenchemisch sehr stabil sind, sollte dagegen eine Behandlung mit γ -Strahlen auch bei den für Sterilisationszwecke erforderlichen hohen Dosen kaum Verluste am wichtigen Provitamin A mit sich bringen.

Literatur

- ¹ O. Hromatka, Mh. Chem. **93**, 497 (1962).
- ² O. Isler, R. Rüegg und P. Schudel, Chimia **15**, 208 (1961).
- ³ E. C. Grob und R. P. Pflugshaupt, Helv. Chim. Acta **48**, 930 (1965).
- ⁴ P. Karrer und E. Jucker, Carotinoide. Basel: Birkhäuser. 1948.
- ⁵ T. W. Goodwin, in: K. Peach und M. V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer. 1955.
- ⁶ L. Zechmeister, Cis—trans-Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes. Wien: Springer. 1962.
- ⁷ P. Riederer, Dissertation Techn. Hochsch. Wien (1970).
- ⁸ E. Stahl, Dünnschichtchromatographie — ein Laboratoriumshandbuch, S. 217—256. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer. 1962.
- ⁹ E. Stahl, Dünnschichtchromatographie — ein Laboratoriumshandbuch. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. 1967.
- ¹⁰ A. Hager und T. Meyer-Bertenrath, Ber. dtsh. bot. Ges. **80**, 426 (1967).
- ¹¹ E. Nicoara, V. Tamas, G. Neamtu und C. Bodea, Ann. Chem. **697**, 201 (1966).
- ¹² N. A. Slovkhotova, G. I. Samokhvalov, G. M. Kunitskaya und M. A. Miropolskaya, J. Gen. Chem. USSR **24**, 2193 (1954).
- ¹³ L. J. Bellamy, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, 2. Aufl. Darmstadt: Steinkopf. 1966.
- ¹⁴ J. Schormüller, Handbuch der Lebensmittelchemie, I. Band: Bestandteile der Lebensmittel. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. 1966.
- ¹⁵ A. Hager und T. Meyer-Bertenrath, Planta (Berlin) **69**, 198 (1966).
- ¹⁶ H. R. Bolliger, zitiert bei E. Stahl⁸.
- ¹⁷ E. Stahl, H. R. Bolliger und L. Lehnert, Wiss. Veröffentl. Dtsch. Ges. Ernährung **9**, 129—134 (1963).
- ¹⁸ E. Demole, J. Chromatogr. **1**, 24 (1958).
- ¹⁹ T. N. R. Varma, T. Panalaks und T. K. Murray, Anal. Chem. **36**, 1824 (1964).
- ²⁰ S. P. Riley, J. Mar. Biol. Assoc. UK. **45**, 583 (1966).