

## CIS-ISOMERE XANTHOPHYLLE IN PFLANZEN

H. NITSCHE und K. EGGER

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Deutschland

(Received 30 July 1968, in revised form 7 February 1969)

**Zusammenfassung**—Eine Methode zur Trennung von *cis-trans*-isomeren Xanthophyllen auf Dünnschichten von  $Mg_2(OH)_2CO_3$  wird entwickelt und ihre Brauchbarkeit an Isomerengemischen gezeigt, die durch Jodeinwirkung auf Lösungen von Lutein, Taraxanthin=Luteinepoxid, Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin entstanden sind. Mit dieser neuen Methode fanden wir, daß in Pflanzen neben den all-*trans* Formen häufig zwei nunmehr wohldefinierte *cis*-Isomere auftreten, die in Anlehnung an Zechmeister Neo U und Neo V bezeichnet werden. Deren Eigenschaften und Verbreitung werden beschrieben und die Lage der *cis*-Bindungen wird diskutiert.

**Abstract**—A method for separation of *cis-trans* isomeric xanthophylls on thin layers of  $Mg_2(OH)_2CO_3$  has been developed. This method proved useful for separating mixtures of isomers obtained by iodine catalysis of lutein, taraxanthin (=luteinepoxide), violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin. With this new method we have found, in a large number of plant extracts, two now well-defined *cis*-isomers besides the all-*trans* configuration. They are named neo U and neo V according to Zechmeister's nomenclature. Their properties and distribution are described and the positions of the *cis*-bonds discussed.

NUR WENIGE Fälle natürlicher *cis*-Xanthophylle in Pflanzen sind bis jetzt beschrieben worden (z.B.<sup>1,2</sup>). Der *cis*-Gipfel im Spektrum diente dabei jeweils als Kriterium der nicht näher definierten *cis*-Konfiguration. Bei Analysen pflanzlicher Pigmentgemische beobachteten wir, daß Xanthophylle häufig in Form mehrerer Isomeren vorliegen, wobei in vielen Fällen *cis*-Pigmente dominieren. Dies machte die Ausarbeitung eines präzisen Trennverfahrens zum Vergleich der Isomeren aus verschiedenen Quellen notwendig. Dünnschichten mit basischen Carbonaten sind dazu hervorragend geeignet, nicht jedoch die gebräuchlichen Schichten aus Kieselgel, Mg-Silikat, Polyamid oder Zellulose.

Bereits auf der Säule werden mit  $Zn_2(OH)_2CO_3$ ,  $Mg_2(OH)_2CO_3$ ,  $BaCO_3$  oder  $CaCO_3$  *cis-trans*-Gemische scharf getrennt. Dies ist bei früheren Auf trennungen natürlicher Pigmente meist übersehen worden, was zur Verwirrung des Taraxanthinproblems beigetragen hat.<sup>3a,b</sup> Der Übergang zur Dünnschicht steigert erwartungsgemäß die Trennschärfe und die Vergleichsmöglichkeiten.

Die Carbonate von Zn, Ba, Ca und Mg kommen für die DC gleichermaßen in Frage;  $Mg_2(OH)_2CO_3$  (Merck 5828) gibt jedoch die schärfsten Zonierungen. Zum Suspendieren dieses Pulvers darf weder Wasser noch Alkohol verwendet werden, da damit die Trennfähigkeit fast aufgehoben wird. Dioxan oder Aceton sind vorzuziehen. Zur Auflockerung und Erhöhung der Laufgeschwindigkeit setzen wir etwa ein Drittel Kieselgur (für DC. von Merck) zu. Die bei Zimmertemperatur getrockneten Schichten werden schließlich mit Petroläther-Benzol-Aceton 50:40:10 entwickelt.

<sup>1</sup> G. TAPPI und P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* **32**, 50 (1949).

<sup>2</sup> A. HAGER und T. MEYER-BERTHENRATH, *Planta* **76**, 149 (1967).

<sup>3a</sup> K. EGGER, *Planta* **80**, 65 (1968).

<sup>3b</sup> K. EGGER, *Natforschg.* **23b**, 733 (1968).

## TRENNUNG KÜNSTLICHER ISOMERENGEMISCHE

Durch Belichten einer Xanthophyllösung in Gegenwart von Jod geht ein Teil des Pigmentes in *cis*-Isomere über, bis ein Gleichgewicht erreicht ist.<sup>4</sup> Wir haben die Xanthophylle Lutein, dessen Epoxid (identisch mit Taraxanthin,<sup>3a</sup> Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin dieser Behandlung unterworfen und die entstandenen Isomerengemische auf Mg-DC chromatografiert. Sie spalten dabei in drei Hauptbanden auf, wobei stets die Zone mit dem höchsten  $R_f$ -Wert auch die höchsten  $\lambda_{\max}$  Werte besitzt, aber keinen *cis*-peak erkennen läßt. Hier liegt also die all-*trans* Verbindung vor (Abb. 1). Es folgen nun zwei *cis*-Komponenten, die wir in Anlehnung an Zechmeister als Neo U und Neo V bezeichnen wollen. Die Neo U-Zonen zeigen einen sehr geringen *cis*-peak, Absorptionsmaxima bei kürzeren Wellenlängen als die *trans*-Pigmente und im Kurvenverlauf des Spektrums mehr Feinstruktur als diese (Tab. 1, Abb. 2-4). Sie werden darin von den jeweiligen Neo V-Zonen übertroffen, die nun auch durch einen ausgeprägten *cis*-Gipfel ausgezeichnet sind. Bei besonders langer Laufstrecke oder zweifacher Entwicklung im gleichen Laufmittel beobachteten wir eine Feinaufspaltung der Neo U-Zonen bei Taraxanthin und Antheraxanthin (Abb. 1) in zwei Komponenten, die sich spektral nicht signifikant unterscheiden. Eine vergleichbare Trennung, die zwei bzw. drei verschiedene *cis*-Isomere zu erfassen gestattet war mit anderen Schichten nicht zu erreichen.

## TRENNUNG NATÜRLICHER PIGMENTGEMISCHE AUF CARBONATSCHICHTEN

Extrakte aus Blüten enthalten in der Regel mehrere Xanthophylle. Wenn diese nochmals in mehrere Isomeren aufspalten, entsteht im DC ein recht kompliziertes Bild. Dennoch gelang es uns die Mischungen in Einzelkomponenten zu zerlegen und jede Zone auf ein

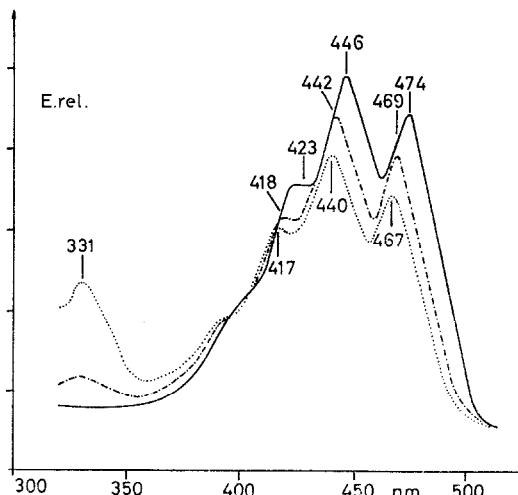


ABB. 2. ISOMERE LUTEINE, GEMESSEN IN ÄTHANOL. DIE KONZENTRATION DER EINZELNEN ISOMEREN IST WILLKÜRLICH GEWÄHLT.

—	all- <i>trans</i>
·····	Neo U
.....	Neo V.

<sup>4</sup> P. KARRER *et al.*, *Helv. Chim. Acta* **12**, 741 (1929).

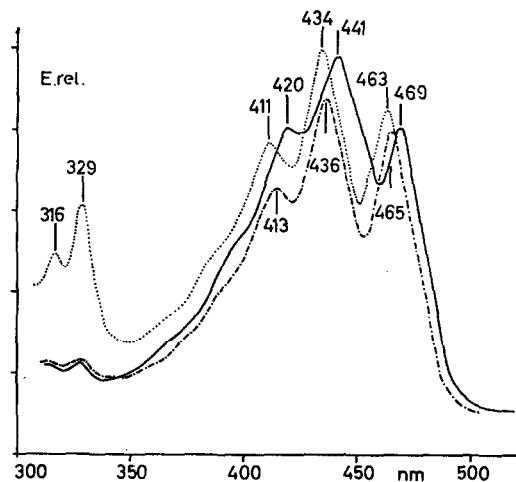


ABB. 3. ISOMERE TARAXANTHINE, GEMESSEN IN ÄTHANOL.

— all-trans  
 - - - Neo U  
 .... Neo V.

bestimmtes Isomeres des Jodansatzes zurückzuführen. Es treten also in der Pflanze keine anderen Isomeren auf, als sie auch *in vitro* zu erhalten sind. Die Mengenverhältnisse der *trans*- und *cis*-Formen sind jedoch für das Objekt spezifisch und stehen in keiner Beziehung zum Gleichgewicht des Jodansatzes. Die einzelnen Xanthophylle sind auch mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit *in vivo* als *cis*-Formen anzutreffen, so daß wir sie einzeln besprechen wollen. In einer ersten Mitteilung zu diesem Problem waren nur die Neo U-Formen beobachtet worden.<sup>3a</sup>

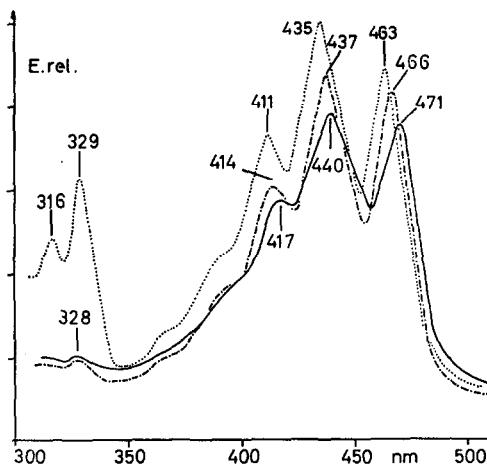


ABB. 4. ISOMERE VIOLAXANTHINE, GEMESSEN IN ÄTHANOL.

— all-trans  
 - - - Neo U  
 .... Neo V.

TABELLE 1. ISOMERE XANTHOPHYLLE,  $R_f$ -WERTE UND MAXIMA

Substanz	Isomeres	$hR_f$	λ <sub>max</sub> und Δλ (nm) in Äthanol							
			λ <sub>max</sub> 1	Δλ	λ <sub>max</sub> 2	Δλ	λ <sub>max</sub> 3	Δλ	λ cis	Δλ cis
Lutein	all-trans	85	474		446		423(S)		—	—
	Neo U	63	469	5	442	4	418	5	—	—
	Neo V	50	467	7	440	6	417	6	331/143	
Zeaxanthin	all-trans	83	478		452		428(S)		—	—
	Neo U	50	474	4	446	6	425(S)	3	—	—
	Neo V	38	472	6	444	8	425(S)	3	338/140	
Taraxanthin	all-trans	78	469		441		420		—	—
	Neo U	55	465	4	436	5	413	7	—	—
	Neo V	42	463	6	434	7	411	9	329/140	
Antheraxanthin	all-trans	76	474		445		424(S)		—	—
	Neo U	45	470	4	442	3	422(S)	2	—	—
	Neo V	30	469	5	441	4	420	4	332/142	
Violaxanthin	all-trans	70	471		440		417		—	—
	Neo U	36	466	5	437	3	414	3	—	—
	Neo V	25	463	8	435	5	411	6	329 142	

$hR_f$ :  $hR_f$ -Wert auf  $ZnCO_3$ -Kieselgur Mischdünnenschichtplatten.

Δλ: Differenz zwischen Maximum der all-trans-Form und der jeweiligen cis-Form.

Δλ cis: Differenz zwischen dem langwelligsten Maximum und dem cis-Gipfel.

### (a) Taraxanthin

Luteinepoxid:<sup>3a,b</sup> In den allermeisten Fällen liegen bereits in der Pflanze all-trans und Neo U-Konfigurationen in einem für das Objekt charakteristischen Verhältnis in vergleichbarer Größenordnung vor. Taraxanthin Neo V tritt nur in kleinerer Menge als Begleiter auf. Vergleichbare Mengen von all-trans und Neo U enthalten die Blütenblätter von *Helianthus annuus*, *Picris spec.*, *Solidago canadensis*. Dagegen überwiegt all-trans bei *Senecio nemorensis*, *Impatiens noli-tangere*, *Tussilago farfara*, *Forsythia suspensa* und *F intermedia*.

### (b) Lutein

Es wird meist (z.B. in grünen Blättern) in der all-trans Form angetroffen mit nur geringen Mengen an Lutein Neo U und Neo V. In den Blüten von *Taraxacum officinale* jedoch ist Lutein Neo U das Hauptpigment, hier wird also bevorzugt die cis Form gebildet. In Blüten von *Tagetes patula* und *Tropaeolum majus* wird trans-Lutein von beachtlichen Anteilen (ca. 30%) Neo U und Neo V begleitet.

### (c) Violaxanthin

Das Violaxanthin grüner Blätter ist vorwiegend all-trans Violaxanthin mit geringen Anteilen Neo U und Neo V. In Blüten dagegen trifft man vorwiegend Violaxanthin Neo U an, das stets von deutlichen Anteilen an Neo V begleitet wird. Auch hier sind die Mengenverhältnisse für das Objekt charakteristisch. Alle drei Violaxanthin-Isomeren finden sich fast frei von anderen Xanthophyllen in Petalen von *Linum flavum* und verschiedenen *Oenothera*-Arten. Bei *Forsythia*-Arten, in Randblüten von *Helianthus annuus* und in Blütenblättern von *Lysimachia punctata* wird bevorzugt Violaxanthin Neo U neben reichlichen Mengen anderer Xanthophylle (bei *Helianthus* vorwiegend trans-Lutein) gebildet. Ausgewogen ist das Verhältnis Violaxanthin-Neo-U zu all-trans in gelben Petalen von *Viola*-Arten, *Canna indica*, *Impatiens noli-tangere* und *Ranunculus montanus*. *Senecio nemorensis* liefert hauptsächlich die all-trans-Form.

## (d) Antheraxanthin

Die *cis*-Form Neo-U ist Hauptpigment der Pollen von *Lilium martagon*, daneben sind nur Spuren der *trans*-Form und etwas Violaxanthin Neo U nachweisbar. Karrer und Tappi<sup>1</sup> hatten in Pollen von *Lilium candidum* ebenfalls "*cis*"-Antheraxanthin gefunden und als Isomeres des zuvor aus *Lilium tigrinum* beschriebenen Antheraxanthins<sup>5</sup> identifiziert. Dieses "*cis*"-Pigment ist, wie unsere Analyse ergab, Neo U. In Kelchen von *Physalis alkekengi* ist nur das all-*trans*-Pigment enthalten, *Forsythia* gibt gleichermaßen *trans* und Neo U; Neo V schließlich konnte in erheblicher Menge in Blüten von *Ranunculus montanus* nachgewiesen werden.

## (e) Zeaxanthin

Dieses Pigment wurde bis jetzt nur in der all-*trans*-Form beobachtet. *Cis*-Anteile treten erst bei großen Extraktmengen in Erscheinung, so daß ihr vorkommen *in vivo* sehr fraglich ist.

## DEUTUNG DER ISOMERIE, DERIVATE

Die Höhe des *cis*-peaks gestattet einen ersten Schluß auf die Lage der *cis*-Doppelbindung bei den Formen Neo U und Neo V. Da dieser peak um so ausgeprägter wird, je mehr die *cis*-Stelle der Mitte des Moleküls nahe kommt, kann Neo U nur 9 oder 9' entsprechen, Neo V aber 13, 15 oder 13'. Ohne direkten Vergleich mit synthetischen Pigmenten läßt sich Neo V nicht präziser festlegen, da sich die drei von uns erwogenen Möglichkeiten kaum mehr chromatographisch unterscheiden dürften.

Dagegen erlaubt die Feinaufspaltung der Neo-U-Formen von Antheraxanthin und Taraxanthin eine Interpretation zur Stütze der vorgeschlagenen Lokalisation der *cis*-Stelle. Diese Moleküle sind ja asymmetrisch bezüglich der Substituenten an den beiden Ringen. Dies kann einen Unterschied im chromatographischen Verhalten von 9-*cis* und 9'-*cis* bedingen, die zu der beobachteten Feinaufspaltung führt. Eine Zuordnung zur stärker oder schwächer adsorbierten Komponente läßt sich daraus jedoch nicht ableiten (Abb. 1, Spur T, A). Gestützt wird diese Ansicht durch das Verhalten der Acetate der Violaxanthin-Isomeren. Violaxanthin ist völlig symmetrisch gebaut, so daß 9-*cis* und 9'-*cis* identisch sind. Neo U des Violaxanthins zeigt entsprechend keine Aufspaltung. Man kann nun acetylieren, wobei man bei der Verseifung die eingesetzten Isomeren ohne merkliche Umlagerungen zurückhält. Von Violaxanthin Neo U sind zwei Monoacetate denkbar, da es durch die *cis*-Stelle asymmetrisch geworden ist; die Acetylgruppe kann der *cis*-Bindung nahe oder fern stehen. Tatsächlich wird das Monoacetat von Violaxanthin Neo U in zwei Zonen aufgespalten, während die Monoacetate der *trans*-Verbindung und von Neo V wie auch die Diacetate einheitlich bleiben.

Bis jetzt ist es uns nicht gelungen, eine Verdoppelung der Neo U-Zone des Luteins zu finden, obwohl diese nach den Befunden an Taraxanthin, Violaxanthin und Antheraxanthin zu erwarten wäre. Durch Oxidation, Reduktion ( $\text{LiAlH}_4$ ) und Säurebehandlung (furanoide Unlagerung der Epoxide) lasen sich keine spezifischen Derivate einzelner Isomerer darstellen, da im Gegensatz zur Acetylierung stets Gleichgewichtsgemische entstehen, deren Komponenten keine mit dem Isomerengemisch des Ausgangspigments vergleichbaren  $R_f$ -

<sup>5</sup> P. KARRER und A. OSWALD, *Helv. Chim. Acta* **18**, 1303 (1935).

Beziehungen zeigen. Über diese Beobachtungen wird an anderer Stelle berichtet. Diatoxanthin und Diadinoxanthin geben nach Jodbehandlung ähnliche Isomerenscharen wie Zeaxanthin und Antheraxanthin,<sup>6</sup> anders verhält sich Neoxanthin, dessen *cis*-Anteile höhere  $R_f$ -Werte besitzen als die *trans*-Verbindung.<sup>3, 7, 8</sup>

<sup>6</sup> K. EGGER, H. NITSCHE und H. KLEINIG, *Phytochem.* **8**, 1583 (1969).

<sup>7</sup> B. P. SCHIMMER and N. I. KRINSKY, *Biochem.* **5**, 3649 (1946).

<sup>8</sup> K. EGGER und A. DABBAGH, unveröffentlicht.