

Zur Photosynthese grüner Pflanzen, 2. Mitt.:

Massenspektroskopische Untersuchungen an Carotinoiden¹

Von

H. Budzikiewicz, H. Brzezinka und B. Johannes

Aus dem Institut für Molekularbiologische Forschung,
Mascheroder Weg 1, D-3301 Stöckheim

Mit 22 Abbildungen

(Eingegangen am 11. August 1969)

Die Massenspektren der wichtigsten Strukturtypen von Carotinoiden werden auf ihre charakteristische Fragmentierung untersucht und Zerfallsmechanismen an Hand von exakten Massenmessungen und Markierungsversuchen diskutiert.

Photosynthesis in Green Plants II: Mass Spectrometric Investigation of Carotinoids

The characteristic fragmentation of the most important structural types of carotinoids is investigated and fragmentation mechanisms are discussed on the basis of exact mass measurements and labelling experiments.

Im Rahmen unserer Untersuchungen¹ über den Sauerstoff-stoffwechsel grüner Pflanzen wird auch die Rolle, die die Carotinoide bei der Photosynthese und beim Sauerstofftransport spielen, untersucht. Da aber diese Verbindungen, besonders beim Arbeiten mit ¹⁸O-markiertem Material, meist nur in geringen Mengen isoliert werden können, erscheint die Massenspektroskopie die geeignetste Methode zur Charakterisierung und Identifizierung. Überdies ist es von Interesse, ob das Fragmentierungsmuster bei Markierungsversuchen Aussagen über Art und Verteilung des eingebauten ¹⁸O erlaubt.

In der Literatur sind bereits mehrfach massenspektroskopische Daten von Carotinoiden publiziert. In den meisten Fällen handelt es sich jedoch nur um die Angabe charakteristischer Peaks oder um Partialspektren, die keine Aussage erlauben, ob ¹⁸O-Satelliten bei geringer Einbaurate tatsächlich zu erkennen sind. Auch sind alle bisherigen Untersuchungen auf 70 eV beschränkt, was zu intensiver Sekundär-

¹ 1. Mitt.: H. Budzikiewicz, H. Eckau und H. H. Inhoffen, Z. Naturforsch. **24b**, 1147 (1969).

fragmentierung im unteren Massenbereich führt und dort die Spektren unübersichtlich macht.

Da Fragmentierungsmechanismen bisher nur auf Grund von exakten Massenmessungen (im Text als *MM* gekennzeichnet) vorgeschlagen worden sind, sollen sie durch Deuterium- und Substituenten-Markierung überprüft sowie für die wichtigsten Strukturtypen bezüglich der strukturellen Voraussetzungen untersucht werden, um den Aussagewert bestimmter Fragmente bei Strukturermittlungen abschätzen zu können. Da die Originalliteratur ziemlich verstreut ist, wird gleichzeitig ein kurzer Überblick über die bereits vorhandenen Ergebnisse gegeben.

1. Allgemeines

Infolge ihrer geringen Flüchtigkeit ist zur Messung von Carotinoiden selbst bei Direkteinführung der Substanz in die Ionenquelle meist eine Quellentemperatur von über 200° C erforderlich, wodurch es leicht zu partiellen Veränderungen vor der Ionisierung kommen kann². Ins Auge fallend sind dabei Verlust von Wasser (aus Hydroxyverbindungen) und von Essigsäure (aus deren Acetaten) sowie das Auftreten von Ionen mit Massen $M - 2$ und $M + 2$. Auf andere Beispiele wird später eingegangen. Die hohe Quellentemperatur zusammen mit 70 eV Ionisierungsenergie ergibt überdies intensive Sekundärfragmentierung, die zu zahlreichen Ionen im unteren Massenbereich führt und gleichzeitig charakteristische Primärfragmente zurücktreten läßt.

Durch Messung bei etwa 13 eV kann man diesen Effekt weitgehend unterdrücken. Es werden daher, wenn erforderlich, die 70- und 13-eV-Spektren einander gegenübergestellt. Infolge der extremen Meßbedingungen ist auch die Reproduzierbarkeit der Massenspektren nicht sehr gut; die relativen Peakhöhen können daher nur als qualitatives Indiz für die Fragmentierungsprozesse gewertet werden.

Wichtig für die Bestimmung von Molekulargewicht und Elementarzusammensetzung ist, daß das Molekülion gewöhnlich deutlich zu erkennen, häufig sogar der Basispeak ist, bedingt durch die gute Stabilisierung der Ladung im Polyenchromophor und die energetisch meist ungünstigen Möglichkeiten einer Bruchstückbildung durch einfache Bindungsspaltung der konjugierten Systeme.

2. Carotin-Kohlenwasserstoffe und einfache funktionelle Derivate

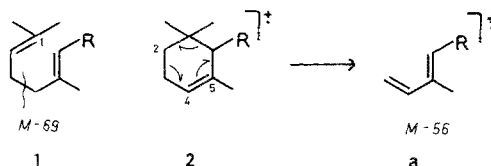
a) Kohlenwasserstoffe

Die sechs natürlich vorkommenden Carotine der Summenformel $C_{40}H_{56}$ (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Carotin und Lycopin) wurden bereits von *Schwietzer* et al.

² H. Budzikiewicz, Z. anal. Chem. **244**, 1 (1969).

untersucht³. Verlust einer Methylgruppe ist in allen Fällen minimal (vgl. Abb. 1). Allylsplattung führt bei Verbindungen mit der Partialstruktur **1** zum Verlust von C_5H_9 ($M-69$), ist eine C-1-Methylgruppe substituiert⁴, zur Abspaltung von $C_5H_8X^+$. Liegt ein Cyclohexenrest mit 4,5-Doppelbindung vor (z. B. **2**), so tritt RDA^* (**2** $\rightarrow$ **a**) ein; diese Zerfallsweise wird auch bei den C_{50} -Carotinoiden (am C-2 substituierte Derivate von **2**) beobachtet⁵. Sauerstofffunktionen in Allylstellung zur Doppelbindung scheinen jedoch den RDA zu unterdrücken. So wird bei Lutein (**4**) Verlust von 56 u weder von M^+ noch von $[M-18]^+$ aus beobachtet, desgleichen wird für Rhodoxanthin (3,3'-Dioxo-retro-dehydro- β -Carotin) kein $[M-56]^+$ angeführt⁶.

Die Strukturspezifität dieser beiden Fragmente steht mit der Beobachtung von Spiteller⁷ im Einklang, daß bei verzweigten ungesättigten Kohlenwasserstoffen Doppelbindungswanderung unterdrückt und damit charakteristische Fragmentierung ermöglicht wird.



Ionen, die bei allen untersuchten Carotinoiden beobachtet werden, treten bei $M-92$ und $M-106$ auf; ihre Entstehung ist als Bildung von Toluol bzw. Xylol aus der Polyenkette und Rekombination der Reste interpretiert worden³. Für $M-92$ wird stets ein m^+ beobachtet; für $M-106$ selbst bei Cyclopentylcarotinoiden (Abschnitt 5), bei denen es die höchste Intensität erreicht, jedoch nicht. Ob $M-92$ partiell und $M-106$ partiell oder vollständig durch thermische Zersetzung entsteht, läßt sich an Hand des vorliegenden Materials jedoch nicht eindeutig klären.

Das Spektrum von Zeaxanthin-8-d (**6**) zeigt, daß C-8 an der Bildung des M -Toluol-Fragments nicht beteiligt sein kann, da das D quantitativ zurückbehalten wird. Analoge Aussagen bezüglich $M-106$ sind bei

* Zur hier verwendeten Nomenklatur siehe: H. Budzikiewicz, *Organic Mass Spectrometry*, 2, 253 (1969).

³ U. Schwietzer, H. R. Bolliger, L. H. Chopard-dit-Jean, G. Englert, A. König, M. Kofler, C. v. Planta, R. Rüegg, W. Vetter und O. Isler, *Chimia [Aarau]* **19**, 294 (1965).

⁴ L. Cholnoky, J. Szabolcs und E. S. Waight, *Tetrahedron Letters* **16**, 1931 (1968); M. C. Markham und S. Liaaen-Jensen, *Phytochem. [London]* **1968**, 839.

⁵ S. Liaaen-Jensen, S. Hertzberg, O. B. Weeks und U. Schwietzer, *Acta Chem. Scand.* **22**, 1171 (1968).

⁶ H. Mayer, M. Montavon, R. Rüegg und O. Isler, *Helv. Chim. Acta* **50**, 1606 (1967).

⁷ G. Spiteller, „Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen“, Verlag Chemie, Weinheim, 1966, S. 98; M. Kraft und G. Spiteller, *Org. Mass Spectrom.* **2**, 865 (1969).

dieser Verbindung wegen der geringen Intensität des Ions nicht möglich. Die $M-92$ - und $M-106$ -Ionen können ihrerseits in gleicher Weise wie M^+ weiter zerfallen (-69 , -56 u etc.).

Enzell et al.⁸ haben gezeigt, daß das Verhältnis $(M-92)/(M-106)$ von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen in der Polyenkette abhängt.

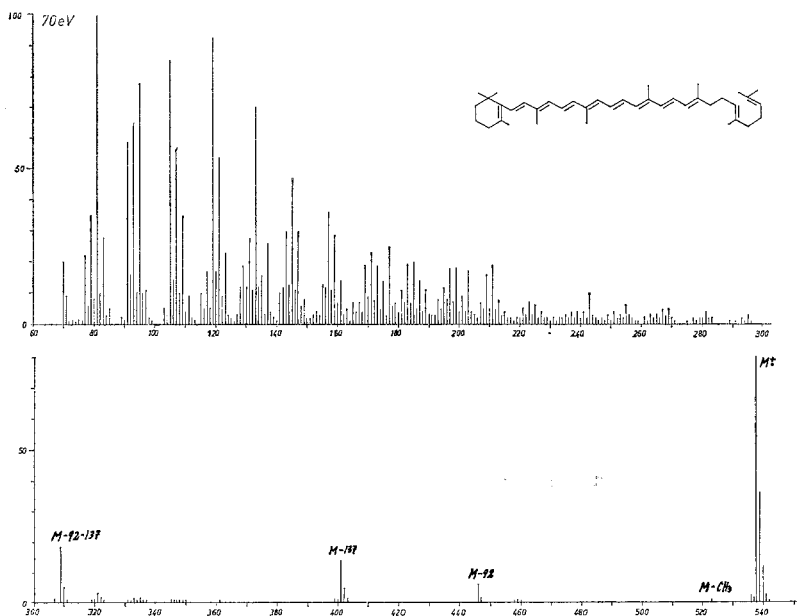


Abb. 1. Massenspektrum von β -Zeacarotin (3)

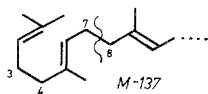
Obwohl die Intensitäten dieser Ionen mit Gerätetyp und Meßbedingungen variieren, stimmen die Intensitätsverhältnisse bei unseren Messungen größenordnungsmäßig mit den Werten von Enzell gut überein.

Die Intensitäten der in der Literatur häufig diskutierten Kohlenwasserstoff-Ionen im unteren Massenbereich ($C_7H_8^+$, $C_8H_{10}^+$, $C_7H_7^+$, $C_8H_9^+$) hängen sehr von den Meßbedingungen ab. Dies bestätigt die Annahme³, daß es sich dabei um thermische Zersetzungsprodukte und deren Folge-Ionen handeln dürfte. An- bzw. Abwesenheit und Intensität dieser Peaks ist daher von geringem Aussagewert in bezug auf den diskutierten Strukturtyp.

Zu erwähnen sind noch $M-80$ ($M-C_6H_8$) und $M-158$ ($M-C_{12}H_{14}$), die bei den Carotin-Kohlenwasserstoffen von sekundärer Bedeutung sind, bei bestimmten Derivaten aber höhere Intensität zeigen und daher in Absch. 3 und 2b besprochen werden sollen.

⁸ C. R. Enzell, G. W. Francis und S. Liaaen-Jensen, Acta Chem. Scand. 22, 1054 (1968).

β -Zeacarotin (7,8-Dihydro- γ -carotin), **3** (Abb. 1), besitzt zwei doppelt allylische Bindungen (3,4 und 7,8). Da jedoch die Ladung bevorzugt im Polyenchromophor lokalisiert ist, wird nur der Verlust von $C_{10}H_{17}$ ($M-137$) beobachtet (m^*). Daneben treten $M-92$ und dessen Folgeprodukte ($M-92$)—137 (m^*) auf, während $M-106$ praktisch fehlt, wie es die Regel von *Enzell* (s. o.) verlangt. Interessant ist die Beobachtung eines m^* bei m/e 177,5, der der kombinierten Abspaltung von $(92 + 137)$ entspricht. Bei Aufnahme des Spektrums bei 13 eV verschwinden die Sekundärfragmente im unteren Massenbereich praktisch vollkommen (alle Peaks zwischen m/e 60 und 300 unter 5% rel. Int.), im oberen Bereich bleiben nur die charakteristischen Ionen m/e 309 (5%), 401 (4%), 446 (5%) und 538 (M^+ , 100%) zurück.



3

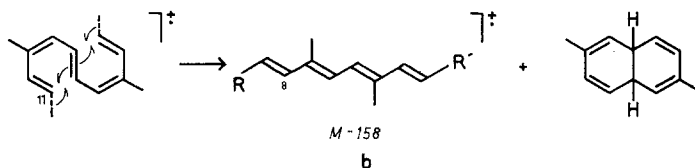
Bevorzugte Spaltung der dem Polyen-System am nächsten gelegenen doppelt allylischen C,C-Bindung(en) wurde inzwischen auch für eine Reihe weiterer Hydrolycopine berichtet⁹.

b) Hydroxy-, Methoxy- und Acetoxyderivate

Die Hydroxyderivate zeichnen sich alle durch mehr oder weniger intensive thermische Wasserabspaltung aus, wie Messungen bei verschiedenen Temperaturen zeigen, wobei besonders allylische OH-Gruppen gefährdet scheinen. So nimmt z. B. bei Lutein (**4**) $M-18$ bei steigender Temperatur stärker zu als bei Zeaxanthin (**5**); Isozeaxanthin (**7**) zeigt am ausgeprägtesten Verlust von 2 Molekülen H_2O .

Die Spektren der Isomeren Lutein (**4**) (Abb. 2), Zeaxanthin (**5**) und Isozeaxanthin (**7**) unterscheiden sich, abgesehen von der erwähnten Wasserabspaltung, nur geringfügig. $M-92$ und $M-106$ sowie um H_2O ärmere Ionen treten auf, ebenso $M-158$ (m/e 410) und $M-158-H_2O$ (m/e 392), alle mit geringer Intensität. Im Spektrum von Zeaxanthin-8-d (**6**) (Abb. 3) erscheinen diese Fragmente nach m/e 411 und 393 verschoben, doch erlaubt die geringe Intensität (6 bzw. 3% rel. Int.) keine quantitative Aussage; zumindest der größte Teil des abgespaltenen $C_{12}H_{14}$ muß jedoch aus der Mitte der Polyenkette (**b**) stammen. Im Spektrum von 4-Hydroxy- β -carotin-4-d (**9**) zeigen alle besprochenen Fragmente die erwartete Verschiebung um eine u.

⁹ B. H. Davies, E. A. Holmes, D. E. Loeber, T. P. Toubé und B. C. L. Weedon, J. chem. Soc. C **1969**, 1266.



Mono- bzw. Diacetate des Zeaxanthins (5) und Isozeaxanthins (7) verhalten sich analog den Hydroxyverbindungen; so verliert nur Isozeaxanthindiacetat, das zwei allylische Acetoxygruppen besitzt, zweimal Essigsäure in beträchtlichem Ausmaß [$M : (M-60) : (M-120) = 75 : 60 : 100$] im Vergleich zu Zeaxanthindiacetat [$M : (M-60) : (M-120) = 100 : 20 : 10$]. In gleicher Weise zeigt 4,4'-Dimethoxy- β -carotin (8) ausgeprägten Verlust von Methanol (50% von M^+). Ansonsten sind sowohl bei den Acetaten als auch bei der Methoxyverbindung nur mehr die durch Abbau der Polyenkette entstehenden Fragmente $M-92$, $M-106$ und $M-158$ sowie deren um CH_3COOH bzw. CH_3OH ärmeren Begleiter zu erwähnen.

3. Carotinoid-5,6- und -5,8-epoxide

Die Massenspektren von fast allen untersuchten Carotinoid-epoxiden zeigen einen mehr oder weniger intensiven Peak bei $M-16$, der wahrscheinlich auf thermische oder katalytische O-Eliminierung zurückzuführen ist. Echte Fragmentierung dürfte jedoch der Verlust von Wasser sein, den auch manche Carotinoide zeigen, die keine OH-Gruppe besitzen¹⁰. Soweit untersucht, unterscheiden sich die Massenspektren der isomeren 5,6- und 5,8-Carotinoid-epoxide bestenfalls in der relativen Intensität bestimmter Fragmente (vgl. Abb. 4 und 5 sowie 10 und 11). Ob dies auf eine Isomerisierung vor der Ionisierung zurückzuführen ist, läßt sich nicht eindeutig beantworten; dafür spricht zumindest die Beobachtung, daß nur die für Dihydrofurane typischen Fragmente beobachtet wurden.

Allgemein zeigen Carotinoid-epoxide intensivere Fragmentierung als die in Abschnitt 2 besprochenen Verbindungen. Die strukturtypischen Bruchstücke sind bei 13 eV-Spektren besser zu erkennen als bei 70 eV, wo Sekundärfragmentierung den unteren Massenbereich sehr unübersichtlich macht.

¹⁰ J. Baldas, Q. N. Porter, L. Cholnoky, J. Szabolcs und B. C. L. Weedon, Chem. Comm. 1966, 852.

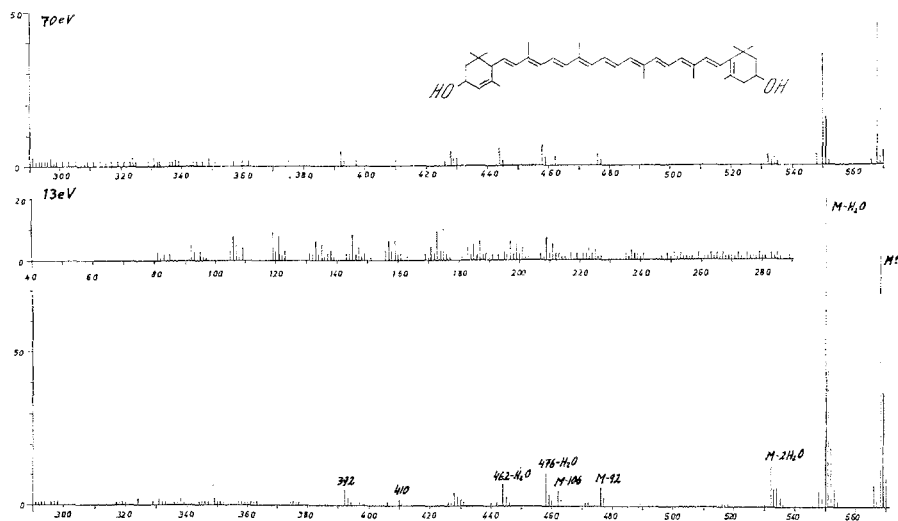


Abb. 2. Massenspektrum von Lutein (4). Das 70-eV-Spektrum zwischen m/e 60 und 300 ist uncharakteristisch und unterscheidet sich — von geringfügigen Unterschieden in der rel. Int. der einzelnen Peakgruppen abgesehen — nicht von dem von 3 (Abb. 1)

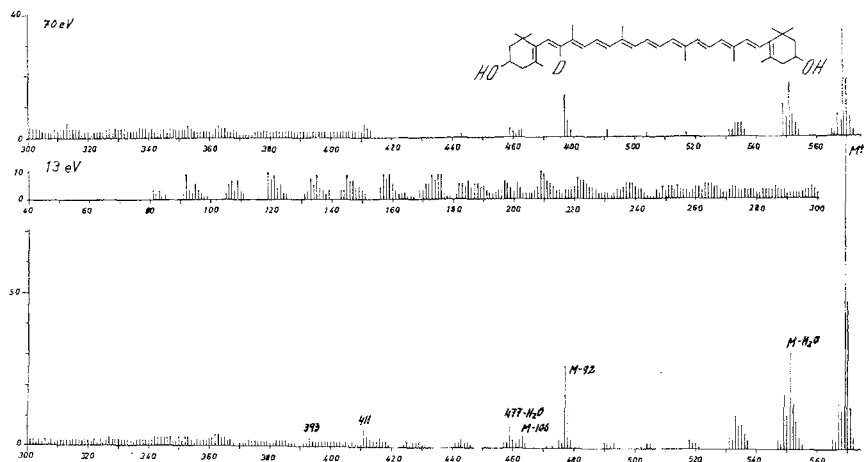
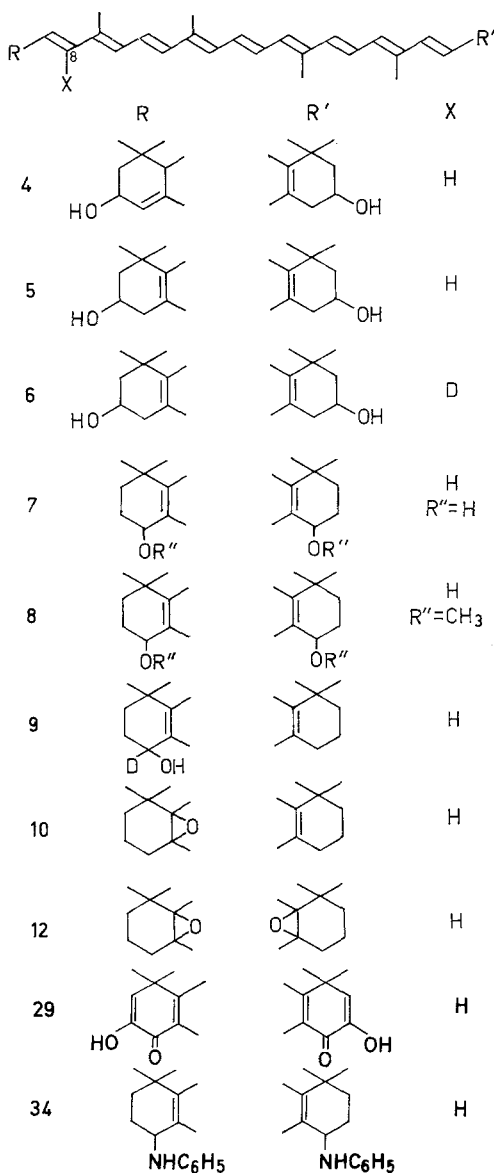


Abb. 3. Massenspektrum von Zeaxanthin-8-d (6). Das 70-eV-Spektrum zwischen m/e 60 und 300 ist uncharakteristisch (vgl. Abb. 1)



Im unteren Massenbereich werden intensive Ionen bei m/e 164 + R und m/e 204 + R beobachtet, denen *Baldas et al.*^{10, 11} auf Grund von *MM* die Strukturen **c** und **d** zuschreiben.

¹¹ R. Bonnett, A. K. Mallams, A. A. Spark, J. L. Tee, B. C. L. Weedon und A. McCormick, J. Chem. Soc. C **1969**, 429.

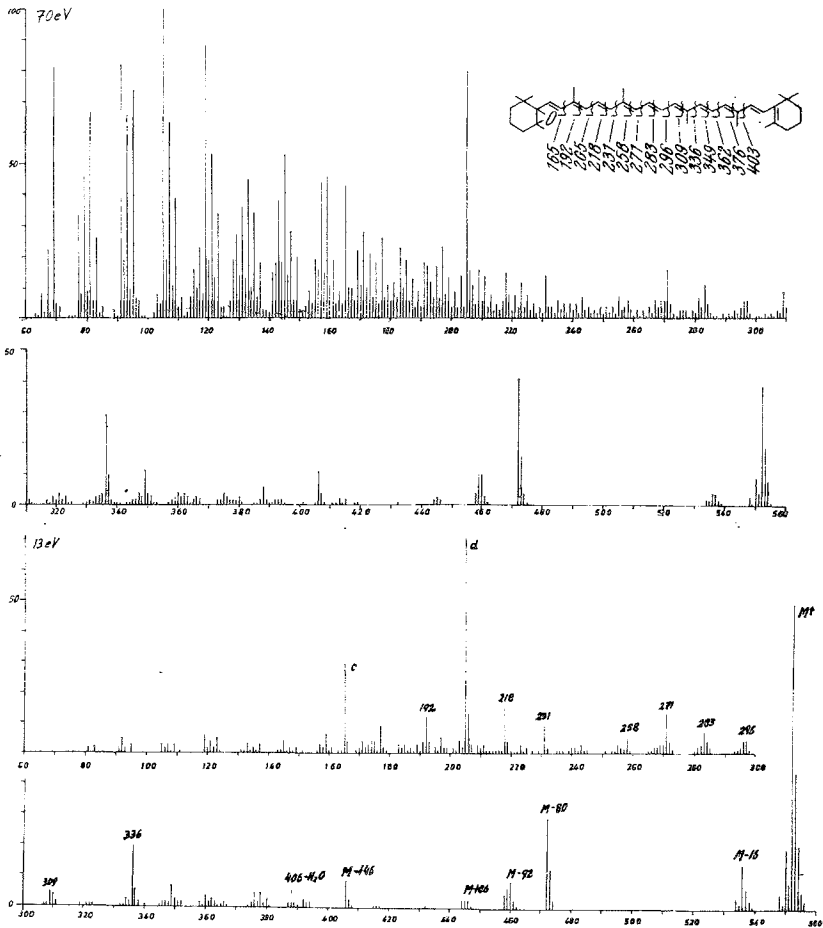
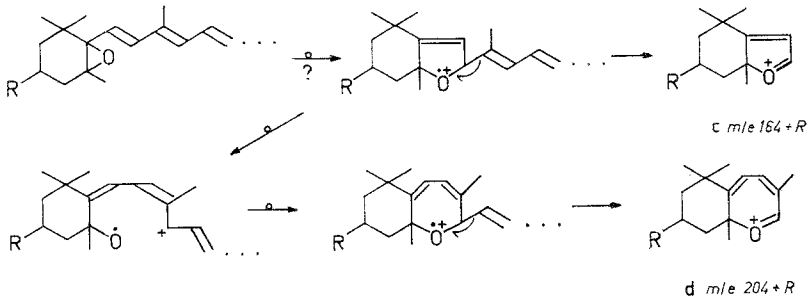


Abb. 4. Massenspektrum von β -Carotin-5,6-monoepoxid (10)

Das Fragment **c** wird bei allen Carotinoid-epoxiden beobachtet, welche die für die skizzierten Bildungsweisen notwendigen Strukturelemente besitzen (vgl. Abb. 4—13). Entsprechend tritt es bei Fucoxanthin (**21**, Abb. 14) und Fucoxanthol (**23**) nicht hervor und fehlt bei

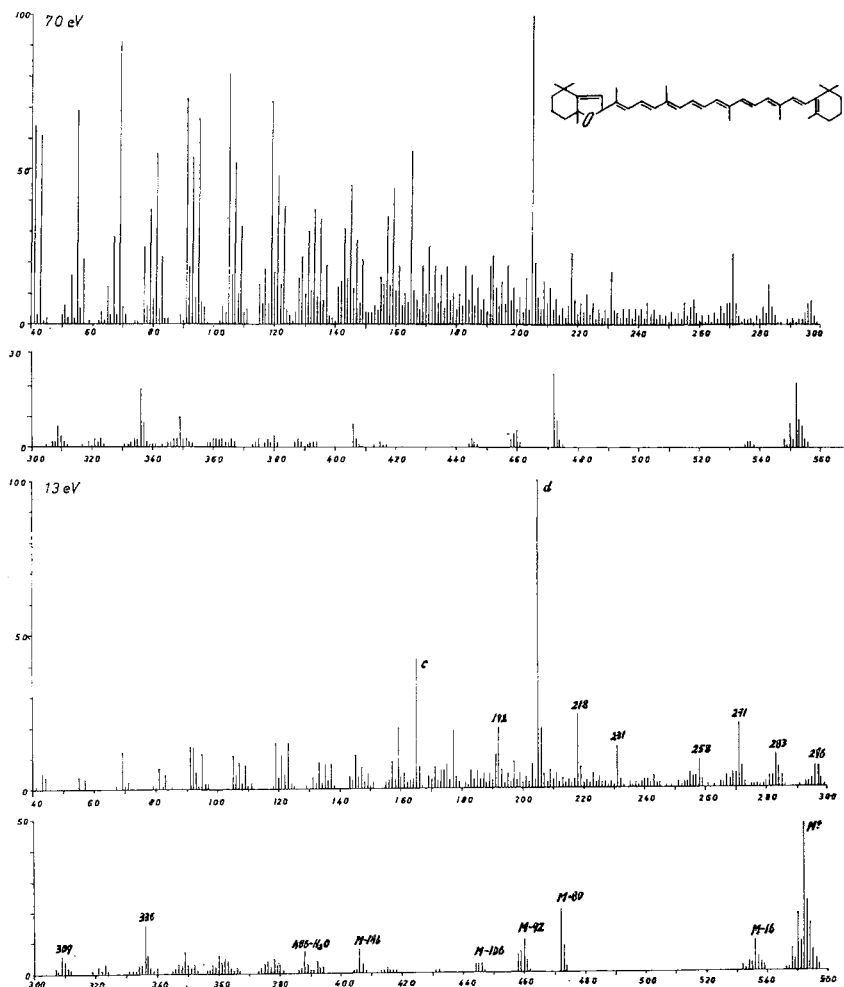


Abb. 5. Massenspektrum von β -Carotin-5,8-monoepoxid (= Mutatochrom) (**11**)

nicht-epoxidischen Verbindungen. Einzig für Isofucoxanthol (**25**) wird das Auftreten von **c** (m/e 181) berichtet¹¹, doch dürfte hier Wasserabspaltung zu einem 5,8-Epoxid der Fragmentierung vorausgehen. Für Struktur und Bildungsmechanismus von **c** spricht weiterhin, daß im

Spektrum von Fucochrom-8-d (19, Abb. 12) dieses Bruchstück bei m/e 182 [entsprechend $C_{11}H_{16}DO_2$ (*MM*)] auftritt.

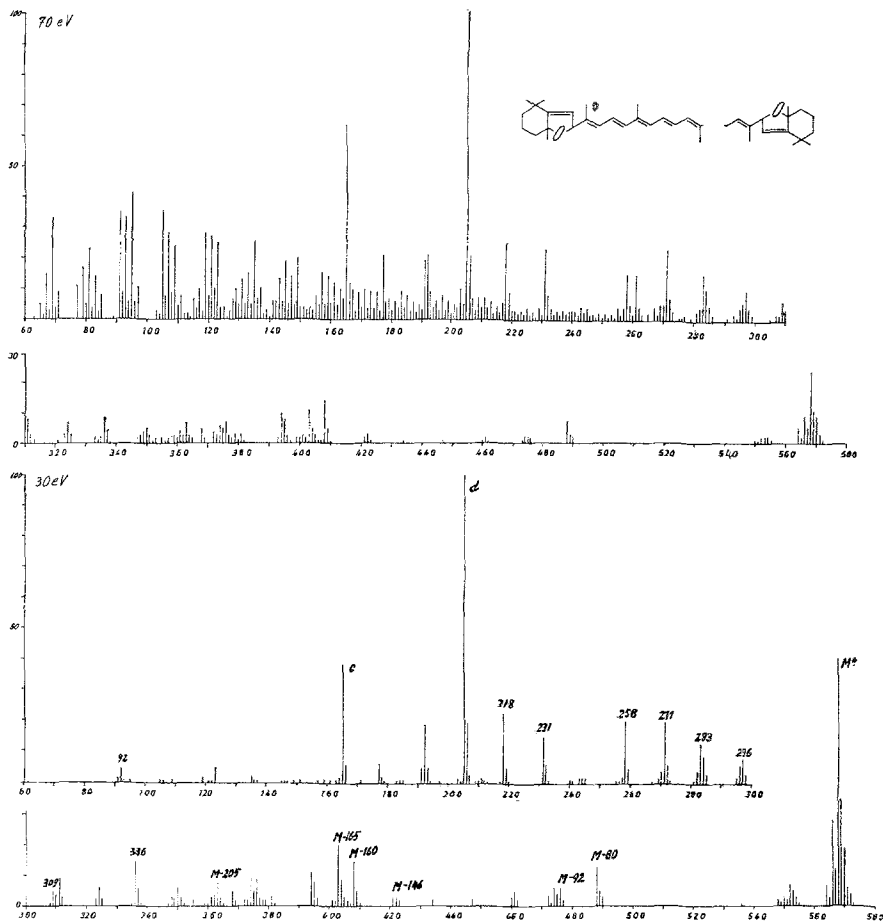


Abb. 6. Massenspektrum von β -Carotin-5,8,5',8'-diepoxid (= Aurochrom) (13). Anm. bei der Korrektur: In der Formel ergänze man eine konjugierte CH -Gruppe; das zweite Spektrum wurde nicht bei 30 eV aufgenommen, sondern bei 13 eV.

Problematisch ist hingegen der diagnostische Wert von **d**. Es wird zwar bei allen Verbindungen beobachtet, die die für die angegebene Bildungsweise notwendigen strukturellen Voraussetzungen aufweisen, tritt aber auch bei Fucoxanthin (21, Abb. 14) (*MM*) und Isfucoxanthin (22, Abb. 15) auf [bei Fucoxanthol (23) ist es nicht eindeutig zu erkennen]. Überdies wird im Spektrum von Fucochrom-8-d (19, Abb. 12) nur ein

Teil der Peaks nach m/e 222 ($C_{14}H_{20}DO_2$, MM) verschoben, während der größere Teil bei m/e 221 ($C_{14}H_{21}O_2$, MM) verbleibt. Man könnte bei **19** an eine Cyclisierung, ausgehend von der 5'-OH-Gruppe (möglicherweise unter Wanderung der einen allenischen Doppelbindung zur Konjugation) denken ($e \rightarrow f$), doch sollte man dann das entsprechende Fragment von **21** und **22** bei m/e 263 (wie bei Anthraxanthindiacetat, **20**, Abb. 13)

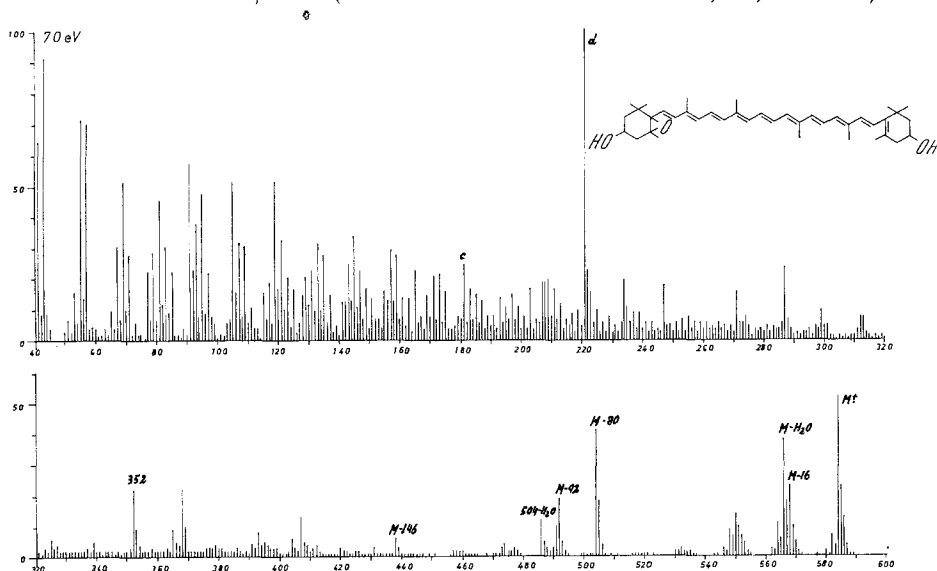
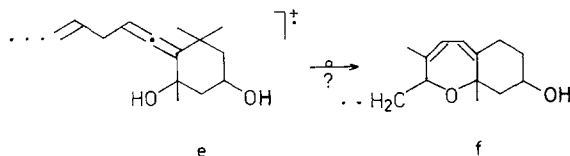


Abb. 7. Massenspektrum von Anthraxanthin (**14**)

erwarten; auch Verlust von Keten von M^+ aus zu den entsprechenden Alkoholen, die dann ihrerseits m/e 221 geben könnten, wird weder bei **21** noch bei **22** (Abb. 14, 15) beobachtet. Gegen eine derartige Cyclisierung spricht auch, daß bei Fucoxanthin-diacetat (**26a**) ein entsprechendes Fragment bei m/e 263, bei Fucoxanthin-bis-trimethylsilyläther (**26b**) bei m/e 293 auftritt. Es gibt somit zwei isobare Bruchstücke, von denen das zweite auch bei Abwesenheit der für die Bildung von **d** notwendigen Strukturelemente entstehen kann.



Die zu **c** und **d** komplementären Fragmente werden nur bei dem 5,6- und 5,8-Diepoxid des β -Carotins (**12**, **13**, Abb. 6), nicht aber bei den

Monoepoxiden (10, 11, Abb. 4, 5) als $M-165$ ($M-C_{11}H_{17}O$, MM) und $M-205$ von mäßiger Intensität beobachtet. Abbau des Molekül-Ions durch Verlust von Kohlenwasserstoffresten wird auch bei den Carotinoid-epoxiden beobachtet (vgl. Abb. 4—13). $M-92$ und $M-106$ bedürfen

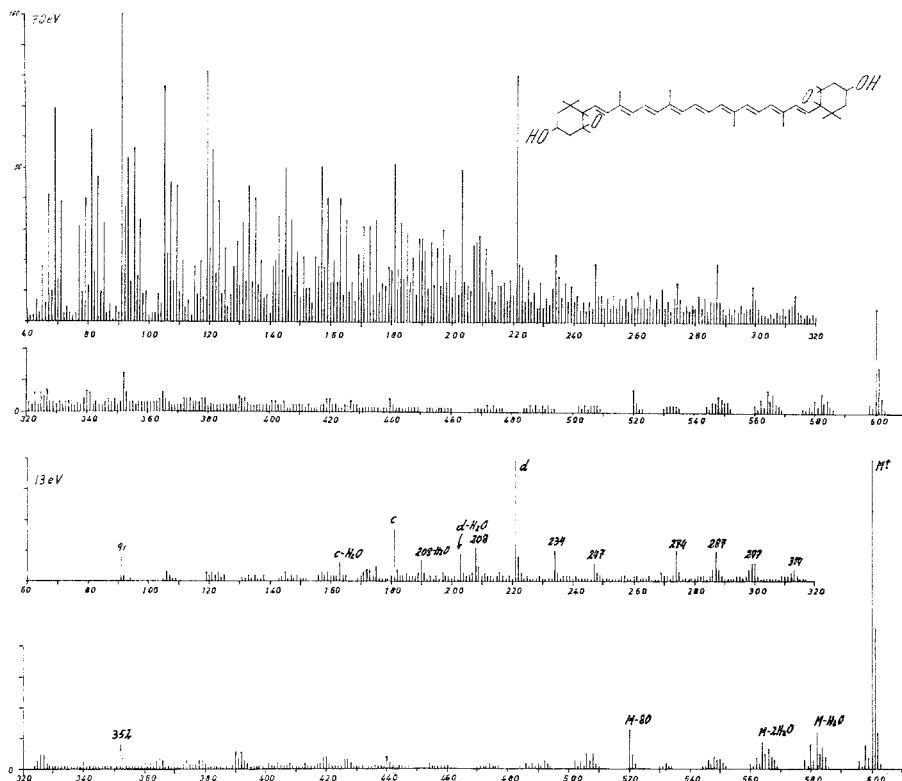
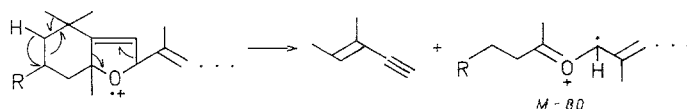


Abb. 8. Massenspektrum von Violaxanthin (15)

keines weiteren Kommentares. $M-80$, das bei den in Absch. 2 besprochenen Verbindungen nur von untergeordneter Bedeutung ist, tritt hier stärker hervor¹⁰; bei Di-epoxiden wird auch sukzessiver Verlust (m^*) von $2 \cdot 80$ u ($M-C_6H_8$ und $2 \cdot C_6H_8$, MM bei Violaxanthin) beobachtet. Bonnett et al.¹¹ schlagen für diesen Prozeß den folgenden Mechanismus vor:



Mit dieser Formulierung nicht im Einklang steht der Befund, daß Fucochrom-8-d (19, Abb. 12) 81 u und somit das D-Atom von C-8 verliert. Dies bedeutet, daß entweder C-8 abgespalten wird, oder daß

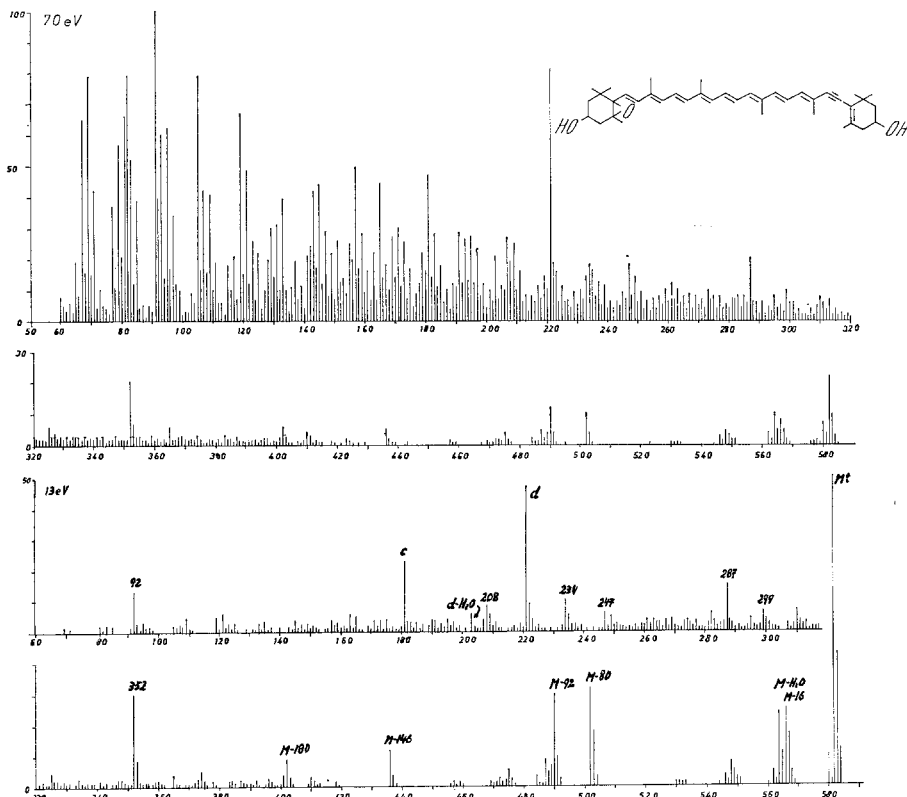
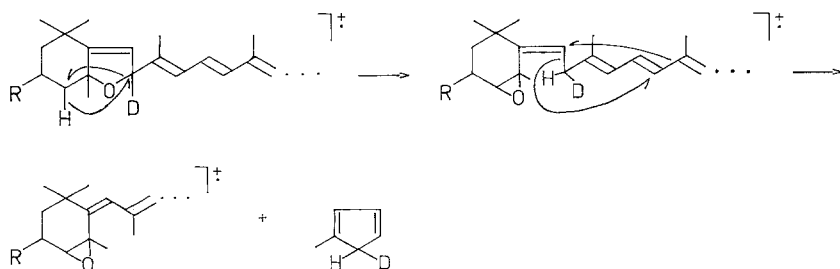


Abb. 9. Massenspektrum von Diadinoxanthin (16)

D-Wanderung erfolgt. Eine Erklärung, die an den für den Verlust von Toluol, Xylol und Dimethyldihydronaphthalin vorgeschlagenen Mechanismus erinnert, wäre auch hier Abspaltung eines Teils der Polyenkette.



M—18—80 bei Isofucoxanthol¹¹ (25) und *M*—18—81 bei Fucoxanthol-8-d (24, Abb. 16) dürfte wieder durch vorausgehende Ausbildung eines 5,8-Epoxids unter H₂O-Abspaltung zu erklären sein.

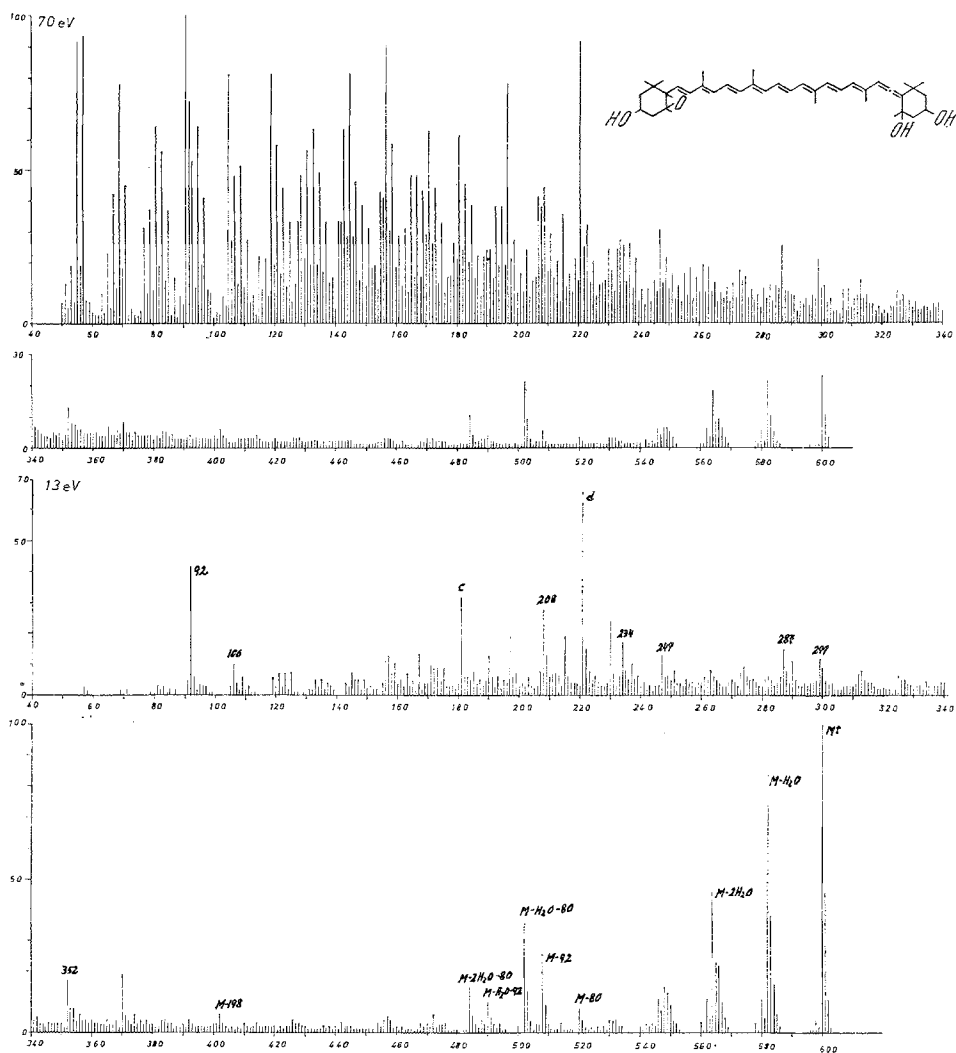


Abb. 10. Massenspektrum von Neoxanthin (17)

Das 5,6- und 5,8-Monoepoxid des β -Carotins (10 und 11, Abb. 4, 5) sowie auch die Mono-epoxide Antheraxanthin (14, Abb. 7) und Diadinoxanthin (16, Abb. 9) zeigen Verlust von 146 (*M*—C₁₁H₁₄, *MM* bei 11)

und 164 u ($146 - \text{H}_2\text{O}$, *MM* bei 11 und 14). Bei den Diepoxiden (vgl. Abb. 6, 8) sind die entsprechenden Ionen weniger stark ausgeprägt. Es handelt sich offensichtlich auch hier um Verlust eines Teiles der Polyenkette, gefolgt von Abspaltung von H_2O , das bei den OH-freien Verbindungen

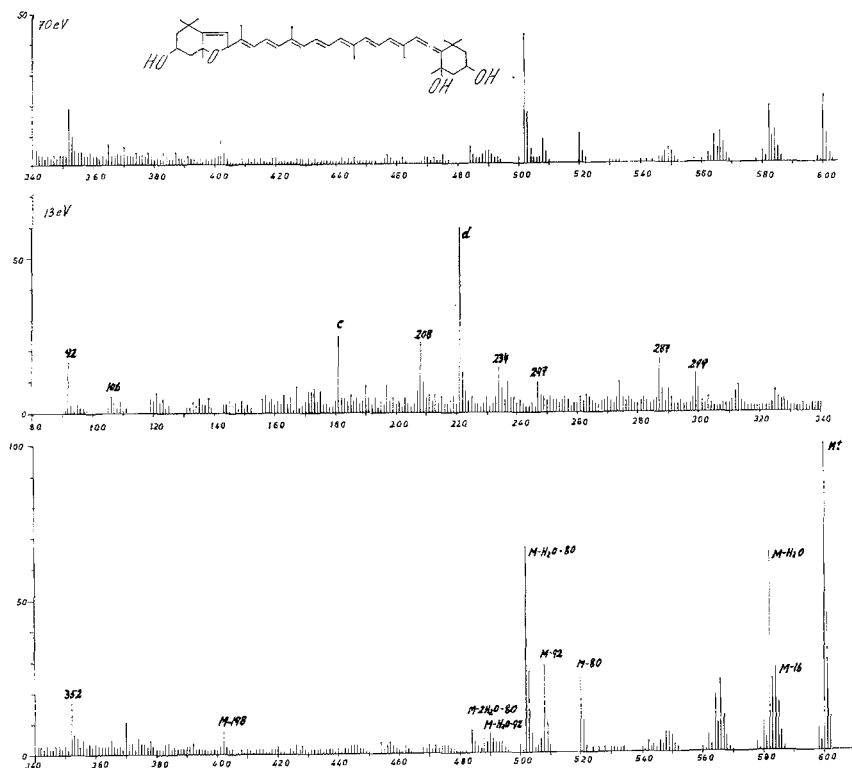
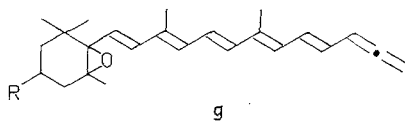


Abb. 11. Massenspektrum von Foliachrom (18). Das 70-eV-Spektrum unterscheidet sich zwischen m/e 60 und 320 praktisch nicht von dem von 17 (Abb. 10)

dungen aus der Epoxidgruppe stammen muß. Ein weiteres intensives Ion gerader Masse tritt bei den β -Carotinmono- und -diepoxiden (10, 11,



12, 13, Abb. 4, 5, 6) bei m/e 336 ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}$, *MM* bei 11), bei Anthraxanthin (14, Abb. 7), Violaxanthin (15, Abb. 8), Diadinoxanthin (16, Abb. 9), Neoxanthin (17, Abb. 10) und Foliachrom (18, Abb. 11) bei m/e 352

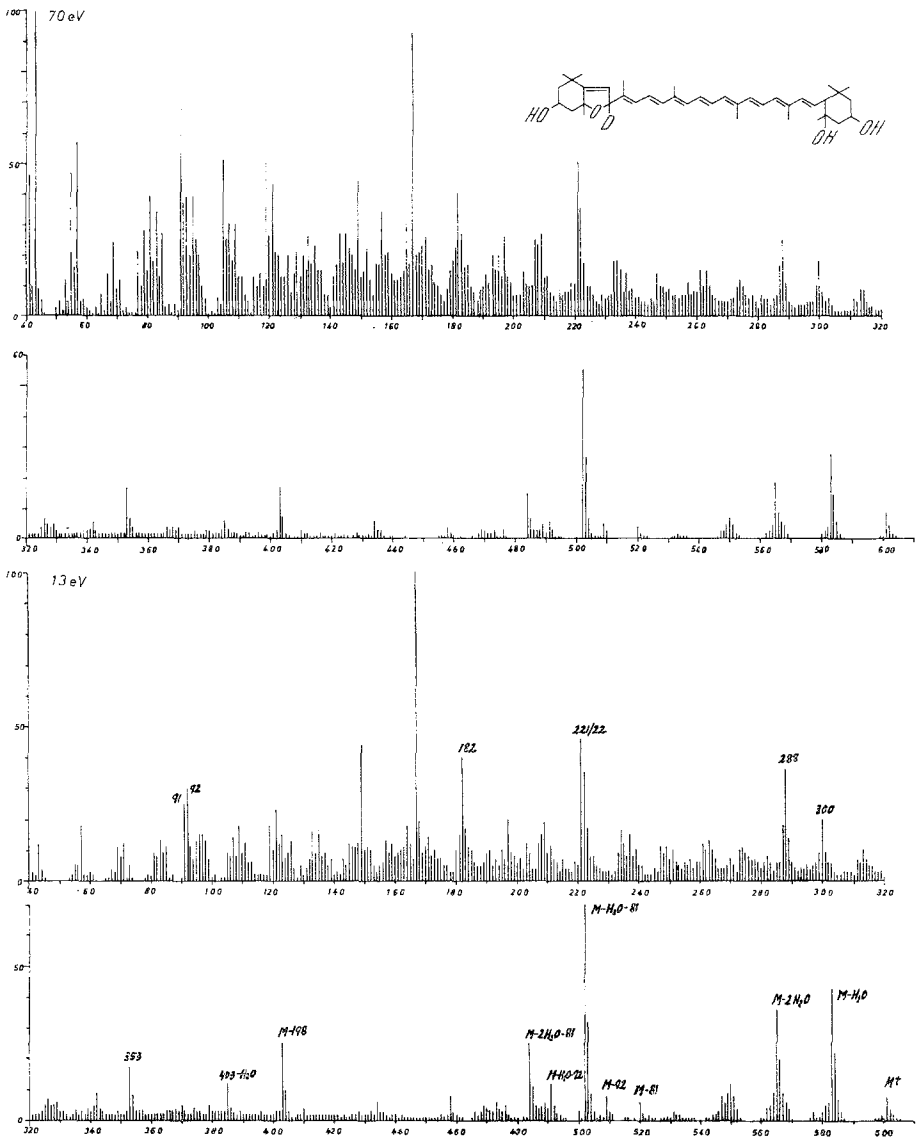


Abb. 12. Massenspektrum von Fucochrom-8-d (19). Anm. bei der Korrektur: In der Formel fehlt die allenische Doppelbindung (vergl. Formel in Abb. 11)

($C_{24}H_{32}O_2$, *MM* bei 14) und bei Antheraxanthin-diacetat (20, Abb. 13) und Neoxanthin-diacetat (17a) bei m/e 394 auf. Es ist somit durch Verlust eines Ringes und eines Teiles der Kette entstanden und kann als **g** bzw. als Abkömmling der isomeren 5,8-Epoxide formuliert werden.

Es wird noch eine Reihe weiterer Fragmente beobachtet, die formal durch Spaltung von Bindungen der Polyenkette mit oder ohne H-Umlagerung zustande kommen. Ob hierbei cyclische Ionen (wie bei c und d) entstehen, läßt sich nicht beantworten. Die beobachteten Massenzahlen sind im Spektrum von β -Carotin-5,6-mono-epoxid (**10**, Abb. 4) in der

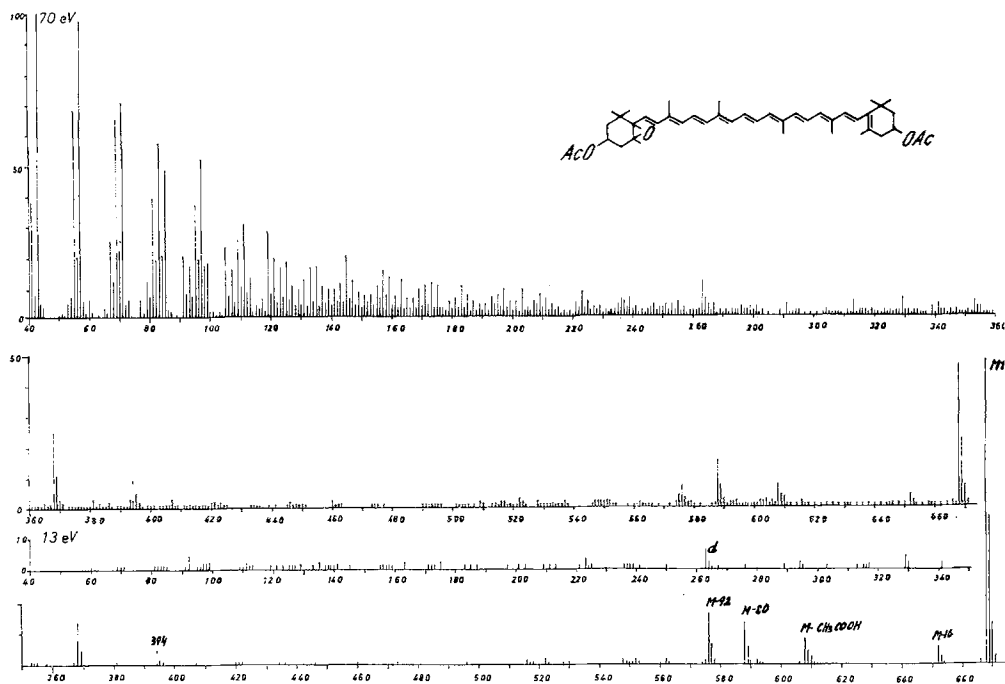


Abb. 13. Massenspektrum von Antheraxanthin-diacetat (**20**)

Formel eingezeichnet. Bei den Hydroxyderivaten (z. B. Antheraxanthin, **14**, Abb. 7) sind sie entsprechend um 16 u verschoben.

Die OH-substituierten Monoepoxide Antheraxanthin (**14**, Abb. 7), Neoxanthin (**17**, Abb. 10), Foliachrom (**18**, Abb. 11), Diadinoxanthin¹² (**16**, Abb. 9) sowie das Diepoxid Violaxanthin (**15**, Abb. 8) zeigen analoges Fragmentierungsverhalten, doch sind eine Reihe von Ionen von um H₂O ärmeren Satelliten begleitet. Bei Fucochrom-8-d (**19**, Abb. 12) werden die erwarteten Massenverschiebungen um eine Einheit bei den Ionen, die das D behalten, beobachtet.

¹² K. Aitzetmüller, W. A. Svec, J. J. Katz und H. H. Strain, Chem. Comm. 1968, 32.

Bei Antheraxanthin-diacetat (**20**, Abb. 13) und Neoxanthin-diacetat (**17a**) treten die typischen Fragmente zwar auch auf, sind aber von geringerer Intensität als bei den bisher besprochenen Verbindungen. Dies ist möglicherweise auf die niedrigere Meßtemperatur, bedingt durch die

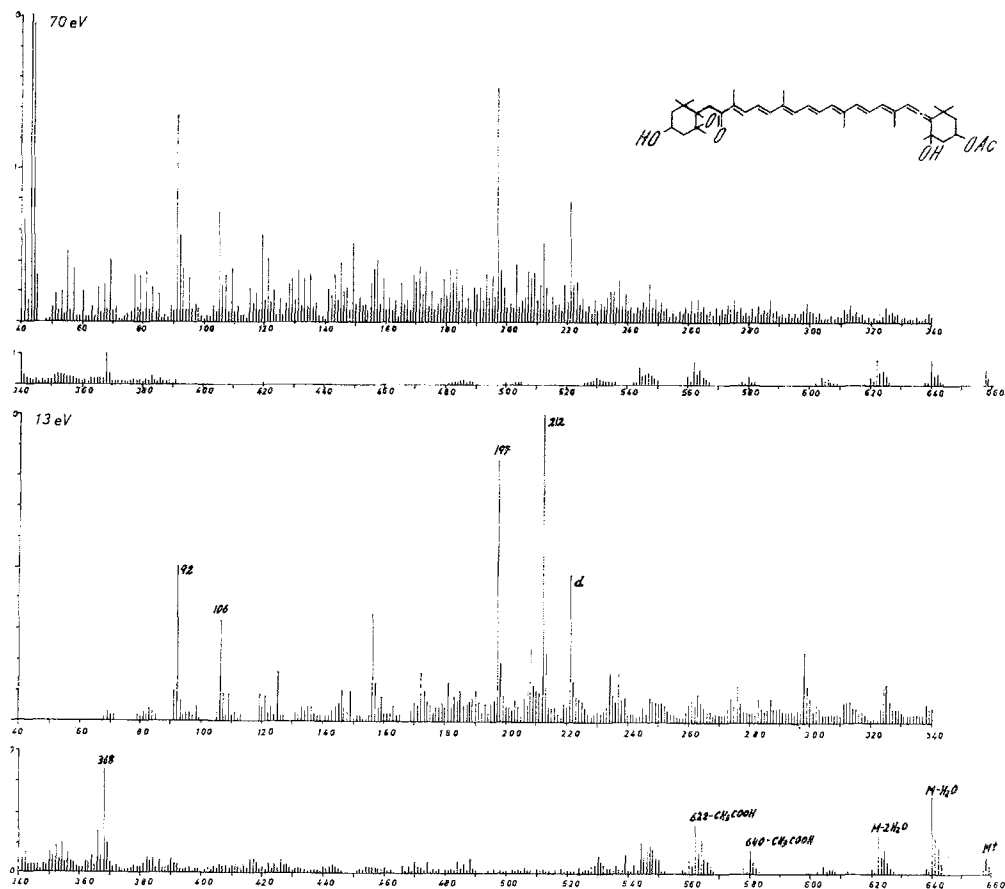


Abb. 14. Massenspektrum von Fucoxanthin (**21**)

bessere Flüchtigkeit, und die damit verbundene geringere thermische Anregung zurückzuführen. Bei allenischen (Neoxanthin **17**, Abb. 10, Foliachrom **18**, Abb. 11, Fucochrom) und acetylenischen (Diadinoxanthin **16**, Abb. 9) Monoepoxiden mit unsubstituierter Polyenkette wird ein Ion bei $M-180$ (1 OH) bzw. 198 (2 OH) (MM bei **19**, $M-C_{11}H_{18}O_3$) beobachtet. Diese Massenverschiebung sowie die Retention des D bei

Fucochrom-8-d (19, Abb. 12) zeigt, daß der rechte Teil des Moleküls verloren wird. Da Neoxanthin-diacetat (17a) Verlust von 240 u zeigt, muß es sich bei der Bildung dieses Fragments um Spaltung der 8',9'-Bindung unter H-Umlagerung (vgl. g), kombiniert mit Verlust des Epoxid-sauerstoffs handeln (h). Möglicherweise ist der Vorläufer dieses Ions der stets vorhandene $M-16$ -Peak.

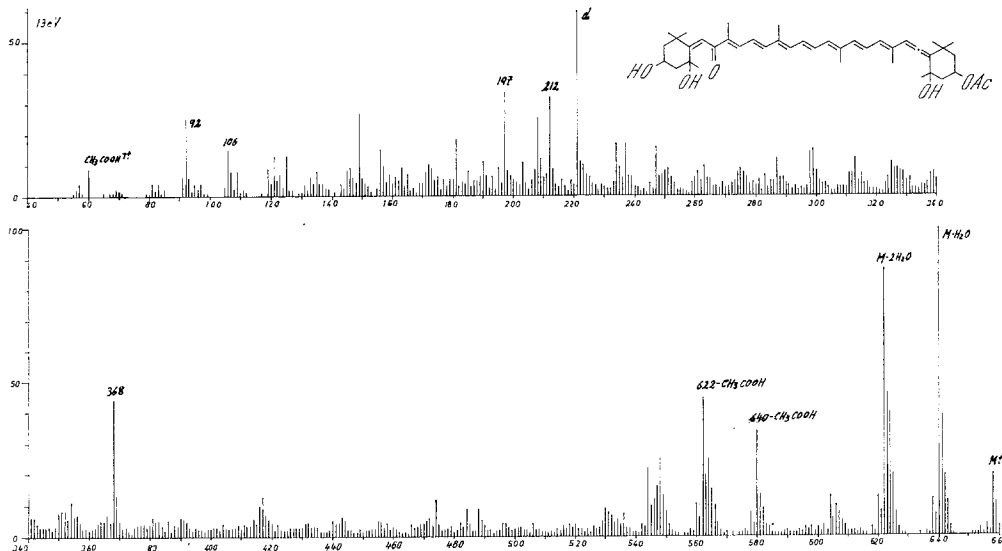
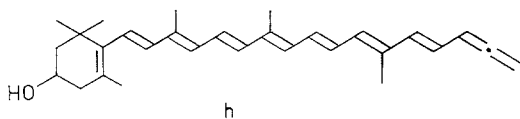


Abb. 15. Massenspektrum von Isofucoxanthin (22)



Epoxidische Carotinoide besonderer Struktur sind Fucoxanthin¹¹ (21, Abb. 14) und Fucoxanthol¹¹ (23). Bei Fucoxanthol (23) fehlen alle charakteristischen Epoxid-fragmente. Neben M^+ wird Verlust von 1, 2 und 3 Molekülen H_2O und in geringem Maß $M-92$ gefolgt von Verlust von H_2O beobachtet. Die einzigen charakteristischen Fragmente sind $M-170$ sowie $M-170-H_2O$ und $M-170-2 H_2O$. Für die Bildung wurde der folgende Mechanismus vorgeschlagen¹¹ (vgl. hierzu¹³), der mit dem Verbleib des D im geladenen Bruchstück bei Fucoxanthol-8-d

¹³ H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, „Mass Spectrometry of Organic Compounds“, Holden-Day Inc., San Francisco 1967, S. 454.

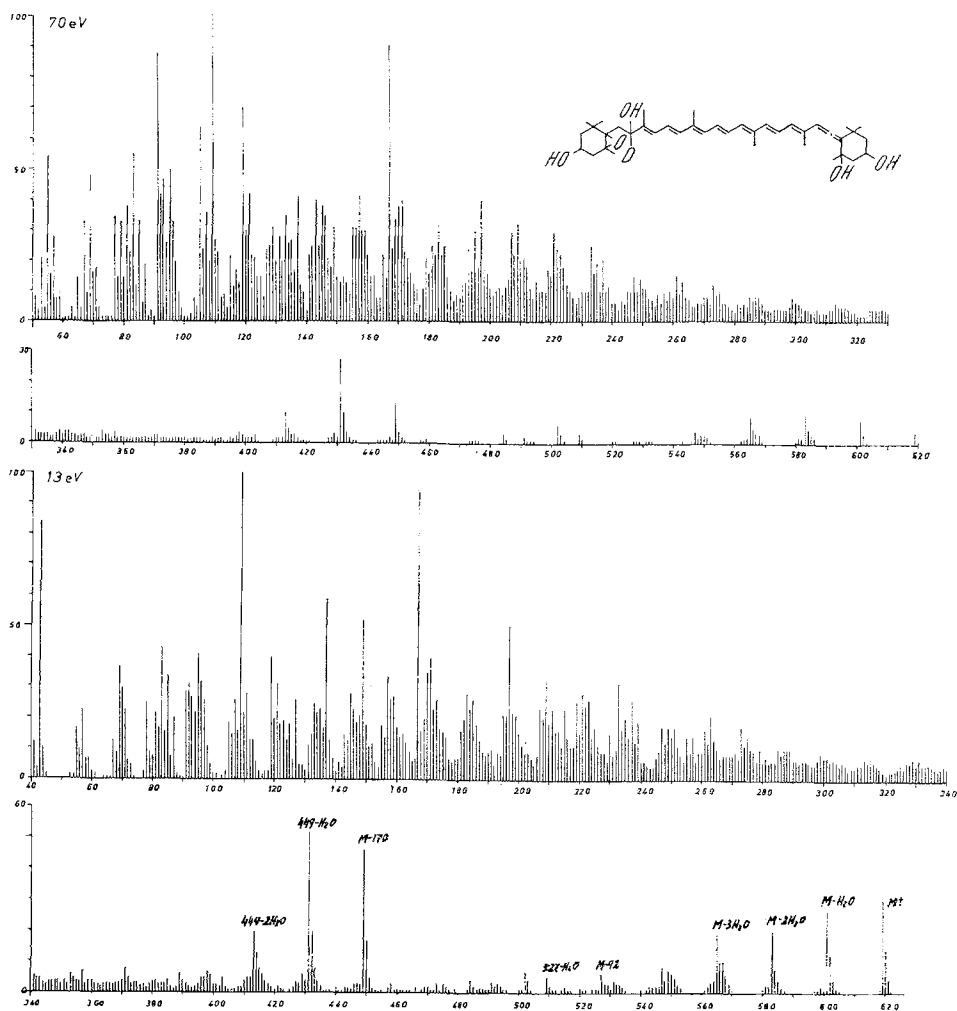
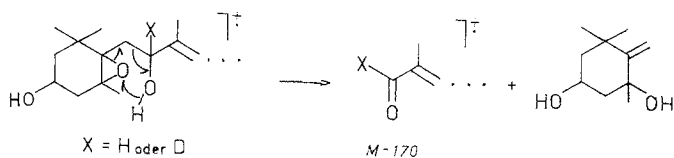
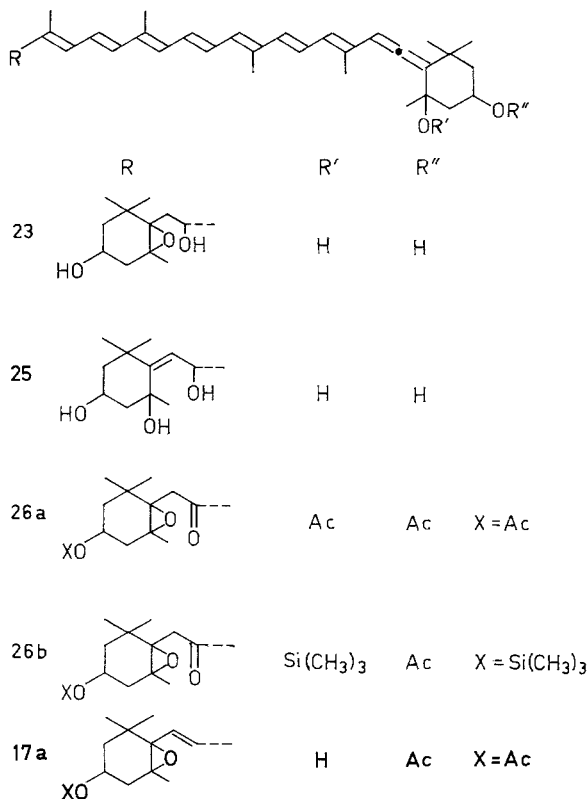


Abb. 16. Massenspektrum von Fucoxanthol-8-d (24)



(24, Abb. 16) im Einklang steht. Bei Fucoxanthin (21, Abb. 14) fehlt dieses Fragment erwartungsgemäß.



Fucoxanthin¹¹ (**21**, Abb. 14) zeigt außer Abspaltung von H₂O und CH₃COOH von M^+ aus eine Reihe charakteristischer Fragmente: m/e 221 (**d**) wurde bereits kommentiert, m/e 368 entspricht **g**. Das Ion m/e 197 (C₁₅H₁₇¹¹) tritt auch im Spektrum des Bis-trimethylsilyläthers (**26b**) bei gleicher Masse auf und stammt daher aus der Polyenkette. Für m/e 212 (*MM*: C₁₆H₂₀), das bei *Bonnett et al.*¹¹ mit bedeutend geringerer Intensität angeführt ist, haben wir keine Erklärung, möglicherweise handelt es sich um eine Verunreinigung. Isofucoxanthin (**22**, Abb. 15) zeigt, da die Epoxidgruppe bei **21** auf die Fragmentierung kaum Einfluß hat, ein dem Fucoxanthin (**21**) sehr ähnliches Spektrum.

4. Carotinoide mit einer Cyclohexenon- bzw. Cyclohexadienongruppierung

Cyclohexenon-derivate zeigen kaum spezifische Fragmentierung. Im oberen Massenbereich tritt mit geringer Intensität Verlust von C₂H₄ (*MM*) einmal bei Echinenon (**27**, Abb. 17) und entsprechend zweimal bei

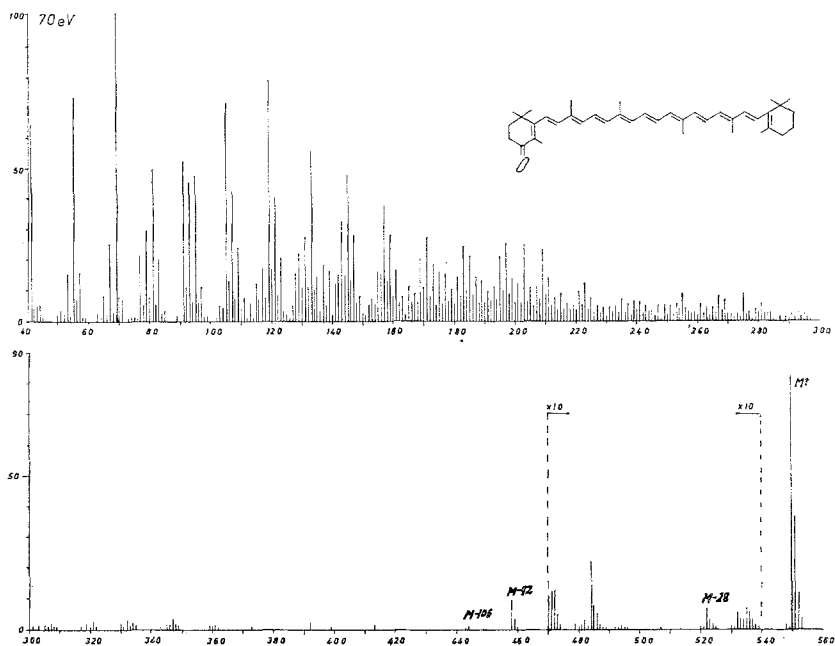


Abb. 17. Massenspektrum von Echinon (27)

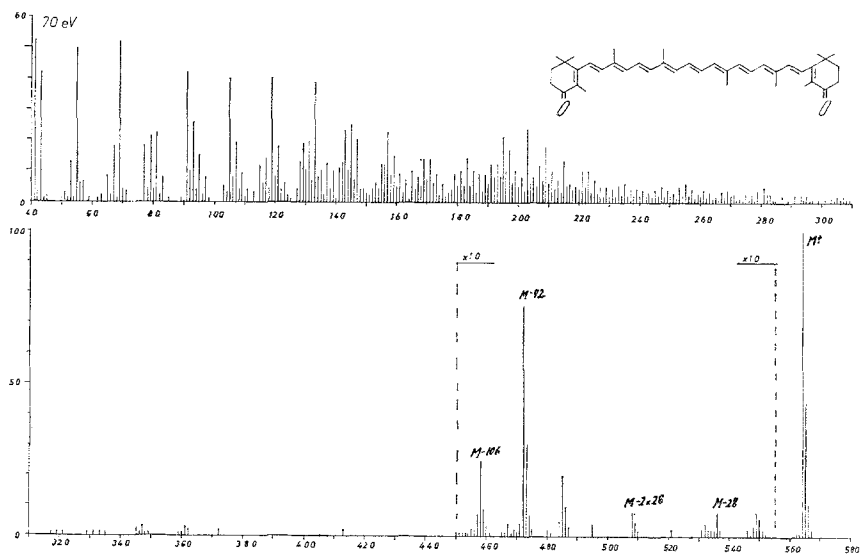
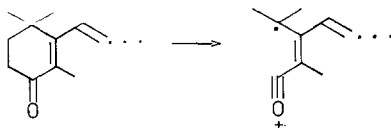
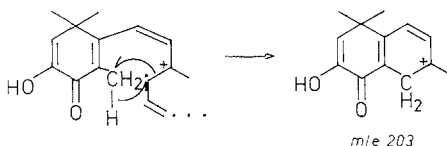


Abb. 18. Massenspektrum von Canthaxanthin (28)

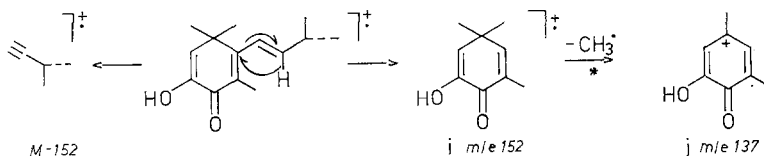
Canthaxanthin (28, Abb. 18) auf, sonst ist nur $M-92$ und $M-106$ zu erkennen.



Beim Dienon Astacin (29) hingegen macht sich die bessere Ladungsstabilisierung im ungesättigten Ring bemerkbar. Der Basispeak (M^+ 4%) erscheint bei m/e 203, und seine Entstehung könnte wie folgt formuliert werden:



Von geringer Intensität sind Ionen bei m/e 152 (11%), die weiter eine Methylgruppe verlieren (m/e 137, 14%) können, sowie $M-152$ (3%), wahrscheinlich **i** und **j**.



Abspaltung von 92 bzw. 106 u tritt mit untergeordneter Bedeutung auf.

In einer während Fertigstellung dieser Arbeit erschienenen Kurzmitteilung kamen *Baldas et al.*¹⁴ bezüglich der Fragmentierung der Cyclohexadienoncarotinoide zum gleichen Ergebnis und stellten überdies fest, daß die entsprechenden Acetate Keten abspalten, und dann wie oben angegeben weiter fragmentieren.

5. Cyclopentyl-carotinoide

Von bereits bekannten Fragmenten sind Verlust von H_2O bei Hydroxyverbindungen und Abspaltung von 92 bzw. 106 u zu erwähnen, wobei $M-106$ besonders ausgeprägt ist.

¹⁴ J. Baldas, Q. N. Porter, A. P. Leftwick, R. Holzel, B. C. L. Weedon und J. Szabolcs, Chem. Comm. 1969, 415.

Die Regel von *Enzell*⁸, die ein umgekehrtes Intensitätsverhältnis verlangen würde, ist hier nicht anwendbar.

Im unteren Massenbereich tritt bei Capsanthin (30, Abb. 19) ein Ion bei m/e 127 (**k**), das noch H_2O verlieren kann, bei Capsanthon (31, Abb. 20) bei m/e 125 (**l**) auf, die, wie *Baldas*¹⁴ gezeigt hat, weiter zerfallen können.

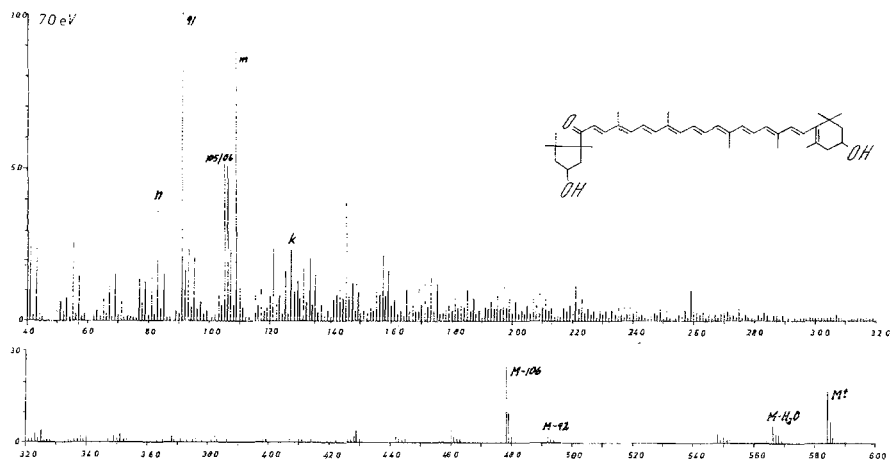
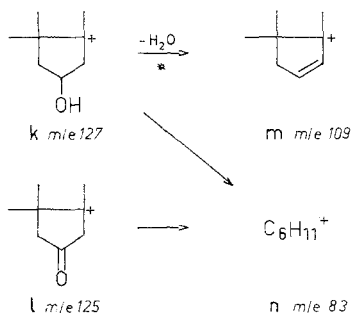


Abb. 19. Massenspektrum von Capsanthin (30)



Capsorubin (32, Abb. 21) zeigt im unteren Massenbereich gleichfalls die Fragmente **l**, **m** und **n**, bei Capsanthol (33, Abb. 22) ist jedoch, offensichtlich bedingt durch das Fehlen der Ketten-Ketogruppe das Zerfallsmuster entsprechend verändert: die typischen Fragmente im unteren Massenbereich fehlen. Verlust von 92 und 106 u von M^+ und von $M-18$ aus wird beobachtet, wobei von M^+ aus die Abspaltung von 106, von $M-18$ aus die von 92 bevorzugt erscheint. Ein Fragment geringer

Intensität tritt bei $M-127$ ($M-k$) auf; von höherer Intensität ist ($M-106$)- k (m/e 353, m^*).

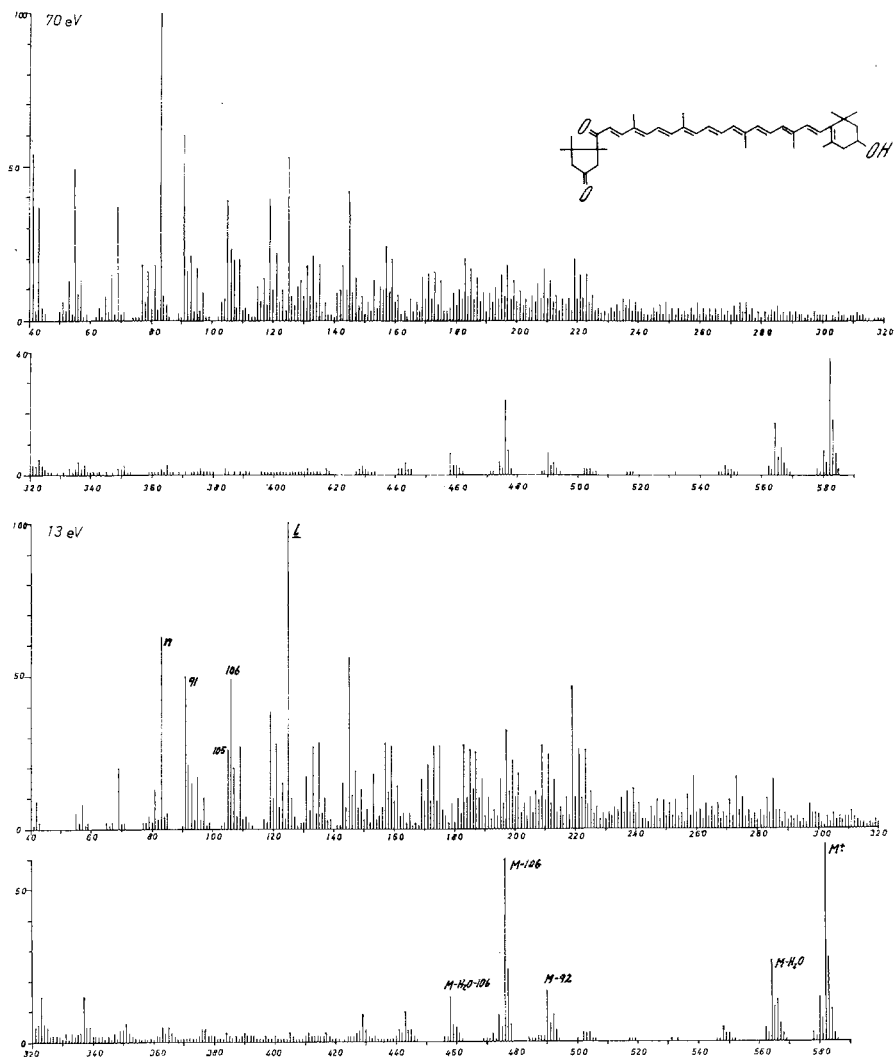


Abb. 20. Massenspektrum von Capsanthon (31)

Bezüglich der von *Baldas et al.*¹⁴ diskutierten Kohlenwasserstoff-Ionen im unteren Massenbereich, die in unseren Spektren mit bedeutend anderen Intensitäten auftreten, s. Abschn. 2a.

6. Besondere Strukturtypen

4,4'-Dianilido- β -carotin (34) zeigt das erwartete Fragmentierungsmuster (vgl. Abschn. 2 b), nämlich Verlust von 92 und 106 u, Abspaltung von Anilin sowie Kombinationen beider Prozesse. Trimethylsilyläther

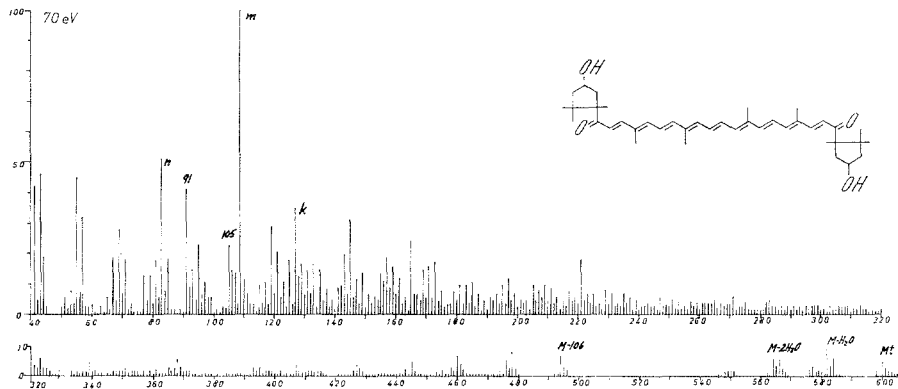


Abb. 21. Massenspektrum von Capsorubin (32)

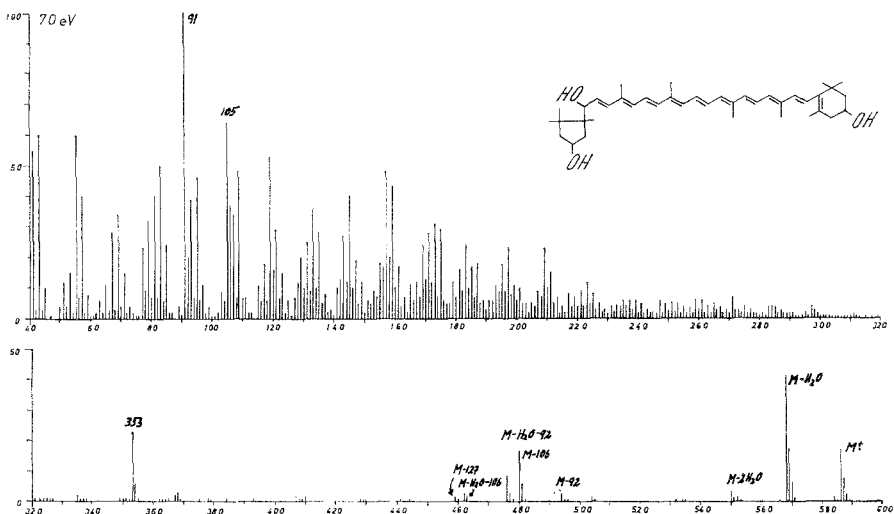


Abb. 22. Massenspektrum von Capsanthol (33)

zeigen Verlust von 90 u (Me_3SiOH)¹⁵. Wie auch Vergleich der Spektren von Fucoxanthin (21) und seinem Bis-trimethylsilyläther (26 b) zeigt, wird sonst das Fragmentierungsmuster nicht beeinflusst.

¹⁵ A. McCormick und S. L. Jensen, Acta Chem. Scand. **20**, 1989 (1966).

Für einige Carotinoide ungewöhnlicher Struktur (Dehydro-2'-plectanixanthinlinoleat¹⁶, Oscilloxanthin¹⁷, Myxoxanthophyll¹⁸) sind Massenspektren in der Literatur diskutiert.

7. Zusammenfassung

Die Untersuchungen haben ergeben, daß besonders die Carotinoid-epoxide, deren Teilnahme am Sauerstofftransport in der Zelle diskutiert worden ist, charakteristische Fragmentierungsmuster geben. Dies ist für die angestrebten ¹⁸O-Markierungsversuche wichtig, da geringe Einbau-raten im Molekül-Ionen-Bereich wegen der stets vorhandenen $M + 2$ - (Hydrierungs-) Peaks nur schwer zu erkennen sind (das Auflösungs-vermögen der heute verwendeten doppelfokussierenden Massenspektro-meter reicht für eine Aufspaltung des Multipletts nicht aus), ein ¹⁸O-Ein-bau bei Fragmenten wie **c** und **d** jedoch besonders bei 13-eV-Spektren leichter nachweisbar sein müßte. Die Massenspektren der übrigen unter-suchten Carotinoid-Klassen haben sich zumindest als soweit charakteri-stisch erwiesen, daß eine Zuordnung in kleinen Mengen isolierter Ver-bindungen zu bestimmten Strukturtypen möglich erscheint. Unter-scheidung isomerer Verbindungen, die sich nur durch die Stellung von OH-Gruppen, die Art des Oxidringes bzw. die Lage von Doppel- und Dreifachbindungen unterscheiden, ist jedoch nur in Ausnahmefällen möglich.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Land Nieder-sachsen (Aufkommen aus der Konzessionsabgabe für das Zahlenlotto) möchten wir für finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. O. Isler (Hoff-mann-La-Roche AG, Basel) und Frl. Dipl.-Biol. U. Schwenker für Proben von Zeaxanthin bzw. Diadinoxanthin, Herrn Dr. P. Kornmann (Meeres-biologisches Institut Helgoland) für seine Unterstützung bei der Be-schaffung von Fucus und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. H. Inhoffen für sein stetes Interesse an dieser Arbeit bestens danken.

Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät MS-9 der Firma AEI unter Verwendung des Direkteinlaßsystems (8 kV, 70 eV bzw. nominal 13 eV, 200—280° Quelltemperatur), die Elektronenspektren mit einem Cary-14 Spektralphotometer gemessen.

Dünnschichtplatten wurden mit einer Suspension von 36 g Kieselgur G, 9 g Kieselgel (< 0,08 mm), 9 g CaCO₃ und 0,06 g Ca(OH)₂ in 100 ml Wasser

¹⁶ M. J. Vacheron, G. Michel, R. Guilluy und N. Arpin, Phytochem. **1969**, 897.

¹⁷ S. Hertzberg und S. L. Jensen, Phytochem. **1969**, 1281.

¹⁸ S. Hertzberg und S. L. Jensen, Phytochem. **1969**, 1259.

(I) bzw. von 75 g Kieselgel ($< 0,08$ mm), 50 g CaCO_3 , 5 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 5 g MgO in 200 ml Wasser hergestellt (II) und 2 Stdn. bei 120° aktiviert.

Isolierung von Carotinoiden

Fucoxanthin (**21**) wurde aus *Fucus serratus* (gesammelt an der Küste von Helgoland) gewonnen. Das von uns angewandte Verfahren¹⁹ unterscheidet sich nur unwesentlich von dem inzwischen von *Bonnett* et al.¹¹ beschriebenen, so daß auf eine eingehende Beschreibung verzichtet werden soll. Zum Unterschied von den genannten Autoren arbeiteten wir jedoch frisches Algenmaterial auf, das zur Entfernung des anhaftenden Schleimes mit einem Aceton—Wasser-Gemisch (40% Aceton) gewaschen, anschließend mit Hilfe eines Fleischwolfes zerkleinert und mit Aceton—Methanol (7 : 3) extrahiert wurde. Neben Fucoxanthin (**21**) konnte β -Carotin, Lutein (**4**), Zeaxanthin (**5**), Violaxanthin (**15**), Isofucoxanthin (**22**) und eine Reihe nicht identifizierter Pigmente isoliert werden. Isofucoxanthin wurde auch durch Umlagerung von Fucoxanthin²⁰ hergestellt.

Die Paprika-Pigmente Capsanthin (**30**), und Capsorubin (**32**) wurden, wie beschrieben²¹, aus *Capsicum annuum* isoliert.

Durch entsprechende Aufarbeitung von *Chlorella pyrenoidosa* Chick.^{22, 23} konnten im Hinblick auf die eingangs erwähnten Stoffwechseluntersuchungen β -Carotin, Lutein (**4**), Zeaxanthin (**5**), Violaxanthin (**15**) und Neoxanthin (**17**) isoliert werden.

Fucoxanthol-8-d (**24**) vgl. ²⁴

150 mg Fucoxanthin (**21**) in 10 ml absol. Äther wurden bei 0°C mit einer Suspension von LiAlD_4 (0,4 g in 4 ml absol. Äther) versetzt, wobei sich die ursprünglich orangerote Lösung gelb färbte. Das Reaktionsgemisch wurde $1\frac{1}{2}$ Stdn. gerührt und hierauf das überschüssige LiAlD_4 durch vorsichtiges Zutropfen des Gemisches von Essigester/Äther zersetzt. Nach Zugabe von Wasser wurde mit einem Äther—Aceton-Gemisch (1 : 1) extrahiert, die organische Phase getrocknet und eingedampft, und der Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 65 mg, *MG* (massenspektrometrisch): 619; λ_{max} (Benzol): 459, 431, 404, 383 nm.

Fucochrom-8-d (**19**) vgl. ^{25, 26}

60 mg **24** wurden in 15 ml 0,01*n*-HCl in CHCl_3 gelöst, wobei ein Farbumschlag nach Braungrün eintrat. Der Fortgang der Umlagerung von **24** in **19** konnte chromatographisch verfolgt werden, da **19** weniger polar als **24** ist. Nach 20 Min. wurde die im Dunkeln bei Zimmertemp. durchgeführte Reaktion durch Hinzugabe von 5proz. NaHCO_3 -Lösung abgebrochen. Die

¹⁹ B. Johannes, Diplomarbeit, Techn. Universität Braunschweig, 1968.

²⁰ A. Jensen, Acta Chem. Scand. **20**, 1728 (1966).

²¹ P. Karrer und E. Jucker, „Carotenoids“, Elsevier, New York, 1950.

²² A. Hager und T. Meyer-Bertenrath, Planta [Berlin] **76**, 149 (1967).

²³ M. B. Allen, T. W. Goodwin und S. Phagpolngarm, J. gen. Microbiol. **23**, 93 (1960).

²⁴ A. Jensen, Acta Chem. Scand. **15**, 1605 (1961).

²⁵ P. Karrer und E. Leumann, Helv. Chim. Acta **34**, 445 (1951).

²⁶ B. P. Schimmer und N. J. Krinsky, Biochem. **5**, 1814 (1966).

Pigmente wurden in Äther aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Beim Einengen der Ätherphase blieb ein dunkelbraunes Produkt zurück, das dünnschichtchromatographisch (Platten I) gereinigt und aus Methanol—Wasser umkristallisiert wurde. Ausb. 20 mg, *MG* (massenspektrometrisch): 601; $\lambda_{\max}$ (*n*-Hexan): 447, 420, 398 (360) nm.

Zeaxanthin-8-d (6) vgl.¹¹

15 mg **19** in 30 ml absol. Äther wurden mit einer Suspension von 3,5 g LiAlH_4 in 25 ml absol. Äther versetzt und bei Zimmertemp. 25 Stdn. gerührt. Der Verlauf der Reduktion wurde mittels Absorptionsspektren und der *DC* von aus der Reaktionslösung entnommenen Proben verfolgt. Nach Beendigung der Reduktion wurde überschüssiges LiAlH_4 durch tropfenweise Zugabe von Essigester beendet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie für **24** beschrieben.

Zur Reindarstellung des Zeaxanthin-8-d mußte das Reaktionsprodukt auf Platten (II) getrennt werden. Die Ausb. an in Äther/Petroläther umkristallisiertem Zeaxanthin-8-d betrug ungefähr 0,5 mg. *MG* (massenspektrometrisch) 569; $\lambda_{\max}$ (*n*-Hexan) 425, 449, 479 nm.

4-Hydroxy- β -carotin-4-d (9)

Etwa 0,5 mg Echinenon (**27**), 30 ml absol. Äther wurden unter Rühren und Eiskühlung mit 400 mg LiAlD_4 versetzt. Die Reaktion konnte nach 45 Min. beendet und wie für **24** angegeben aufgearbeitet werden, wobei ein gelboranges Öl erhalten wurde, das durch *DC* auf Platten (II) gereinigt werden konnte. *MG* (massenspektrometrisch) 553.

Die folgenden Verbindungen wurden wie in der Literatur beschrieben dargestellt: 4,4'-Dimethoxy- β -carotin (**8**) aus Isozeaxanthin (**7**)²⁷, Isozeaxanthin (**7**) aus β -Carotin²⁷, 4,4'-Dianilido- β -carotin (**34**) aus β -Carotin²⁸, β -Carotin-5,6-mono-(**10**) und -5,6,5',6'-diepoxid (**12**) aus β -Carotin^{29, 30}, Antheraxanthin- (**20**) und Violaxanthindiacetat aus Zeaxanthin über Zeaxanthin-diacetat³¹, jedoch durch Oxydation mit *m*-Chlorperoxobenzoesäure statt mit Perphthalsäure, Antheraxanthin (**14**) und Violaxanthin (**15**) aus den entsprechenden Acetaten, Canthaxanthin (**28**) aus Isozeaxanthin (**7**)³², Astacin (**29**) aus Canthaxanthin (**28**)³³, Capsanthol (**33**) und Capsanthon (**31**) aus Capsanthin (**30**)^{34, 35}, die 5,8-Epoxide (**11**, **13**, **18**, **19**) aus den entsprechenden 5,6-Epoxiden (**10**, **12**, **17**, **24**)³⁶.

²⁷ R. Entschel und P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **41**, 402 (1958).

²⁸ C. Martin und P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **42**, 464 (1959).

²⁹ P. Karrer und E. Jucker, *Helv. Chim. Acta* **28**, 427 (1945).

³⁰ E. C. Grob und W. Siekmann, *Chimia* **18**, 103 (1964).

³¹ P. Karrer und E. Jucker, *Helv. Chim. Acta* **28**, 300 (1945).

³² P. Zeller, F. Bader, H. Lindlar, M. Montavon, P. Müller, R. Rüegg, G. Ryser, G. Sancy, F. S. Schaeren, U. Schwieter, R. Stricker, R. Tamm, P. Zürcher und O. Isler, *Helv. Chim. Acta* **42**, 841 (1959).

³³ J. B. Davis und B. C. L. Weedon, *Proc. Chem. Soc. [London]* **1960**, 182.

³⁴ R. Entschel und P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **43**, 89 (1960).

³⁵ M. S. Barber, L. M. Jackman, B. C. L. Weedon und C. K. Warren, *Proc. Chem. Soc. [London]* **1960**, 19.

³⁶ P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **28**, 474 (1945).

Anm. bei der Korrektur: Inzwischen ist ein zusammenfassender Artikel über Carotinoid-Massenspektren erschienen³⁷, der die vorliegende Arbeit gut ergänzt, da er in der Hauptsache offenkettige Carotinoide sowie einige weitere Vertreter mit Enonstruktur behandelt. Außerdem sind massenspektroskopische Daten veröffentlicht worden für Asterinsäure³⁸, 2-Isopentenyl-3,4-dehydrorhodopin³⁹, Phytoen-1,2-oxid⁴⁰, Loro-xanthin⁴¹, Neochrom⁴², Paracentron^{43, 44}, die Pigmente aus *Flavobacterium dehydrogenans*⁴⁵ sowie bestimmten Kokken⁴⁶, 1,2-Dihydro-⁴⁷ und 6-Keto-Carotinoide⁴⁸.

³⁷ C. R. Enzell, G. W. Francis und S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand.* **23**, 727 (1969).

³⁸ N. A. Sørensen, S. Liaaen-Jensen, B. Børdalen, A. Haug, C. Enzell und G. Francis, *Acta Chem. Scand.* **22**, 344 (1968).

³⁹ S. Nørgård und S. Liaaen-Jensen, *Acta. Chem. Scand.* **23**, 1463 (1969).

⁴⁰ G. Britton und T. W. Goodwin, *Phytochem.* **8**, 2257 (1969).

⁴¹ K. Aitzetmüller, H. H. Strain, W. A. Svec, M. Grandolfo und J. J. Katz, *Phytochem.* **8**, 1761 (1969).

⁴² L. Cholnok, K. Györgyfy, A. Rónai, J. Szabolcs, G. Tóth, G. Galasko, A. K. Mallams, E. S. Waigh und B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc. [London]* **C 1969**, 1256.

⁴³ G. Galasko, J. Hora, T. P. Toubé, B. C. L. Weedon, D. André, M. Barbier, E. Lederer und V. R. Villanueva, *J. Chem. Soc. [London]* **C 1969**, 1264.

⁴⁴ J. Hora, T. P. Toubé und B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc. [London]* **C 1970**, 241.

⁴⁵ O. B. Weeks, A. G. Andrewes, B. O. Brown und B. C. L. Weedon, *Nature* **224**, 879 (1969).

⁴⁶ A. J. Aasen, G. W. Francis und S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand.* **23**, 2605 (1969).

⁴⁷ H. C. Malhorta, G. Britton und T. W. Goodwin, *Chem. Comm.* **1970**, 127.

⁴⁸ G. W. Francis, *Acta Chem. Scand.* **23**, 2916 (1969).