

146. Neoflor und 6-Epineoflor aus Blüten von *Trollius europaeus*; Hochfeld-¹H-NMR-Spektren von Neoxanthin und (9'Z)-Neoxanthin

von Edith Märki-Fischer und Conrad Hans Eugster*

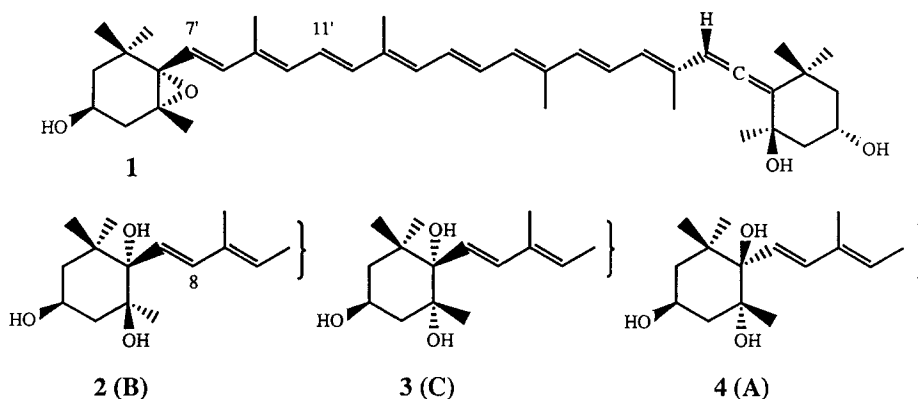
Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

(1. VII. 90)

Neoflor and 6-Epineoflor from Flowers of *Trollius europaeus*; Highfield ¹H-NMR Spectra of (all-E)-Neoxanthin and (9'Z)-Neoxanthin

Re-isolation of the very polar carotenoids from flowers of the title plant furnished two epimeric pentahydroxy compounds. Based on spectroscopic and chiroptical arguments and by chemical correlation with neoxanthin, their structures were established as **11** (proposed name *neoflor*) and **12** (*6-epineoflor*). Decoupling experiments and COSY-2D-¹H-NMR spectra allowed a complete assignment of the vinyl protons of the two isomers, and furthermore, for the first time, also of those of (all-E)-neoxanthin and (9'Z)-neoxanthin.

Einleitung. – Aus den intensiv gelben Blüten von *Trollius europaeus* hatten Lippert und Karrer schon vor längerer Zeit ein sehr polares Carotinoid isoliert, welches sie 'Trolliflor' nannten [1] [2]. Die von diesen Autoren mitgeteilten Eigenschaften von Trolliflor waren: stärker haftend an Adsorptionssäulen als der Hauptfarbstoff (damals 'Trollixanthin' genannt, s. unten); Anwesenheit einer 5,6-Epoxy-Gruppe, gesichert durch ihre säurekatalysierte Umlagerung in ein furanoides 5,8-Epoxid (damals als 'Trolliflavin' bezeichnet); Nonaen-Chromophor aufgrund der Lage der Hauptmaxima im Elektronenspektrum¹⁾; Summenformel nach C,H-Verbrennungsanalysen C₄₀H₅₆O₅, d. h. verglichen mit 'Trollixanthin' um ein O-Atom reichere Summenformel.

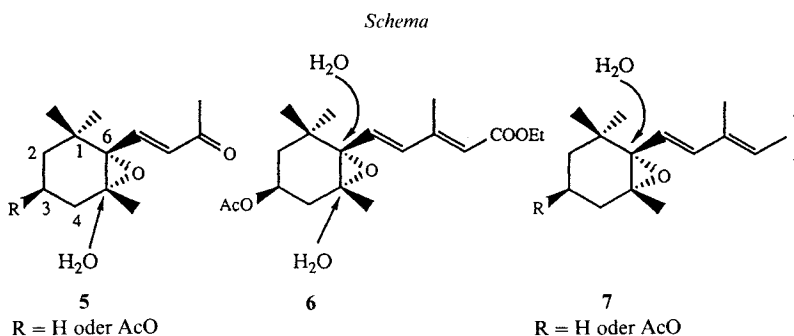


¹⁾ Die bedeutenden Intensitätsunterschiede der Banden zwischen Neoxanthin und 'Trolliflor' im VIS müssen aus heutiger Sicht auf eine teilweise eingetretene Umlagerung in Neochrom ('Trollichrom') zurückgeführt werden, vgl. [3].

Eine später ausgeführte Untersuchung von nachgelassenen Präparaten von [2], beschriftet als 'Trolliflor' [2] ergab, dass diese entweder aus reinem (all-*E*)-Neoxanthin (**1**) oder aus einem Gemisch von **1** (76%), epimeren Neochromen (20%) und zwei weiteren Komponenten mit durch MS bestimmten Summenformeln $C_{40}H_{56}O_3$ (4%) bestanden [3]. Aus diesem Grund wurden die Trivialnamen 'Trolliflor' und 'Trolliflavin' weil synonym zu Neoxanthin bzw. zu Neochrom zur Streichung empfohlen [3]²⁾.

Bisheriges zur Struktur der Trollius-Pentole. – In einer weiteren Arbeit wurden die beiden Pentole genauer untersucht und als Hydrolyseprodukte von (all-*E*)-Neoxanthin (**1**) erkannt [4]. Basierend auf spektroskopischen Argumenten, auf die hier nicht näher eingegangen wird, wurde für die polarere Komponente Struktur **2** und für die weniger polare die epimere Struktur **3** hergeleitet. Somit lag diesen Überlegungen ein Hydrolysemechanismus zugrunde, nach welchem das Epoxid (Neoxanthin) bei der säurekatalysierten Anlagerung von H_2O an C(5) vorwiegend Inversion und Retention an C(6) erleidet.

Nun haben aber unsere Untersuchungen über den sterischen Verlauf der Hydrolyse von 5,6-Epoxy-5,6-dihydro- β -Endgruppen gezeigt [5–9], dass dieser Mechanismus nicht zutrifft; s. *Schema*.



Im C_{13} -Keton **5** tritt ausschliesslich Inversion an C(5) ein; schon im C_{15} -Ester **6** konnte in geringem Umfang eine solche an C(6) nachgewiesen werden. In sämtlichen Carotinoiden, die bis dato untersucht wurden, bleibt bei der Hydrolyse die Konfiguration an C(5) erhalten und an C(6) tritt entweder Inversion *oder* Retention ein. Die *in-vitro*-Hydrolyse wird stets von der bevorzugten Bildung der 5,8-Epoxide begleitet, bei denen stets Konfigurationserhaltung an C(5) gefunden wurde. Aus diesen Gründen hatten wir für die Pentole die revidierten Strukturen **4** (polar) und **3** (weniger polar) vorgeschlagen [6].

Neue Isolierung der Pentole aus Trollius-Blüten; Struktur von Neoflor und 6-Epineoflor. – Eine neue Isolierung der Pentole war notwendig geworden, um die bestehenden Differenzen mit modernen spektroskopischen Methoden zu klären und zudem das genuine Vorkommen der Pentole in *Trollius*-Blüten zu überprüfen³⁾⁴⁾.

²⁾ Zur Identität von 'Trollixanthin' mit Neoxanthin, s. [3].

³⁾ In [4] wurden Zweifel geäußert, ob die Pentole genuine Produkte sind oder ob sie möglicherweise Artefakte der Isolierung oder der langen Lagerung seien. (Die Präparate waren in evakuierten Ampullen und im Dunkeln aufbewahrt worden.)

⁴⁾ Vgl. auch die *Fussnote* 13 in [6].

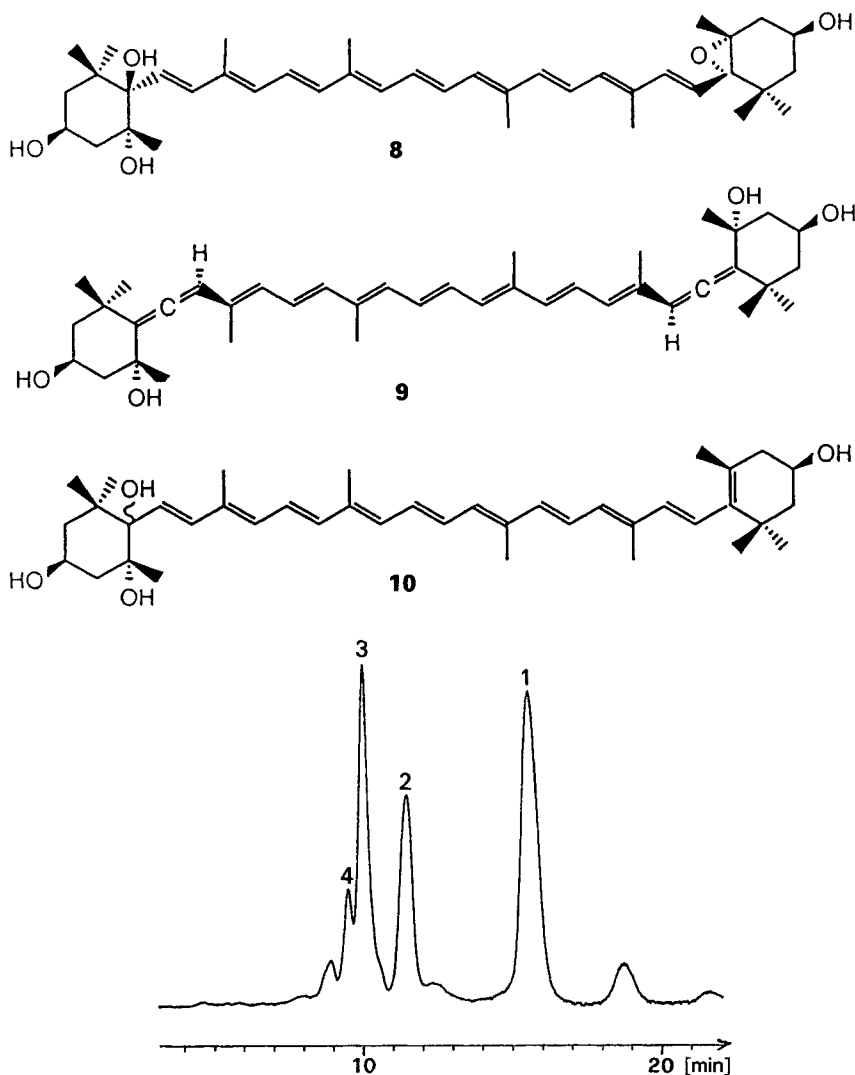


Fig. 1. HPLC von Carotinoiden mit Triol-Endgruppen. 1: Neoflor (11) aus *Trollius*; 2: 6-Epineoflor (12) aus *Trollius*; 3: (9Z)-Latoxanthin (8) zugesetzt; 4: Mimulaxanthin (9) zugesetzt.

Bei einer neuen Extraktion und milden Aufarbeitung von Blüten von *Trollius europaeus* liess sich sofort zeigen, dass sie neben (all-E)-Neoxanthin (1) als Hauptfarbstoff zwei wesentlich polarere Verbindungen enthielten, die aber verschieden waren von den ebenfalls sehr polaren Carotinoiden Latoxanthin (8) [7] und Mimulaxanthin (9) [10]; s. die HPLC-Kurve in Fig. 1.

Mikroteste an den beiden Verbindungen und Spektren bestätigten im wesentlichen die von den früheren Untersuchern [1] [2] [4] erhobenen Befunde. Zusätzlich zeigten ihre CD-Kurven, abgesehen von Intensitätsunterschieden, einen sehr ähnlichen Verlauf (s.

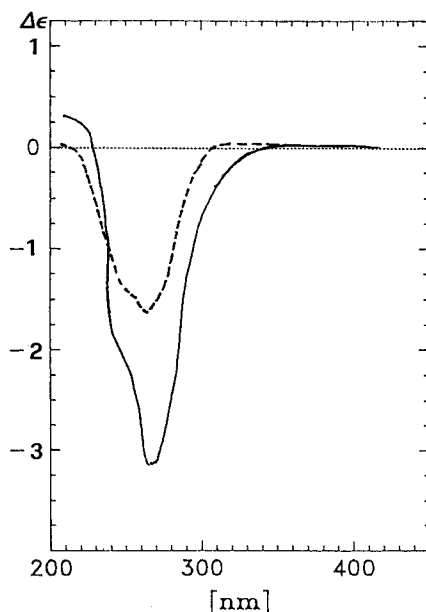


Fig. 2. CD (EPA, RT.) von *Neoflor* (**11**; —) und von *6-Epineoflor* (**12**; - - -)

Fig. 2). Die ^1H -NMR-Spektren belegten klar die Verwandtschaft mit Neoxanthin. Des- sen Allen-Endgruppe war in beiden Isomeren nachzuweisen. Bei den anderen Endgrup- pen war auf Epimerie zu schliessen. Die Signale des polaren Pentols stimmten mit denjenigen von Karpoxanthin (**10**, (6*R*)), die des weniger polaren mit denen von 6-Epi- karpoxanthin (**10**, (6*S*)) [8] überein.

Bei der Hydrolyse von (all-*E*)-Neoxanthin nach [4] wurden ebenfalls zwei Pentole erhalten, die sich in allen Eigenschaften als identisch mit den aus *Trollius* isolierten Verbindungen erwiesen. ^1H -NMR-Spektren s. *Tabelle*.

Der erneute Vergleich mit den ^1H -NMR-Spektren der Triol-Endgruppen A–D in [6] bestätigte sofort unsere früheren [6] Schlüsse bezüglich der Struktur der Pentole: das polare Pentol, Pik 2 in *Fig. 1*, orangerote Kristalle, Schmp. 215–215,5°, besitzt die Endgruppe A, das weniger polare, Pik 1 in *Fig. 1*, hellorange Kristalle, Schmp. 186–186,5°, die Endgruppe C. Daraus folgt für das polare Produkt Struktur **11** (= (3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-6',7'-Didehydro-5,6,5',6'-tetrahydro- β , β -carotin-3,5,6,3',5'-pentol). Als neuen Trivialnamen schlagen wir die Bezeichnung *Neoflor*⁵⁾ vor.

Aus dem Gesagten folgt Struktur **12** für das etwas weniger polare Pentol (= (3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-6',7'-Didehydro-5,6,5',6'-tetrahydro- β , β -carotin-3,5,6,3',5'-pentol) mit Trivialnamen *6-Epineoflor*.

⁵⁾ Dieser Name soll die Verwandtschaft mit Neoxanthin betonen und auch an die erstmalige Isolierung von Carotinoiden mit Triol-Endgruppen [1] [2] aus *Trollius europaeus* erinnern. Auf Namen mit dem Präfix 'Trolli-', welche auf die Herkunft verweisen könnten, mussten wir wegen des verbreiteten Missbrauchs (vgl. [6]) verzichten.

Tabelle. ¹H-NMR-Daten (400 MHz, CDCl₃) von Neoflor (11), 6-Epineoflor (12), Neoxanthin (1) und (9'Z)-Neoxanthin

	12 ^{a)}	11 ^{a)}	1 ^{b)} c)	d)	e)	(9'Z)-1 ^{c)}
H-C(3)	4,28 (m)	4,18	3,92 (m)			3,93
H-C(3')	4,32 (m)	4,32	4,32 (m)			4,32
H-C(7)	5,87 (d, J = 15,5)	6,14	5,88 (d, J = 15,5)			5,93
H-C(7')						
H-C(8)	6,42 (d, J = 15,5)	6,40	6,29 (d, J = 15,5)			6,83
H-C(8')	6,03 (s)	6,03	6,03 (s)	6,06		6,03
H-C(10)	6,22 (m)	6,22	6,20 (d, J = 11)			6,07
H-C(10')	6,11 (d, J = 11)	6,11	6,11 (d, J = 11)			6,11
H-C(11)	6,60 (m)	6,60	6,57 (dd, J = 15, 11)			6,76
H-C(11')	6,56 (dd, J = 15, 11)	6,56	6,57 (dd, J = 15, 11)			6,54
H-C(12)	6,38 (d, J = 15)	6,38	6,38 (d, J = 15)			6,29
H-C(12')	6,35 (d, J = 15)	6,34	6,33 (d, J = 15)			6,33
H-C(14)	6,25 (m)	6,25	6,25 (m)			6,26
H-C(14')	6,25 (m)	6,25	6,25 (m)			6,25
H-C(15)	6,63 (m)	6,63	6,63 (m)			6,63
H-C(15')	6,63 (m)	6,63	6,63 (m)			6,63
CH ₃ (16)	0,82 (s)	0,87	0,98 (s)		0,98	1,01
CH ₃ (16')	1,07 (s)	1,07	1,07 (s)	1,07	1,08	1,07
CH ₃ (17)	1,10 (s)	1,18	1,15 (s)		1,16	1,16
CH ₃ (17')	1,33 (s)	1,34	1,33 (s)	1,37	1,35	1,33
CH ₃ (18)	1,26 (s)	1,26	1,19 (s)		1,19	1,21
CH ₃ (18')	1,35 (s)	1,35	1,35 (s)	1,39	1,35	1,34
CH ₃ (19)	1,92 (s)	1,97	1,93 (s)		1,94	1,93
CH ₃ (19')	1,80 (s)	1,81	1,80 (s)	1,82	1,81	1,80
CH ₃ (20)	1,96 (s)	1,97	1,96 (s)		1,97	1,96
CH ₃ (20')	1,96 (s)	1,97	1,96 (s)		1,97	1,96

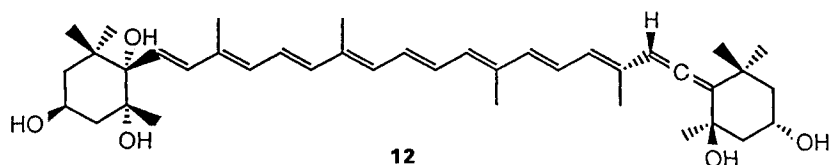
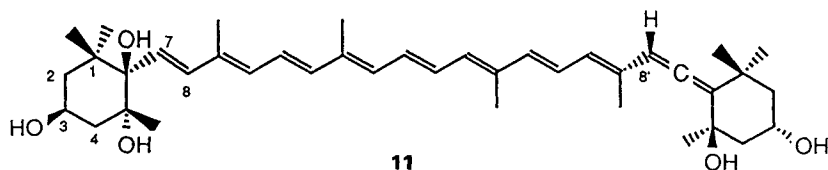
^{a)} Man beachte die Umkehr der Numerierung. Für 11 und 12 gilt Numerierung links, für 1 und (9'Z)-1 Numerierung rechts. Zum besseren Vergleich sind konstitutionell identische bzw. ähnliche Protonen in der Tabelle einander gegenübergestellt.

^{b)} (all-E)-1 aus Trollius und aus Petalen verschiedener gelber Rosen; (9'Z)-1 aus Spinat.

^{c)} Multiplizitäten und Kopplungskonstanten 11 wie 12 und (9'Z)-1 wie 1.

^{d)} Daten für die O,O'-Diacetyl-Verbindung aus [11].

^{e)} Daten aus [3].



Zusammen mit **11** und **12** wurde auch (all-*E*)-Neoxanthin (**1**) isoliert. Aus früheren Extraktionen von verschiedenen Pflanzenorganen war auch das (9'*Z*)-Neoxanthin vorrätig, so dass wir auch von diesen nahe verwandten Verbindungen vollständige (mit COSY-2D) ¹H-NMR-Spektren aufnehmen konnten. Damit war eine einwandfreie Zuordnung der Signale im Vinyl-Bereich möglich, s. *Tabelle*⁶⁾.

Die Lage der Allen-Protonen (H–C(8) in **11** und **12** bzw. H–C(8') in **1** und (9'*Z*)-**1**) liegt im erwarteten Bereich, vgl. [11–13]. Damit wird gleichzeitig die (*E*)-Konfiguration der benachbarten konjugierten (C=C)-Bindung angezeigt (s. [13]). Wir haben Hinweise gewonnen, dass in *Trollius*-Blüten auch ein C(6)-Epimeres von **1** vorkommt. Zusätzlich zu den in [6] [14] erwähnten diagnostischen Unterschieden bei den Triol-Endgruppen können auch die Verschiebungen von H–C(7) und H–C(8) zur Unterscheidung herangezogen werden: für H–C(7) gilt $\delta(6R) - \delta(6S) = +0,27$ ppm, für H–C(8) jedoch ein $\Delta\delta = -0,02$ ppm.

Das (9'*Z*)-Neoxanthin⁷⁾ lässt sich vom (all-*E*)-Isomeren durch die drastische Tieffeldverschiebung von H–C(8') bzw. der Hochfeldverschiebung von H–C(10') leicht erkennen.

Das CD-Spektrum von Neoflor kann folgendermassen gedeutet werden: 3,5,6-Trihydroxy-5,6-dihydro- β -Endgruppen bringen allgemein nur geringe Elliptizitäten in den CD ihrer Carotinoide. Nach bisherigen Erfahrungen werden die *Cotton*-Effekte im sensitiven Bereich von 260 bis 270 nm bei der Hydrolyse einer (5*R*,6*S*)-Epoxy-Gruppe in die 5,6-Dihydroxy-Gruppe bei Retention der Konfiguration an C(6) nicht nur schwächer, sondern kehren auch ihr Vorzeichen um. Beispiele sind (3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-Violaxanthin und (3*S*,5*S*,6*S*,3'*S*,5'*S*,6'*S*)-Mactraxanthin [6]. Mit anderen Worten: bei der üblicherweise vorherrschenden Inversion der Konfiguration an C(6) durch die Hydrolyse der Epoxy-Funktion ändert sich das Vorzeichen des *Cotton*-Effektes im genannten Bereich nicht. Selbstverständlich kann dieser Effekt nur dann beobachtet werden, wenn von der zweiten Molekülhälfte im Carotinoid kein störender Einfluss ausgeübt wird. Bei 6-Epineoflor müsste nach dem Gesagten ein schwach positiver *Cotton*-Effekt um 265 nm erwartet werden. Beobachtet wird jedoch ein schwach negativer; s. *Fig. 2*. Hier ist demnach anzunehmen, dass der schwach negative Beitrag der Neoxanthin-Endgruppe in **11** und **12** den positiven der (3*S*,5*R*,6*S*)-Endgruppe in **12** reduziert.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. U. Piantini für die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren und Frau A. Lorenzi für CI-Massenspektren.

⁶⁾ Zur Zeit unserer Untersuchung lagen noch keine Hochfeld-¹H-NMR-Spektren von **1** und (9'*Z*)-**1** vor. Inzwischen sind wir von Frau Prof. S. Liaaen-Jensen, Trondheim (Brief vom 30.4.90) über verwandte Messungen an den genannten Verbindungen orientiert worden. Wir sind übereingekommen, die jeweiligen Arbeiten unabhängig voneinander zur Publikation einzureichen. Die Arbeit der Gruppe Jensen wird der *Phytochemistry* eingereicht.

⁷⁾ Erste korrekte Strukturzuweisung [15].

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* S. [16–18]. HPLC an *Spherisorb S-5 μ CN* (4,6 250 mm) mit A/B 13:12; Flow 1,5 ml/min; A = Hexan/0,1% Et(i-Pr)₂N, B = CH₂Cl₂/MeOH 24:1.

2. *Aufarbeitung.* Blüten von *Trollius europaeus* wurden im Sommer 1986 in Feldis (Graubünden) auf ca. 1500 m ü. M. gesammelt und bis zur Extraktion bei –20° gelagert. Extraktion wie üblich mit Aceton/MeOH 4:1; Verseifung mit 10% methanolischer KOH. Ausbeute: 48 mg Carotin-Rohextrakt. Säulenchromatographie an Kieselgel (*Merck*, 40–63) mit Hexan/Aceton/MeOH 75:25:0 → 55:45:3; Feintrennung der polarsten Zonen an Kieselgel-Fertigplatten (*Merck*, 0,5 mm). Ausbeute an **1** 24 mg, **11** 0,58 mg, **12** 0,43 mg; UV/VIS (qual. Hexan): 418, 440, 468. HPLC, s. *Fig. 1*; Mimulaxanthin zugesetzt, Herkunft *Lamium montanum* [10], (9'Z)-Latoxanthin ex *Forsythia suspensa* cv. (unveröffentlicht, vgl. [7]).

3. *Hydrolyse von 1.* Vgl. [4]: 100 mg (9'Z)-Neoxanthin (ex Spinat), gelöst in 480 ml THF/H₂O 2:1 wurden in 4 Portionen unter N₂ und Rühren tropfenweise mit 40 ml 0,001N H₂SO₄ versetzt. Nach 4 h bei RT. und 3 Tagen bei 8° wurde mit 5% wässr. H₂CO₃-Lsg. neutralisiert, dann i. V. eingedampft und der Rückstand mit Et₂O aufgenommen. Chromatographie an Kieselgel (*Merck* 40–63 μ) mit Hexan/Aceton/MeOH 25:10:1. Ausbeute: 45 mg Epimerengemisch der Neochrome, 7,8 mg **11**, 2,8 mg **12**.

4. *Neoflor (11):* orangefarbene Kristalle aus Et₂O/Hexan; Schmp. 215–215,4°. UV/VIS (EPA): 266 (26900), 416 (95200), 440 (141200), 469 (136300). CD (EPA): 220 (+0,26), 234 (0), 266 (–3,13), 325–400 (0). HPLC und ¹H-NMR identisch mit aus *Trollius* isoliertem Pentol. CI-MS: 619 (7, [M + 1]⁺), 601 (25, [M + 1 – H₂O]⁺), 583 (67, [M + 1 – 2 H₂O]⁺).

5. *6-Epineoflor (12):* hellorange Kristalle aus Et₂O/Hexan; Schmp. 186–186,5°. UV/VIS (EPA): 226 (28200), 416 (84200), 440 (124000), 469 (122300). CD (EPA): 220 (0), 225 (+0,47), 230 (0), 248 (–1,43), 263 (–1,62), 310–400 (0). HPLC und ¹H-NMR identisch mit Naturprodukt. EI-MS: 600 ([M – H₂O]⁺).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Lippert, P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **1956**, 39, 698.
- [2] Marion Lippert, 'Untersuchungen über Carotinoide', Dissertation, Universität Zürich, 1958.
- [3] R. Buchecker, S. Liaaen-Jensen, C. H. Eugster, *Phytochemistry* **1975**, 14, 797.
- [4] R. Buchecker, S. Liaaen-Jensen, *Phytochemistry* **1977**, 16, 729.
- [5] M. Acemoğlu, W. Eschenmoser, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 2691.
- [6] R. Buchecker, U. Marti, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 2043.
- [7] E. Märki-Fischer, R. Buchecker, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 2143.
- [8] E. Märki-Fischer, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 1704.
- [9] P. Uebelhart, A. Baumeler, A. Haag, R. Prewo, J. H. Bieri, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1986**, 69, 816.
- [10] R. Buchecker, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 2531.
- [11] G. Englert, in 'Carotenoid Chemistry and Biochemistry', Eds. G. Britton und T. W. Goodwin, Pergamon, London, 1982.
- [12] W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi, U. Schwieter in 'Carotenoids', Eds. O. Isler, H. Gutmann und U. Solms, Birkhäuser, Basel, 1971.
- [13] T. Bjørnland, G. Englert, K. Bernhard, S. Liaaen-Jensen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2577.
- [14] C. H. Eugster, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 639.
- [15] J. Szabolcs, *Pure Appl. Chem.* **1976**, 47, 147.
- [16] E. Märki-Fischer, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 1708.
- [17] P. Uebelhart, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 1983.
- [18] K. Nayeshiro, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 982.