

# Synthetische Carotinoide zur Färbung von Lebensmitteln

Von O. ISLER, R. RÜEGG und P. SCHUDEL

Chemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

## Zusammenfassung

Das Ziel unserer Forschung ist die Entwicklung von Synthesen zur Herstellung von Carotinoiden, welche für die Lebensmittelfärbung verwendet werden können. Synthetisches  $\beta$ -Carotin «Roche» wird schon seit 1954 auf kommerzieller Basis hergestellt, und das  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) wird in nächster Zukunft dieses Stadium erreichen. Beide Substanzen kommen in unserer täglichen Nahrung vor und sind als sehr wirksame Provitamin-A-Verbindungen bekannt. Weitere Carotinoide, sind Lycopin (Tomaten), Torularhodin (rote Hefe) und Canthaxanthin (roter Eierschwamm). Die industriellen Synthesen basieren auf Citral und führen über  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -C<sub>14</sub>-Aldehyd zu Vitamin A, zu  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin oder zu den  $\beta$ -Apo-carotinalen und Torularhodin (Fig. 17).

Die industrielle Synthese wird mit derjenigen der Biogenese von Carotinoiden verglichen. Es steht fest, daß diese Farbstoffe unschädlich sind. Analytische Methoden und einige Anwendungsmöglichkeiten von Carotinoiden für die Lebensmittelfärbung werden beschrieben.

## Résumé

### Caroténoïdes de synthèse pour la coloration des denrées alimentaires

Nous cherchons à mettre au point des synthèses industrielles pour la fabrication de caroténoïdes pouvant être utilisés dans la coloration des denrées alimentaires. Le  $\beta$ -carotène «Roche» de synthèse est fabriqué depuis 1954 en quantités commerciales; il en sera bientôt de même pour le  $\beta$ -apo-8'-caroténal ( $C_{30}$ ). Ces deux substances se trouvent à l'état naturel dans diverses denrées alimentaires d'emploi courant et comptent parmi les pro-vitamines A les plus actives. Nous étudions également la production d'autres caroténoïdes: le lycopène (tomates), la torularhodine (levure rouge) et la canthaxanthine (châtaignes). Les synthèses industrielles partent du citral et, en passant par le  $\beta$ -ionone et l'aldéhyde  $\beta$ -C<sub>14</sub>, conduisent à la vitamine A, au  $\beta$ -carotène et à la canthaxanthine ou au  $\beta$ -apo-caroténal et à ses dérivés ainsi qu'à la torularhodine (fig. 17).

Les synthèses industrielles sont comparées à la biogénèse des caroténoïdes. Il est certain que ces colorants sont inoffensifs. Description des méthodes analytiques et de quelques domaines d'emploi des caroténoïdes pour la coloration des denrées alimentaires.

## Summary

### Synthetic Carotenoids for the Colouration of Foodstuffs

Our research work is aimed at the development of syntheses of carotenoids destined for food colouring. Synthetic  $\beta$ -carotene «Roche» has been in commercial use since 1954 and  $\beta$ -apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) will reach this stage in the near future. Both substances occur in our daily food and are two of the most effective provitamin A compounds. Further carotenoids being tested as food colouring agents include lycopene (pigment of tomatoes), torularhodin (red yeast) and canthaxanthin (edible mushroom).

The methods of industrial synthesis are based on citral and lead via  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -C<sub>14</sub>-aldehyde to vitamin A, to  $\beta$ -carotene and canthaxanthin or to the  $\beta$ -apo-carotenals and torularhodin (fig. 17).

The industrial synthesis is compared with the biogenesis of the carotenoids. It is established that these pigments are non-toxic. Analytical methods and some of the applications of carotenoids for food colouring are described.

## Resumen

### Carotinoides sintéticos para la coloración de alimentos

El propósito de nuestras pesquisas es de desarrollar una síntesis de carotinoides destinada a la coloración de alimentos. La  $\beta$ -carotina sintética «Roche» existe comercialmente desde 1954, y el  $\beta$ -apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) alcanzará esta misma forma en un futuro próximo. Ambas sustancias se encuentran en los alimentos diarios, y son dos de las formas de provitamina A más efectivas. Igualmente, se está experimentando con otros carotinoides para la coloración de alimentos, tales como licopina (el pigmento de los tomates), torularhodina (levadura roja) y canthaxantina (seta *cantharellus spp.*).

Los métodos industriales de síntesis están basados en citral, y conducen por la vía  $\beta$ -ionona y aldehído- $\beta$ -C<sub>14</sub> a la vitamina A, la  $\beta$ -carotina o a los  $\beta$ -apo-carotinales y torularhodina (fig. 17).

La síntesis industrial se compara con la biogénesis de los carotinoides. Está establecido que estos pigmentos no son tóxicos. Los métodos de análisis y algunos de los métodos de aplicación para la coloración de alimentos están descritos.

## Einleitung

Die Carotinoide sind eine Gruppe von Naturfarbstoffen, die zur großen Klasse der Terpene gehören. Sie erzeugen die gelben bis roten Farbtöne vieler Lebensmittel. Der Karottenfarbstoff  $\beta$ -Carotin und das in der Natur weitverbreitete  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) sowie  $\beta$ -Apo-12'-carotinal ( $C_{25}$ )<sup>1</sup> stellen die wirksamsten Provitamin-A-Verbindungen dar. Sie werden im menschlichen und tierischen Organismus in das lebenswichtige Vitamin A übergeführt (Abb. 1).

Die Arbeiten von HUNTER<sup>2</sup> sowie GLOVER und Mitarbeitern<sup>3</sup> weisen darauf hin, daß der Abbau von  $\beta$ -Carotin in Vitamin A in der Mucosa des Intestinaltraktes über den Vitamin-A-Aldehyd erfolgt.  $\beta$ -Carotin wird über  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) und  $\beta$ -Apo-12'-carotinal ( $C_{25}$ ) oder direkt durch oxydative Spaltung des Moleküls in der Mitte in Vitamin-A-Aldehyd und Vitamin A umgewandelt<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Die Bezeichnung der Stellung der funktionellen Gruppen entspricht der üblichen, in Abb. 1 wiedergegebenen Numerierung des Carotin-Gerüsts. Die Vorsilbe «apo» bedeutet, daß nicht mehr das ganze Carotin-Gerüst vorhanden ist. Zur leichteren Orientierung wird den Bezeichnungen in Klammern jeweils noch die Anzahl der C-Atome des Carotingerüsts beigefügt<sup>5</sup>.

<sup>2</sup> R. F. HUNTER, *Nature* [London] 158 (1946) 257.

<sup>3</sup> J. GLOVER, T. W. GOODWIN und R. A. MORTON, *Biochem. J.* 43 (1948) 109.

<sup>4</sup> J. GLOVER und E. R. REDFEARN, *Biochem. J.* 58 (1954) XV. S. FAZAKERLEY und J. GLOVER, *Biochem. J.* 65 (1957) 38 P.

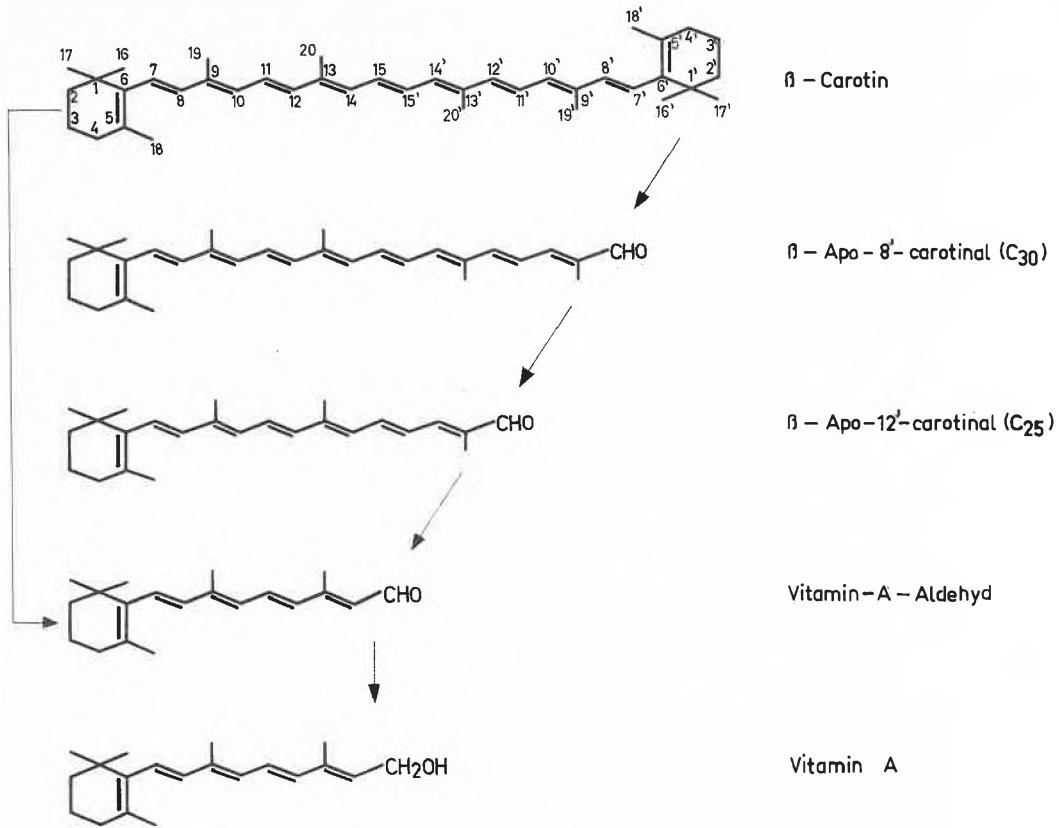


Abb. 1. Biologische Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Vitamin A

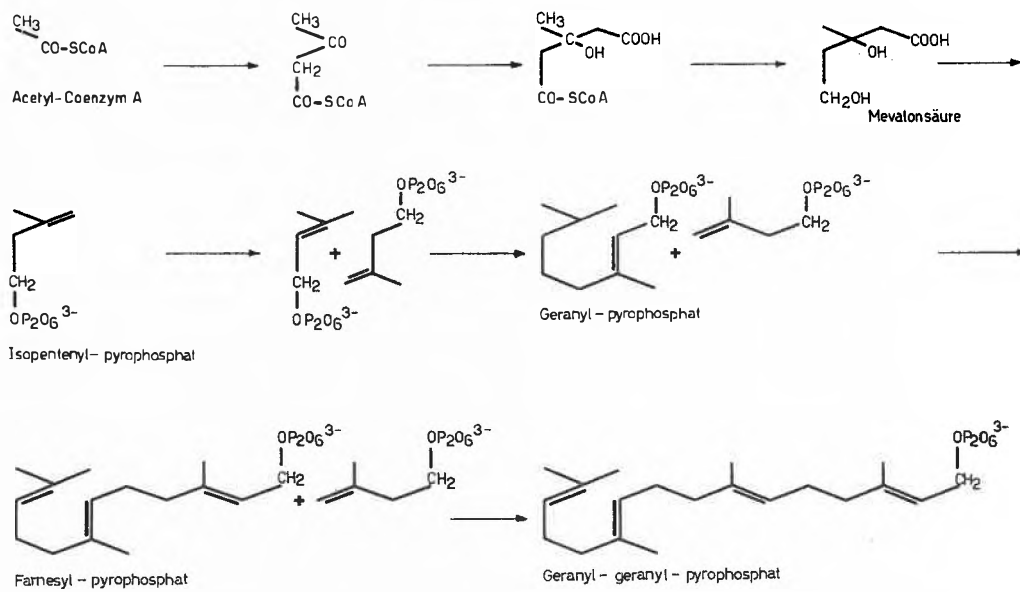


Abb. 2. Biogenese der Terpenketten

### Biogenese der Carotinoide

Die Biogenese der Terpenverbindungen ist heute schon sehr weitgehend aufgeklärt. Nach Arbeiten in den Laboratorien von LYNEN<sup>6</sup>, BLOCH<sup>7</sup>, FOLKERS<sup>8</sup> und POPJÁK<sup>9</sup> synthetisiert die Zelle aus Acetyl-Coenzym A

<sup>6</sup> R. RÜEGG, H. LINDLAR, M. MONTAVON, G. SAUCY, S. F. SCHAEREN, U. SCHWIETER und O. ISLER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 847.

<sup>6</sup> F. LYNEN, B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING und E. M. MÖSLEIN, *Angew. Chem.* 71 (1959) 657. H. EGGERER und F. LYNEN, *Liebigs Ann. Chem.* 630 (1960) 58.

<sup>7</sup> H. C. RILLING und K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1424.

<sup>8</sup> K. FOLKERS, C. H. SHUNK, B. O. LINN, F. M. ROBINSON, P. E. WITTRICH, J. W. HUFF, J. L. GILFILLAN und H. R. SKEGGS, *Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, J. A. Churchill Ltd., London 1959, S. 20.

<sup>9</sup> G. POPJÁK, ebenda, S. 148.

über Acetoacetyl-Coenzym A und  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-Coenzym A Mevalonsäure und daraus Isopentenyl-pyrophosphat, welches als biologischer Isoprenbaustein anzusprechen ist (Abb. 2).

Nach LYNEN wird die Kondensation des letzteren zu längeren Terpenketten durch Isomerisierung einer Isopentenylpyrophosphat-Einheit eingeleitet und führt über Geranyl- und Farnesyl-pyrophosphat zum Geranylgeranyl-pyrophosphat.

Die Annahme, daß sich das C<sub>40</sub>-Kohlenstoffgerüst der Carotinoide durch Dimerisierung von zwei Geranylgeranyl-pyrophosphat-(C<sub>20</sub>)-Einheiten zu einem ungefärbten, aliphatischen Tetraterpen – dem Lycopersen oder dem um eine Doppelbindung reicheren Phytoen – bildet, ist sehr naheliegend (Abb. 3).

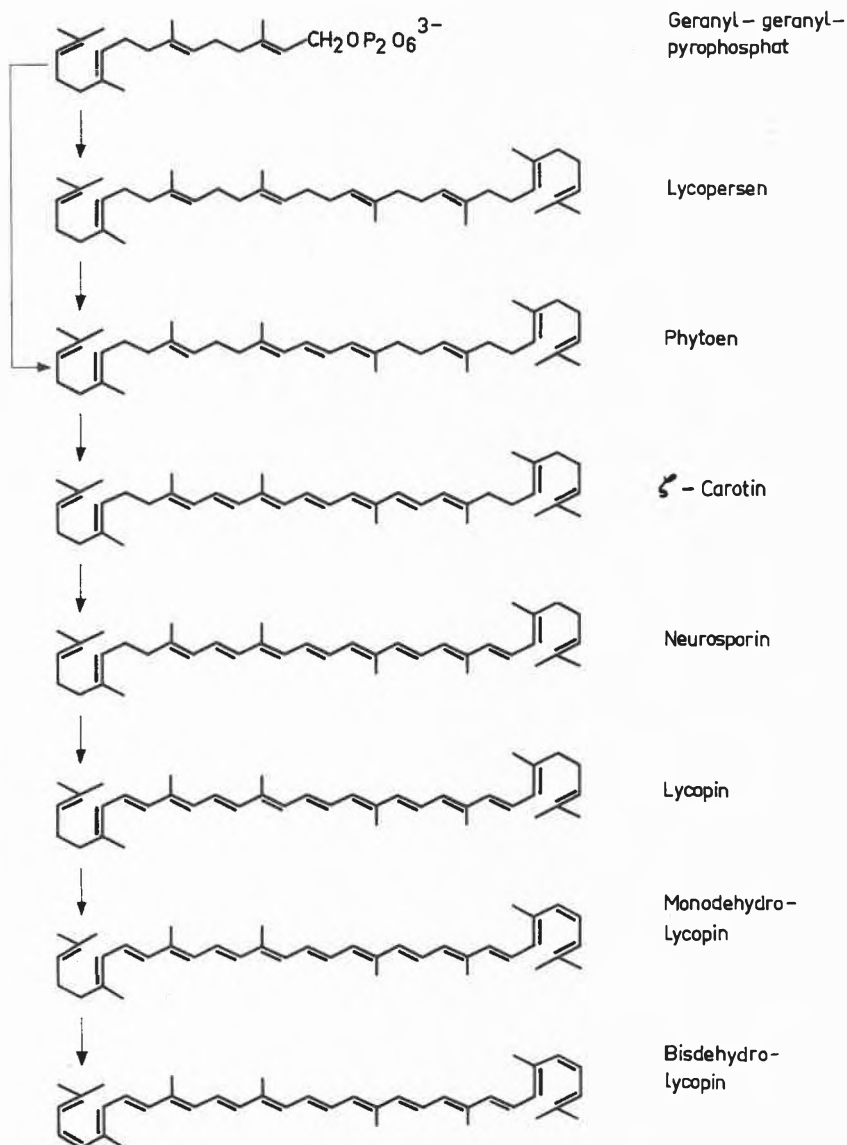


Abb. 3. Dimerisierung und Dehydrierung

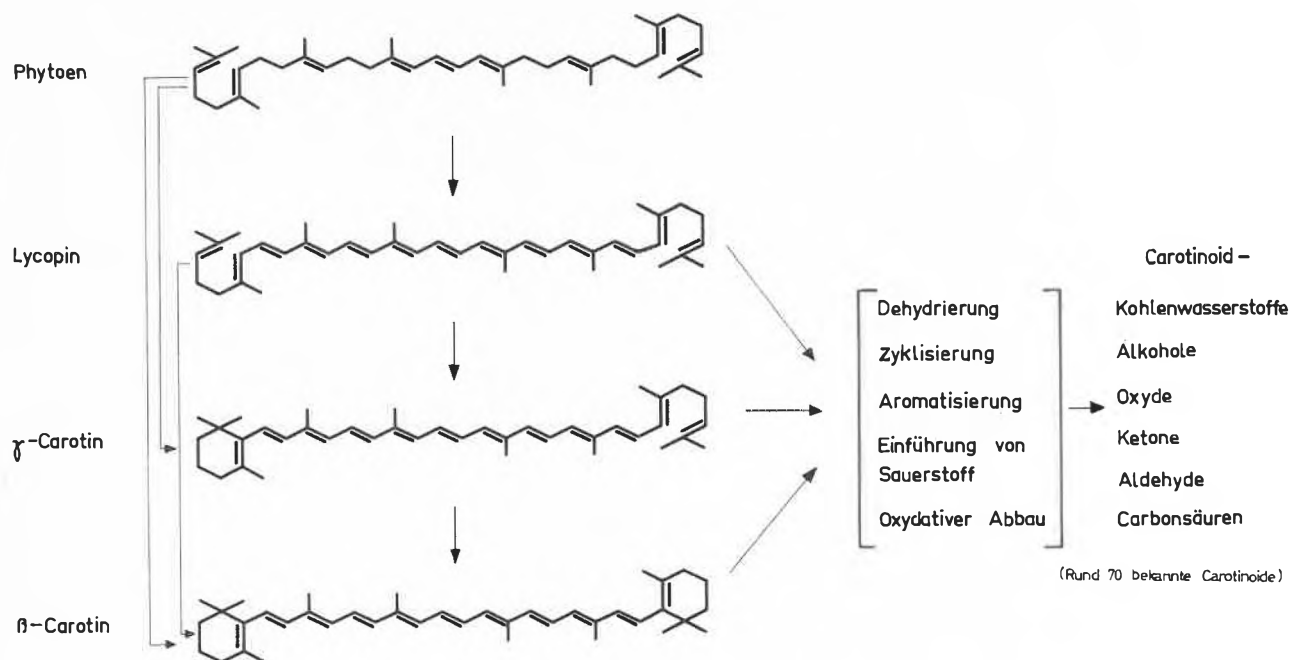


Abb. 4. Hypothetisches Biogenese-Schema der Carotinoide

Aus diesen farblosen Carotinoiden dürften sich in einem stufenweisen Dehydrierungsvorgang, bei welchem formal jedes Mal zwei Wasserstoffatome eliminiert werden, das von GROB<sup>10</sup> aus *Neurospora crassa* isolierte  $\zeta$ -Carotin mit 7 und das Neurosporin mit 9 konjugierten Doppelbindungen bilden. Der Tomatenfarbstoff Lycopin mit 11 konjugierten Doppelbindungen stellt eine weitere Dehydrierungsstufe dar.

Diese teils noch hypothetische Auffassung über die Bildung der Carotinoide veranlaßte kürzlich WINTERSTEIN<sup>11</sup>, weitere Dehydrierungsprodukte aufzusuchen. Dabei gelang ihm der Nachweis von Monodehydrolycopin in Mikroorganismen und Bisdehydrolycopin in einer spanischen Citrusart.

Die in Abb. 3 aufgezeigte Reihe der Dehydrierungsprodukte ist durch  $\gamma$ - und  $\beta$ -Carotin zu ergänzen, die sich beide z. B. durch eine Zyklisierungsreaktion aus Lycopin bilden könnten (Abb. 4).

Die Entstehung der Mannigfaltigkeit der rund 70 heute bekannten Carotinoide kann ausgehend von den drei Grundtypen Lycopin,  $\gamma$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin durch Dehydrierung, Zyklisierung, Aromatisierung, Einführung von Sauerstoff-Funktionen und oxydativen Abbau gedeutet werden.

Über Carotinoidfarbstoffe gibt es ausgezeichnete Monographien von KARRER und JUCKER<sup>12</sup> sowie von GOODWIN<sup>13</sup>. Schon vor hundertfünfzig Jahren waren die Carotinoide Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

<sup>10</sup> E. C. GROB, ebenda, S. 267.

<sup>11</sup> A. WINTERSTEIN, Privatmitteilung.

<sup>12</sup> P. KARRER und E. JUCKER, *Carotinoide*, Birkhäuser, Basel 1948.

<sup>13</sup> T. W. GOODWIN, *Carotenoids. Their Comparative Biochemistry*, Chemical Publishing Co., New York 1954.

1907 bestimmte WILLSTÄTTER<sup>14</sup> die Bruttoformel des  $\beta$ -Carotins zu  $C_{40}H_{56}$ . 1931 klärte KARRER<sup>15</sup> die Konstitution von  $\beta$ -Carotin, Lycopin und Vitamin A auf. 1947 synthetisierten ISLER und Mitarbeiter<sup>16</sup> erstmals kristallisiertes Vitamin A und 1950 gleichzeitig KARRER<sup>17</sup> und INHOFFEN<sup>18</sup> kristallisiertes  $\beta$ -Carotin. In den letzten zehn Jahren sind einige der wichtigsten Carotinoide synthetisch leicht zugänglich geworden. Einblick in die neueste wissenschaftliche Bearbeitung von Carotinoiden geben die beiden Übersichtsreferate von ISLER und Mitarbeitern<sup>19</sup> und die Originalarbeiten aus den Laboratorien von KARRER<sup>20</sup>, ZECHMEISTER<sup>21</sup>, INHOFFEN<sup>22</sup> und WEEDON<sup>23</sup>.

In den nachfolgenden Ausführungen beschränken wir uns auf die im technischen Maßstab synthetisch zugänglichen Verbindungen. Synthetisches  $\beta$ -Carotin «Roche» ist seit 1954 im Handel und  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) steht vor der Einführung. Weitere Carotinoide, darunter

<sup>14</sup> R. WILLSTÄTTER und W. MIEG, *Liebigs Ann. Chem.* 355 (1907) 1.

<sup>15</sup> P. KARRER und R. MORF, *Helv. Chim. Acta* 14 (1931) 1033.

<sup>16</sup> O. ISLER, W. HUBER, A. RONCO und M. KOPLER, *Helv. Chim. Acta* 30 (1947) 1911.

<sup>17</sup> P. KARRER und C. H. EUGSTER, *Helv. Chim. Acta* 33 (1950) 1172.

<sup>18</sup> H. H. INHOFFEN, F. BOHLMANN, K. BARTRAM, G. RUMMERT und H. POMMER, *Liebigs Ann. Chem.* 570 (1950) 54.

<sup>19</sup> O. ISLER und P. ZELLER, *Vitamins & Hormones* 15 (1957) 31. O. ISLER und M. MONTAVON, *Chimia* 12 (1958) 1.

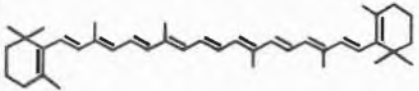
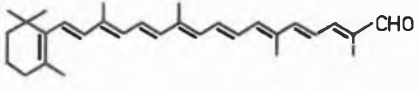
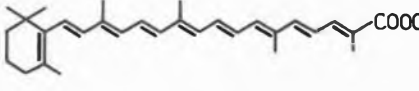
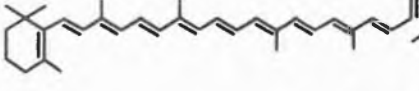
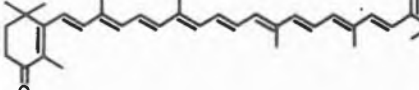
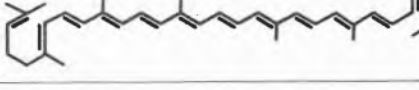
<sup>20</sup> R. ENTSCHEL und P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 466, und weitere Arbeiten.

<sup>21</sup> L. ZECHMEISTER, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 15 (1958) 31 und 18 (1960) 223.

<sup>22</sup> H. H. INHOFFEN und D. ERDMANN, *Liebigs Ann. Chem.* 598 (1956) 51, und weitere Arbeiten.

<sup>23</sup> M. AKHTAR und B. C. L. WEEDON, *J. Chem. Soc. [London]* 1959, 4058, und weitere Arbeiten. J. B. DAVIS und B. C. L. WEEDON, *Proc. Chem. Soc.* 1960, 182.

Tabelle 1

Farbstoff	Strukturformel	Smp.	Absorption in Petroläther		Farbe der Öllösung	Natürliches Vorkommen
			$\lambda_{\max}$ m $\mu$	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$		
$\beta$ -Carotin		180°	452	2600	gelb-orange	Karotte, Palmöl, Grüne Blätter
$\beta$ -Apo-8'-carotinal (C <sub>30</sub> )		137° 138°	455	2700	rot-orange	Leber, Spinat, Salat, Citrusfrüchte
$\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C <sub>30</sub> )-äthylester		137°	444	2600	gelb-orange	Noch nicht isoliert
Torularhodin-methylester		176° 177°	497	2950	tief rot	Rote Hefe
Canthaxanthin		216° 217°	464- 467	2200	rot-orange	Essbarer Pilz
Lycopin		172° 173°	472	3450	rot-orange bis rot	Tomate, Hagebutte

die roten Farbstoffe der Tomate und Torulahefe, werden zurzeit auf ihre Eignung als Lebensmittelfarben geprüft. In Tabelle 1 sind einige Eigenschaften besonders gut gereinigter Präparate zusammengestellt.

#### Industrielle Synthesen

In allen heute technisch zur Anwendung gelangenden Synthesen von Carotinoiden und Vitamin A wird  $\beta$ -Jonon als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Darstellung dieses monozyklischen C<sub>13</sub>-Ketons erfolgt aus Citral, welches entweder aus Lemongrasöl oder totalsynthetisch gewonnen wird.

Die industrielle Totalsynthese von  $\beta$ -Jonon ist in Abb. 5 dargestellt. Ausgehend von Aceton wird durch Acetylenanlagerung Methylbutinol und nachfolgende Partialhydrierung Methylbutenol hergestellt. Dieses wird mit Diketen zum entsprechenden Acetoacetat umgesetzt und pyrolytisch in Methylheptenon umgelagert. Anlagerung von Acetylen führt zu Dehydrolinalool, des-

sen Acetat durch eine intramolekulare Umlagerung über das Allenacetat und anschließende Verseifung in Citral übergeführt wird<sup>24</sup>. Kondensation von Citral mit Aceton gibt Pseudojonon und die nachfolgende Zyklisierung mit Schwefelsäure  $\beta$ -Jonon.

#### Vitamin A

In unserer technischen Vitamin-A-Synthese<sup>16</sup> (Abb. 6) wird  $\beta$ -Jonon durch Glycidestersynthese und Alkalibehandlung um ein C-Atom verlängert und damit in den  $\alpha, \beta$ -ungesättigten  $\beta$ -C<sub>14</sub>-Aldehyd übergeführt, in welchem die Konjugation mit der Ringdoppelbindung durch eine Methylengruppe unterbrochen ist. Die Schlüsselstufe des technischen Verfahrens ist die Grignard-Reaktion zwischen dem  $\beta$ -C<sub>14</sub>-Aldehyd und einem aus Methylvinylketon durch Acetylenanlagerung sowie Allylumlagerung leicht zugänglichen C<sub>6</sub>-Acetylenalkohol. Dabei wird in über 80prozentiger Ausbeute ein kristallines

<sup>24</sup> G. SAUCY, R. MARBET, H. LINDLAR und O. ISLER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 1945.

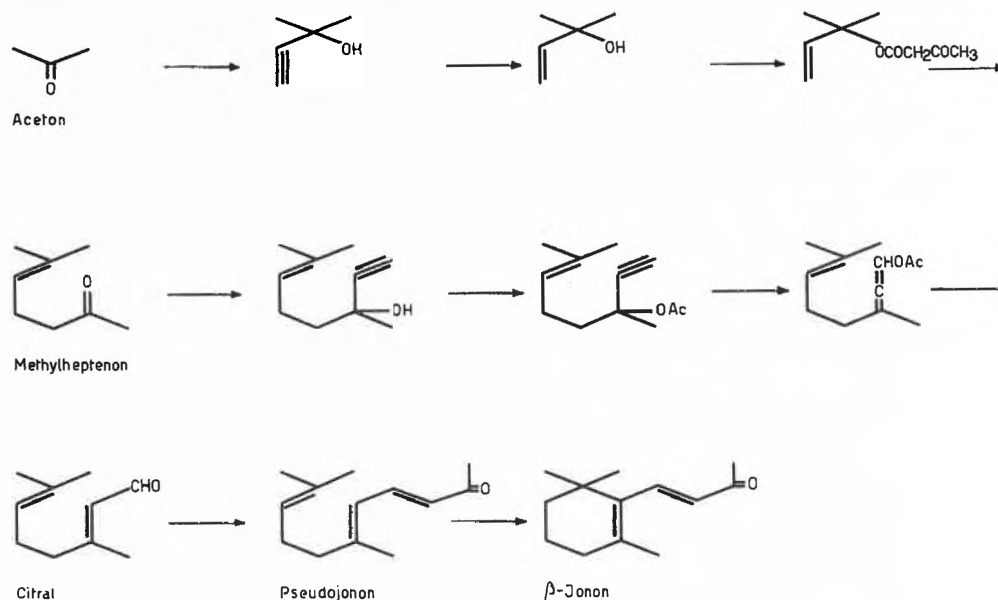


Abb. 5.  $\beta$ -Jonon aus Aceton

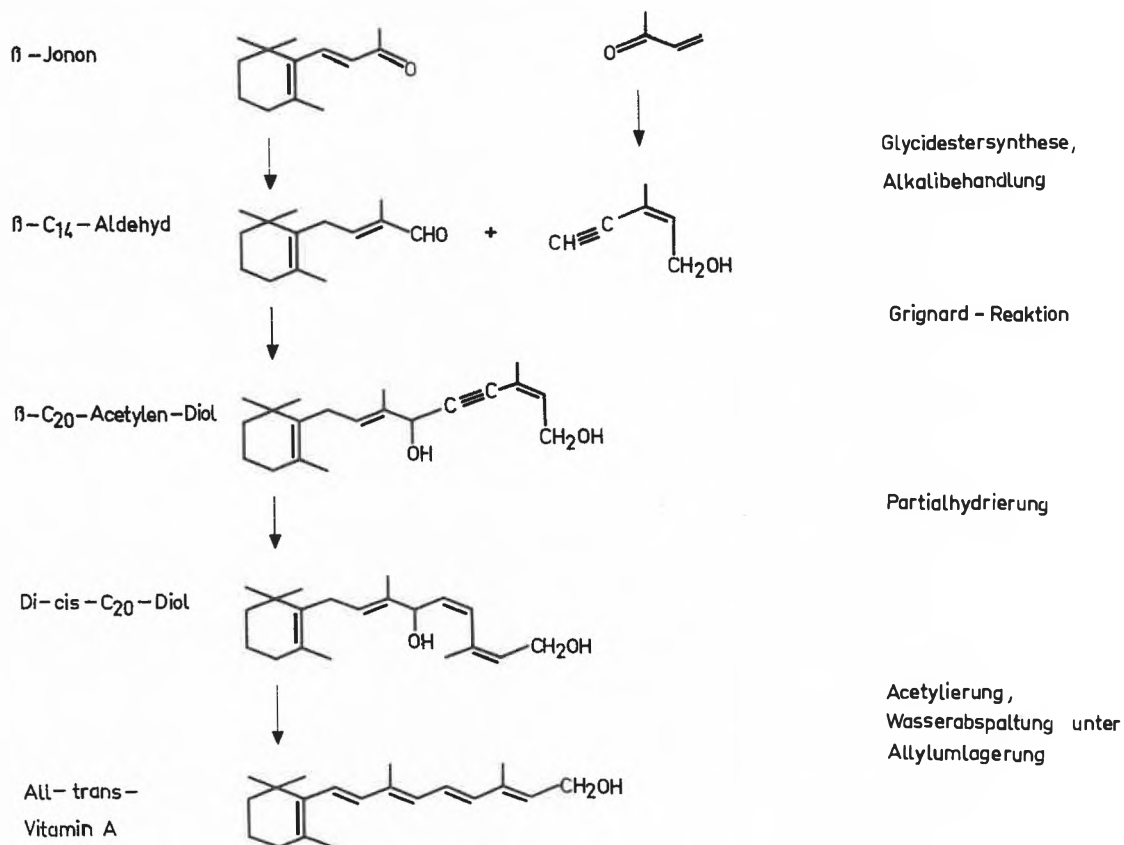
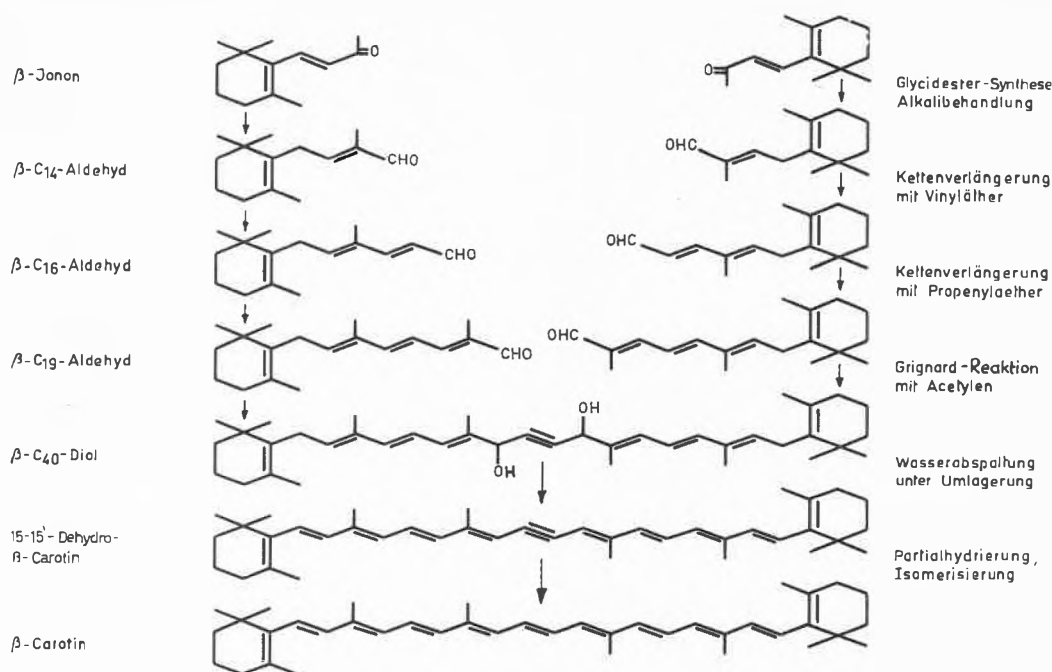


Abb. 6. Technische Vitamin-A-Synthese

Abb. 7. Technische  $\beta$ -Carotin-Synthese

Kondensationsprodukt mit dem Kohlenstoffgerüst des Vitamins A erhalten. Die Partialhydrierung mit dem von LINDLAR entwickelten Palladium-Blei-Katalysator liefert kristallisiertes Di-*cis*- $C_{20}$ -diol<sup>25</sup>. Partielle Acetylierung der primären Hydroxylgruppe und anschließende Wasserabspaltung, die unter Allylumlagerung erfolgt, führen zu all-*trans*-Vitamin-A-Acetat, welches nach einmaligem Umkristallisieren rein ist.

### $\beta$ -Carotin

Die technische Synthese von  $\beta$ -Carotin<sup>26</sup> basiert, wie diejenige des Vitamins A, ebenfalls auf  $\beta$ -Jonon und  $\beta$ - $C_{14}$ -Aldehyd. Infolge der symmetrischen Struktur des  $\beta$ -Carotins gelingt der Aufbau des Moleküls von beiden Enden her mit den gleichen Bausteinen (Abb. 7).

$\beta$ - $C_{14}$ -Aldehyd wird stufenweise durch Kettenverlängerung mittels Vinyläther in den kristallinen  $\beta$ - $C_{16}$ -Aldehyd und darauf mittels Propenyläther in den ebenfalls kristallinen  $\beta$ - $C_{19}$ -Aldehyd übergeführt. Zwei Moleküle  $\beta$ - $C_{19}$ -Aldehyd werden mit Acetylenmagnesiumdibromid zum  $\beta$ - $C_{40}$ -Diol verknüpft<sup>18</sup>. Durch doppelte Wasserabspaltung unter Allylumlagerung wird 15,15'-Dehydro- $\beta$ -carotin erhalten, welches sich durch ein großes Kristallisationsvermögen auszeichnet. Nach der partiellen Hydrierung der zentralen Dreifachbindung und anschließender Isomerisierung in Petroläthersuspension

entsteht das in roten Blättchen kristallisierende all-*trans*- $\beta$ -Carotin (Farbtafel I)<sup>27</sup>.

### Canthaxanthin

Die Synthese des Pilzfarbstoffes Canthaxanthin basiert auf Dehydro- $\beta$ -carotin mit zentraler Dreifachbindung, welches als Zwischenprodukt der  $\beta$ -Carotinsynthese anfällt (Abb. 8).

Durch Einführung von Acetoxy-Gruppen in den Stellungen 4 und 4' mittels Bromsuccinimid in Eisessig wird Dehydro-*iso*-zeaxanthin-diacetat erhalten. Nach Verseifung und Oppenauer-Oxydation zu Dehydro-canthaxanthin wird partiell hydriert und zu all-*trans*-Canthaxanthin isomerisiert<sup>28, 29</sup>.

### $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ )

Die technische Synthese von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ )<sup>30</sup> basiert auf dem  $\beta$ - $C_{19}$ -Aldehyd des  $\beta$ -Carotin-Verfahrens (Abb. 9).

Die Grignard-Reaktion mit einem aus Methylmalondialdehyd-enol-äther durch Acetylenanlagerung, Um-

<sup>25</sup> O. ISLER, R. RÜEGG, U. SCHWIETER und J. WÜRSCH, *Vitamins & Hormones*, im Druck.

<sup>26</sup> O. ISLER, H. LINDLAR, M. MONTAVON, R. RÜEGG und P. ZELLER, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 249.

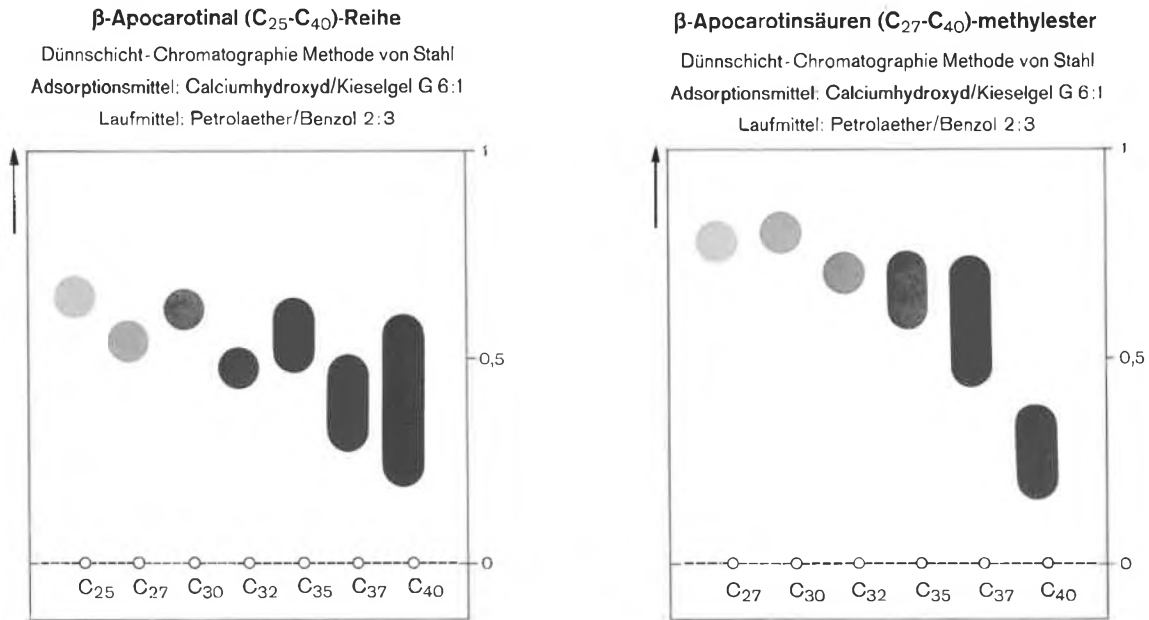
<sup>27</sup> Die meisten Farbaufnahmen der Farbtafel I und II wurden von den Herren Dr. H. WALDMANN und Dr. E. SCHNEITER ausgeführt.

<sup>28</sup> P. ZELLER, F. BADER, H. LINDLAR, M. MONTAVON, P. MÜLLER, R. RÜEGG, G. RYSER, G. SAUCY, S. F. SCHAEREN, U. SCHWIETER, K. STRICKER, R. TAMM, P. ZÜRCHER und O. ISLER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 841.

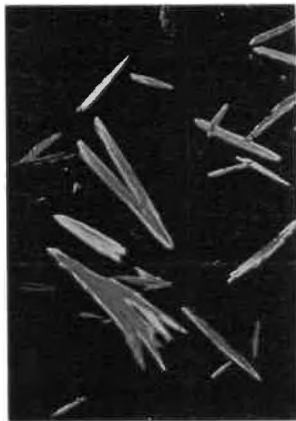
<sup>29</sup> R. ENTSCHEL und P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 41 (1958) 402.

<sup>30</sup> R. RÜEGG, M. MONTAVON, G. RYSER, G. SAUCY, U. SCHWIETER und O. ISLER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 854.

Tafel I



**Analysenschema für synth. β-Carotin in Margarine**



β-Apo-8'-carotinal (C<sub>30</sub>)

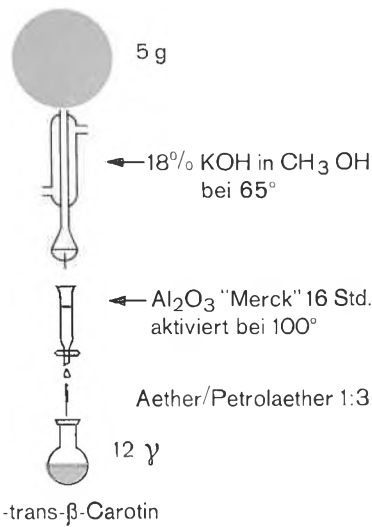
Verseifung

Extraktion

Chromatographie

Einengen

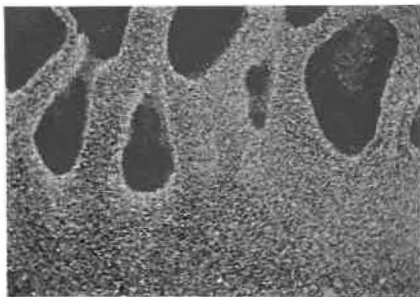
Absorptionsmessung



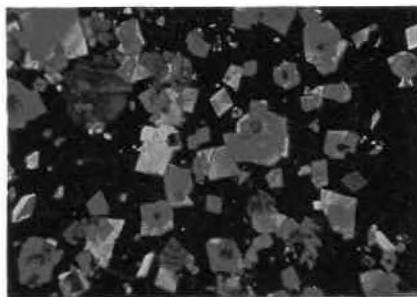
all-trans-β-Carotin



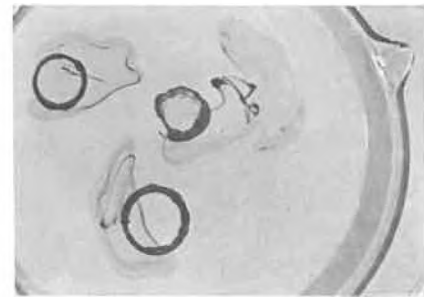
Torularhodinmethylester



β-Carotin: Mikrokristalldispersion in Öl



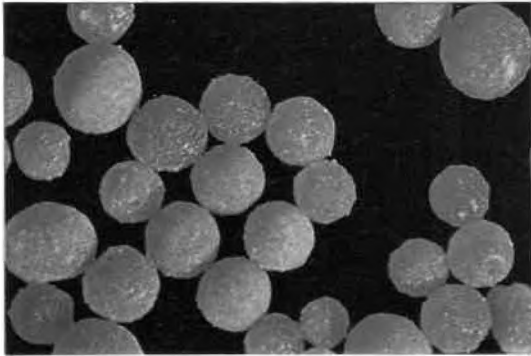
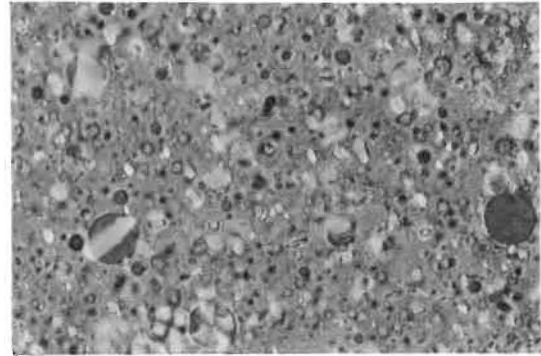
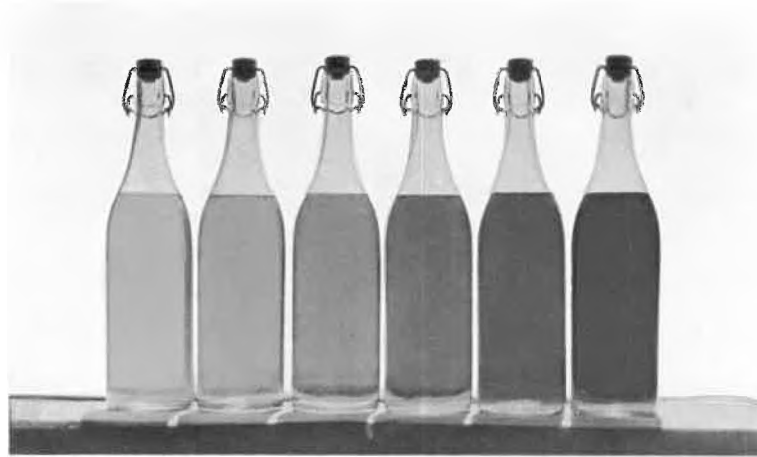
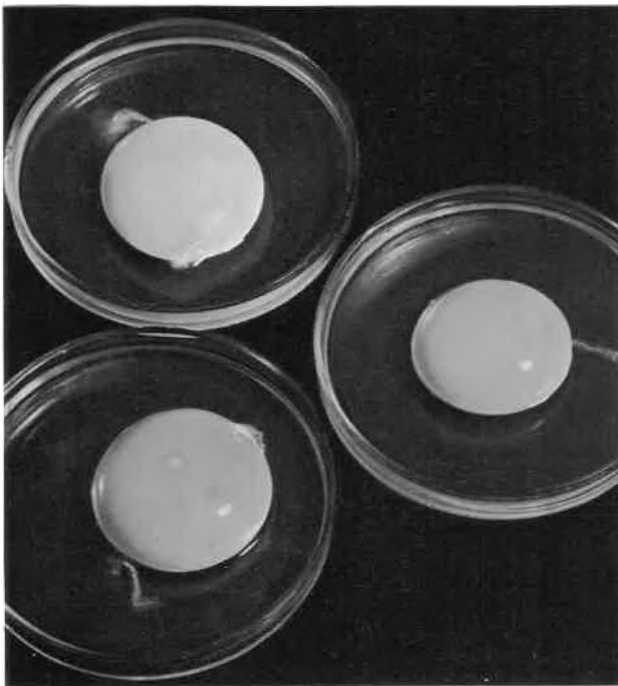
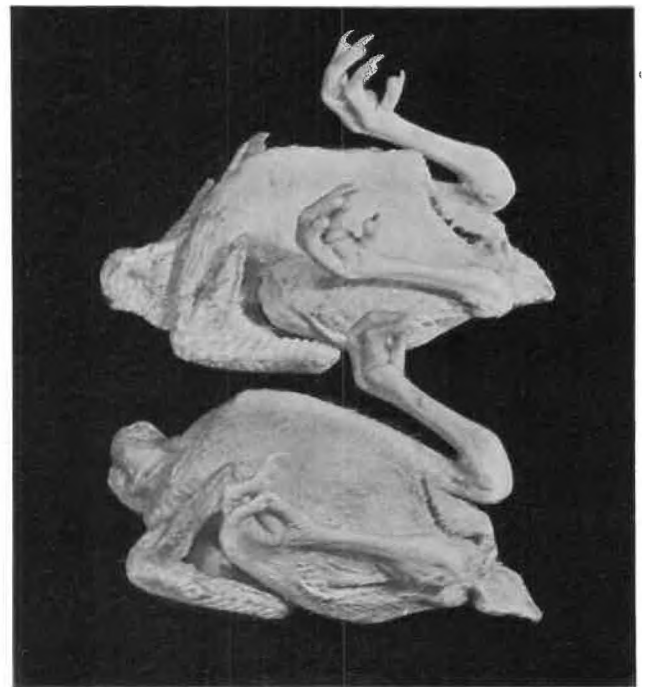
all-trans-β-Carotin: Normales Kristallisat



β-Carotin: Ölfreies Präparat, kolloidal in Wasser

Die Kristallphotos wurden erstmals in *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 249 bzw. 42 (1959) 864 veröffentlicht

Tafel II

 $\beta$ -Carotin: wasserdispergierbare Form (beadlets) $\beta$ -Carotin: Öl-in-Wasser-Emulsion (beadlets in Wasser)Färbung wässriger Zuckerlösungen mit  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ )Eidotterfärbung durch  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) als Futterzulage

Pigmentierung von Geflügel durch Canthaxanthin als Futterzulage

Kontrollen ohne Carotinoidzusatz jeweils oben im Bild

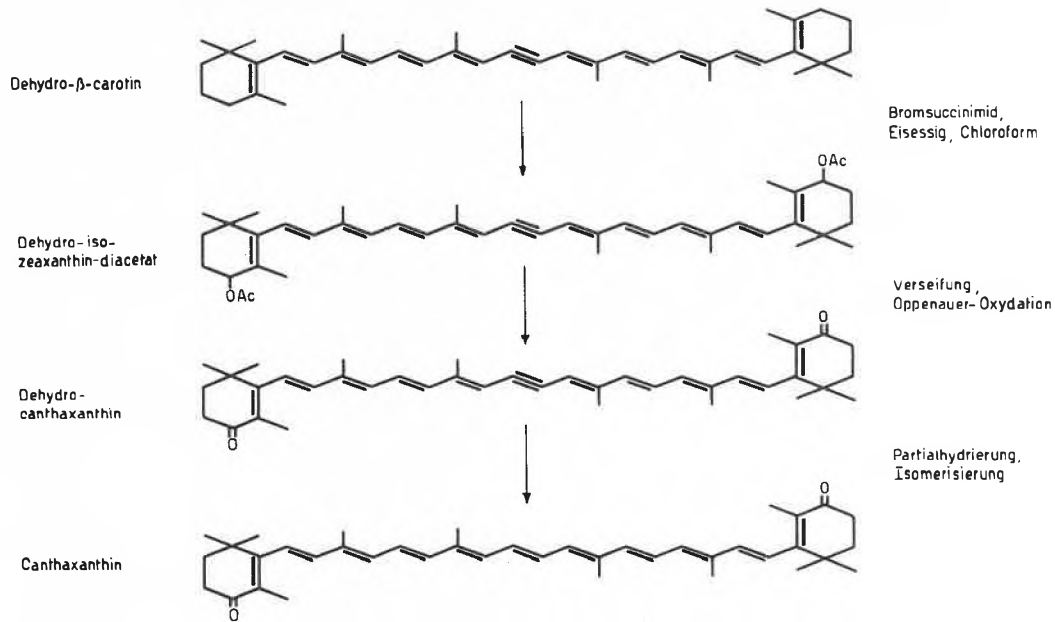


Abb. 8. Technische Canthaxanthin-Synthese

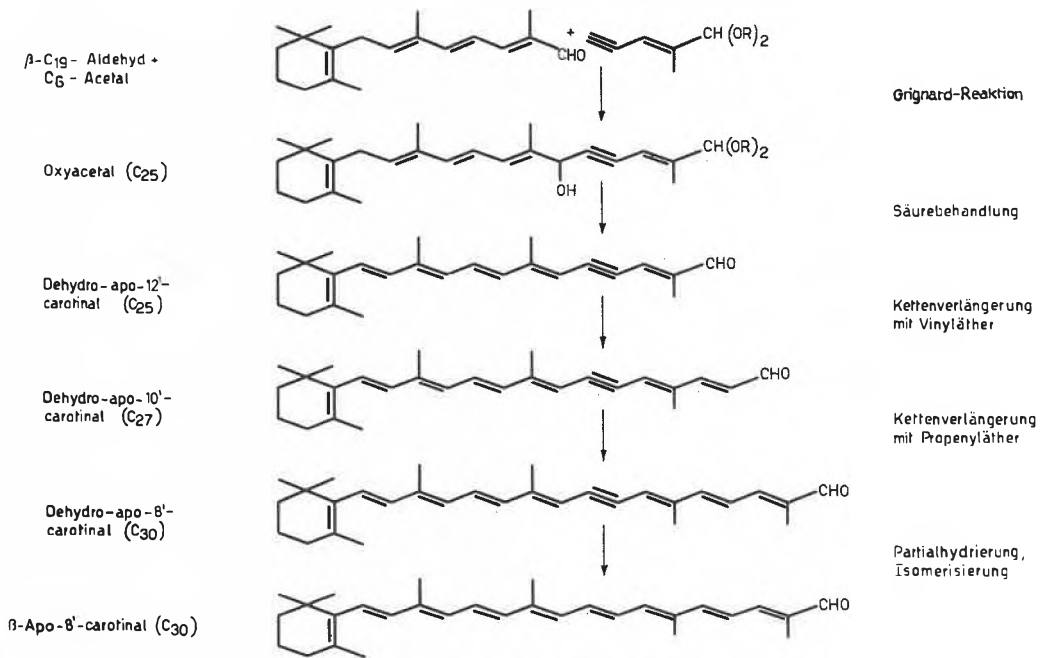


Abb. 9. Technische Synthese von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal (C<sub>30</sub>)

lagerung sowie Acetalisierung leicht zugänglichen «C<sub>6</sub>-Acetal» führt nach saurer Wasserabspaltung und Verseifung der Acetalgruppierung zum Dehydro- $\beta$ -apo-12'-carotinal (C<sub>25</sub>)<sup>31</sup>. Die Kettenverlängerung um eine Iso-

<sup>31</sup> Die nachfolgende Partialhydrierung und Isomerisierung liefert das in Tabelle 2 aufgeführte  $\beta$ -Apo-12'-carotinal (C<sub>25</sub>).

preneinheit durch stufenweises Kondensieren mit Vinyläther und Propenyläther führt über Dehydro- $\beta$ -apo-10'-carotinal (C<sub>27</sub>) zum Dehydro- $\beta$ -apo-8'-carotinal (C<sub>30</sub>), das durch die übliche Partialhydrierung und Isomerisierung in  $\beta$ -Apo-8'-carotinal (C<sub>30</sub>) umgewandelt wird. Letzteres kristallisiert in derben Nadeln (Farbtafel I).

Tabelle 2:  $\beta$ -Apocarotinal-Reihe

C-Atome	Strukturformel	mp
C <sub>25</sub>		88 - 89°
C <sub>27</sub>		97 - 99°
C <sub>30</sub>		138 - 139°
C <sub>32</sub>		133 - 134°
C <sub>35</sub>		146 - 147°
C <sub>37</sub>		160 - 161°
C <sub>40</sub>		167 - 168°

In analoger Weise haben wir die ganze Reihe der  $\beta$ -Apo-carotinal-Verbindungen mit 25 bis 40 C-Atomen synthetisiert<sup>5,30</sup> (Tabelle 2).

Der C<sub>25</sub>-Aldehyd löst sich mit gelber, der C<sub>40</sub>-Aldehyd mit leuchtend roter Farbe. Im Dünnschichtchromatogramm nach STAHL<sup>32</sup> (Farbtafel I) trennen sich die

<sup>32</sup> E. STAHL, *Pharmaz. Rdsch.* 2 (1959) 1.

Apocarotinale deutlich in zwei Gruppen. Diejenige mit den größeren  $R_f$ -Werten enthält die Aldehyde C<sub>25</sub>, C<sub>35</sub> und C<sub>40</sub>, diejenige mit den kleineren  $R_f$ -Werten die Aldehyde C<sub>27</sub>, C<sub>32</sub> und C<sub>37</sub>. Ferner sind mit zunehmender Kettenlänge der Verbindungen auf der Platte deutlich die Farbänderungen der Flecken von Gelb über Orange bis Rot sichtbar.

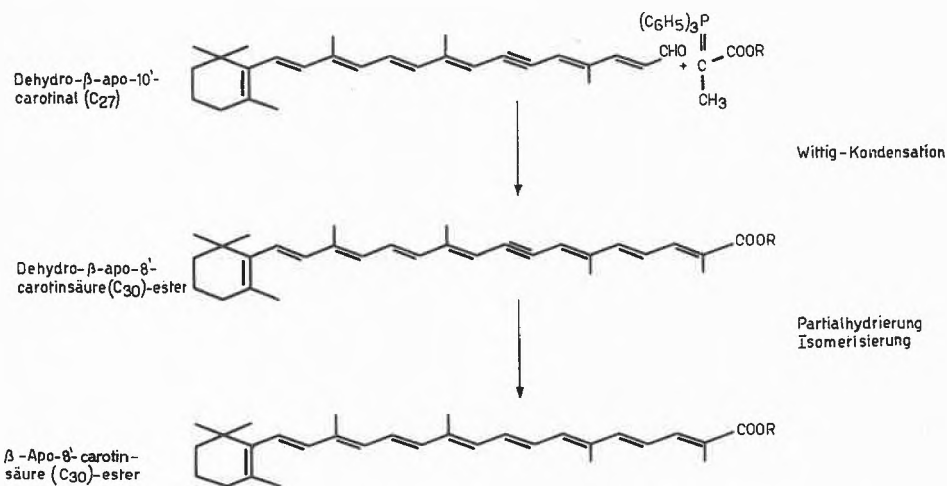


Abb. 10. Synthese von  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C<sub>30</sub>)-ester

Tabelle 3:  $\beta$ -Apocarotinsäure-methylester

C-Atome		Smp
C <sub>27</sub>		129–130°
C <sub>30</sub>		136–137°
C <sub>32</sub>		145–147°
C <sub>35</sub>		140–141°
C <sub>37</sub>		165–166°
C <sub>40</sub>		174–176°

Torularhodin-methylester

 $\beta$ -Apo-carotinsäure-ester

## Analyse

Nachdem uns die Verbindungen der  $\beta$ -Apo-carotinal-Reihe zur Verfügung standen, synthetisierten wir mit Hilfe der Wittig-Reaktion die entsprechenden Apo-carotinsäure-ester<sup>33</sup>. Der Synthesegang sei am Beispiel des  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C<sub>30</sub>)-esters erläutert (Abb. 10).

Dehydro- $\beta$ -apo-10'-carotinal (C<sub>27</sub>) wird mit dem Phosphoran aus Triphenylphosphin und  $\alpha$ -Brompropionsäure-ester zu Dehydro- $\beta$ -apo-8'-carotinsäure (C<sub>30</sub>)-ester kondensiert. Nachfolgende Partialhydrierung und Isomerisierung führen zum kristallinen  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C<sub>30</sub>)-ester.

In Tabelle 3 ist die Reihe der so erhaltenen, kristallinen  $\beta$ -Apocarotinsäure-methylester mit 27 bis 40 C-Atomen aufgeführt. Der Methylester der C<sub>40</sub>-Säure ist mit dem Methylester des aus *Torula rubra* isolierten, roten Hefefarbstoffes Torularhodin identisch<sup>33</sup> und kristallisiert in feinen, zu Büscheln verwachsenen Nadeln (Farbtafel I).

Das auf der Farbtafel I wiedergegebene Dünnschichtchromatogramm zeigt neben dem chromatographischen Verhalten der Verbindungen wiederum eine Farbpalette von Gelb bis Rot.

Ziel unserer Bemühungen ist die industrielle Herstellung reiner Naturfarbstoffe. Wir bevorzugen zur Färbung von Lebensmitteln diejenigen Carotinoide, welche Provitamin-A-Wirkung besitzen, mit anderen Worten, natürliche Lebensmittelfarbstoffe, die in das für den Organismus lebenswichtige Vitamin A gespalten werden können.

Dem analytischen Nachweis von Carotinoiden in Lebensmitteln kommt demzufolge eine große praktische Bedeutung zu. Werden Carotinoidpräparate natürlichen Ursprungs für die Lebensmittelfärbung verwendet, so ist die analytische Erfassung der einzelnen Pigmentkomponenten oft ziemlich kompliziert. Bei der Anwendung von reinen synthetischen Carotinoidpräparaten hingegen ist der quantitativ-analytische Nachweis in Lebensmitteln sehr erleichtert.

Das Farbbild auf Farbtafel I veranschaulicht ein Analysenschema, mit dem 12 $\gamma$ - $\beta$ -Carotin, die zur Färbung von 5 g Margarine Verwendung fanden, quantitativ wieder erfaßt werden konnten. Die Margarine wird mit 18prozentigem KOH in Methanol bei 65° gekocht, das Unverseifbare extrahiert und durch Chromatographie an aktiviertem Aluminiumoxyd aufgetrennt. Das mit Äther/Petroläther (1:3) eluierte  $\beta$ -Carotin kann durch Absorptionsmessung quantitativ erfaßt werden.

<sup>33</sup> O. ISLER, W. GUËX, R. RÜEGG, G. RYSER, G. SAUCY, U. SCHWIETER, M. WALTER und A. WINTERSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 864.

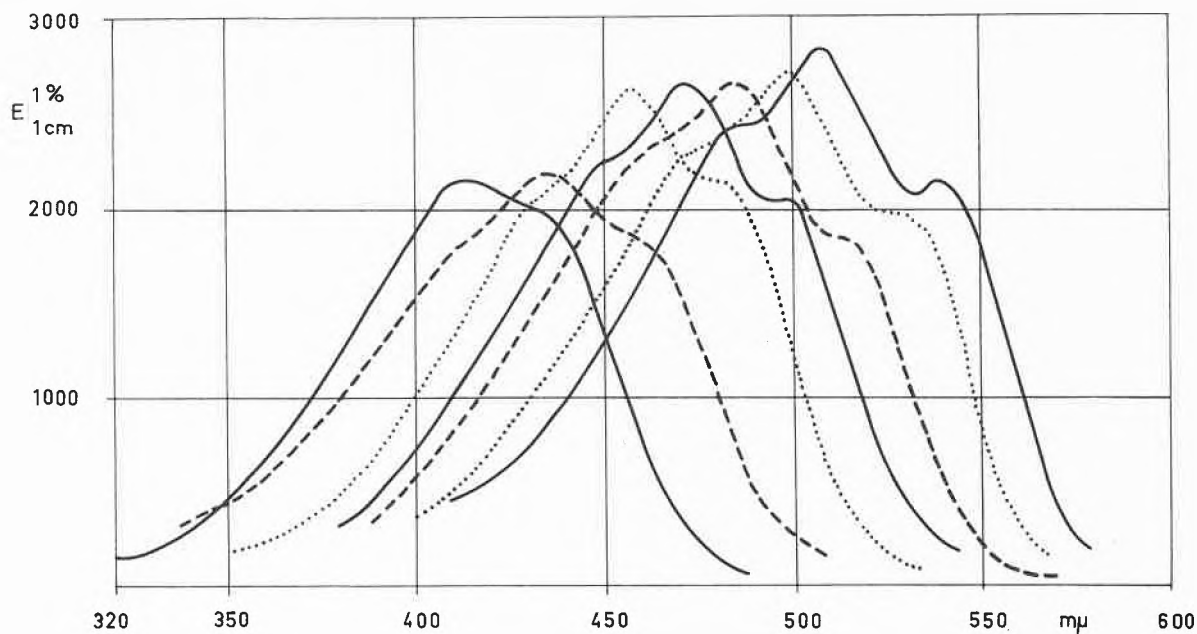


Abb. 11.  $\beta$ -Apo-carotinal-Reihe. Absorptionsspektren in Petroläther

Zur Bestimmung und Identifizierung der Carotinoide leisten Absorptions- und Kernresonanzspektren sowie Röntgenpulverdiagramme ausgezeichnete Dienste. In Abb. 11 sind die Absorptionsspektren der in Tabelle 2 aufgeführten  $\beta$ -Apocarotinalreie wiedergegeben. Das Hauptmaximum der Absorption verschiebt sich erwartungsgemäß von  $414 \mu$  beim  $\beta$ -Apo-12'-carotinal ( $C_{25}$ ) parallel der Zunahme der Zahl der konjugierten Doppelbindungen bathochrom bis zu  $508 \mu$  beim  $\beta$ - $C_{40}$ -Aldehyd<sup>30</sup>.

Abb. 12 zeigt die Infrarotspektren von synthetischem  $\beta$ -Carotin, Canthaxanthin,  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) und Torularhodin-methylester, die sich alle mit den Spektren der entsprechenden natürlichen Verbindungen zur Deckung bringen lassen. Die Bande der *trans*-CH=CH-Deformationsschwingung bei  $10,3 \mu$  ist ein gemeinsames Merkmal der ganzen Gruppe der Carotinoide<sup>34</sup>.

Auch Kernresonanzspektren werden zur Bestimmung der Struktur von Carotinoiden herangezogen. Am Beispiel von  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) sei gezeigt, wie jedem der verschiedenen Wasserstoffatome des Moleküls die entsprechende Bande zugeordnet werden kann (Abb. 13).

In neuester Zeit konnte WEEDON<sup>35</sup> die Struktur einiger Carotinoide mit Hilfe der Kernresonanzspektren sicherstellen.

Kleinste Strukturunterschiede kristalliner Verbindungen treten oft im Röntgenpulverdiagramm deutlicher hervor als in den Infrarotspektren. Auffallend ver-

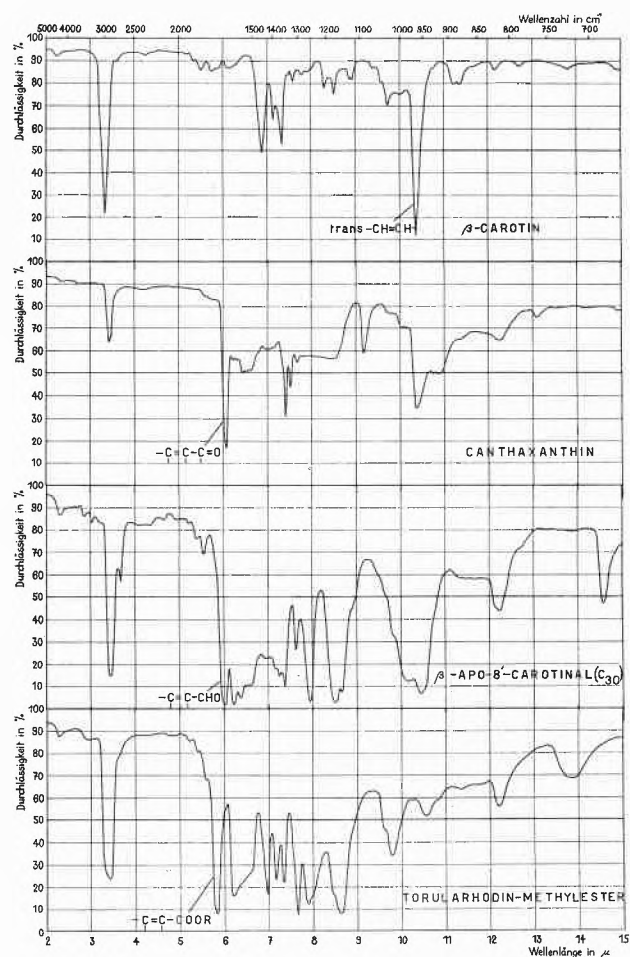


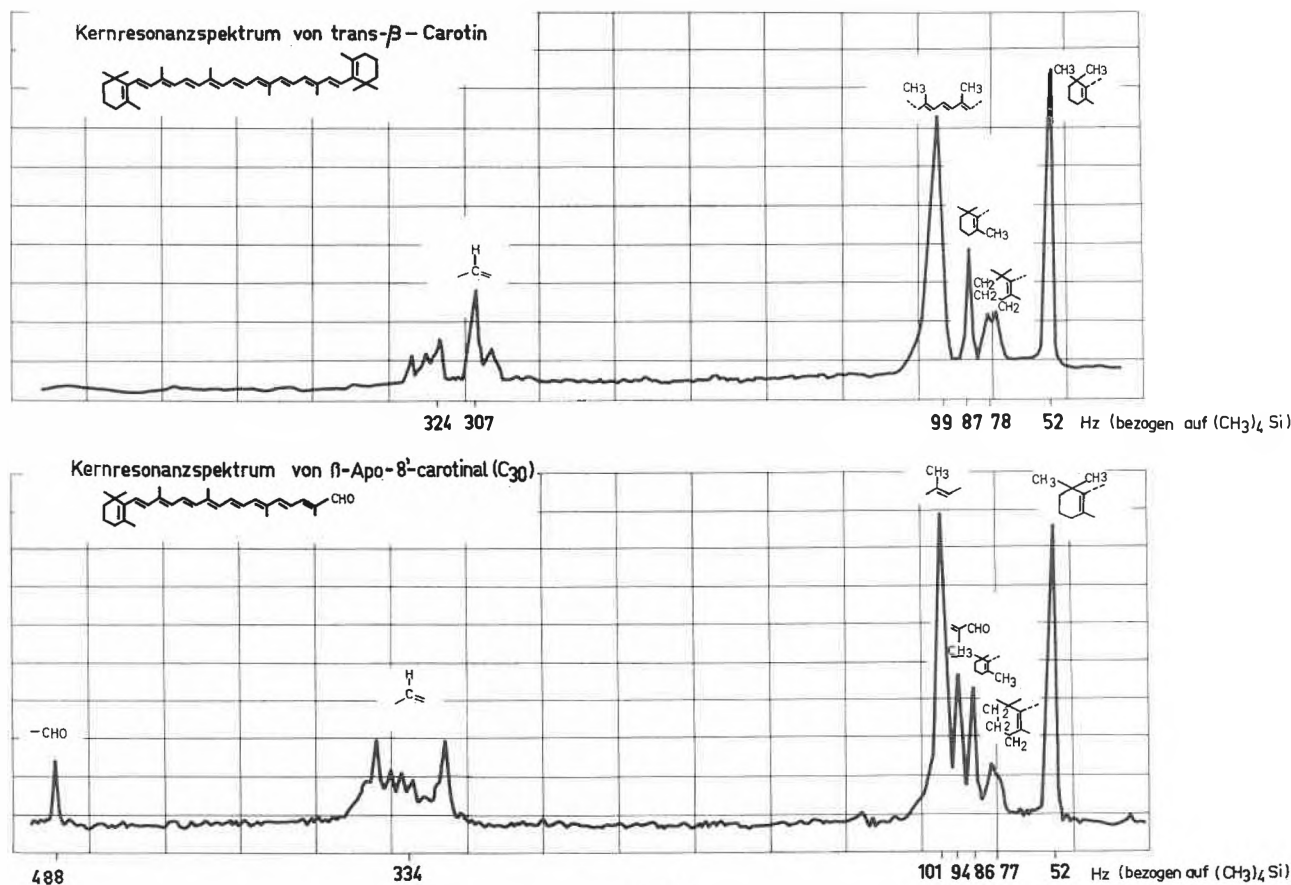
Abb. 12

<sup>34</sup> K. LUNDE und L. ZECHMEISTER, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 1647.

<sup>35</sup> M. S. BARBER, L. M. JACKMAN, C. K. WARREN und B. C. L. WEEDON, *Proc. Chem. Soc.* 1960, 19.

schieden sind beispielsweise die Röntgenpulverdiagramme von all-*trans*- $\beta$ -Carotin und 15,15'-*cis*- $\beta$ -Carotin, zwei Verbindungen, die sich nur in der Konfiguration der zentralen Doppelbindung unterscheiden (Abb. 14). Die *cis*-Verbindung zeigt an Netzebenen mit 6,9 Å Abstand eine ausgesprochen scharfe Reflexion, die im all-*trans*- $\beta$ -Carotin vollkommen fehlt. Diese Tatsache läßt sich für die quantitative Bestimmung der *cis*-Form in Handelsprodukten verwenden.

$\beta$ -Apo-8'-carotinsäure ( $C_{30}$ )-ester. Alle Präparate werden eingehend an Ratten und zum Teil an Hunden und Kaninchen geprüft. Für sämtliche Verbindungen wurden bisher je etwa 100 Ratten eingesetzt, welche diese Carotinoide als Futterzusätze oder mit der Schlundsonde erhalten. Die während der Versuchsdauer gesamthaft an die Tiere verabreichten Carotinoidmengen gehen aus Tabelle 4 hervor. Beispielsweise wurden bis heute total



### Toxizitätsprüfungen

Im Hinblick auf die Verwendung von Carotinoiden in der Lebensmittelindustrie ist es von Wichtigkeit, sie auf ihre chronische Toxizität zu prüfen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Prüfung der chronischen Verträglichkeit<sup>36, 37</sup>. In Untersuchung befinden sich fünf verschiedene Carotinoide:  $\beta$ -Carotin, Lycopin, Canthaxanthin,  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) und

rund 5 kg  $\beta$ -Carotin verfüttert. Abb. 15 zeigt die Gewichtsentwicklung von vier Rattengenerationen, welche einen Zusatz von 0,1%  $\beta$ -Carotin zum Futter erhalten. Dies entspricht einer täglichen  $\beta$ -Carotin-Aufnahme von etwa 50 mg pro kg Körpergewicht. Aus dem Kurvenbild geht hervor, zu welchem Zeitpunkt die Versuchstiere gepaart und die neuen Generationen in die Versuchsserie aufgenommen wurden. Die Gewichtsentwicklung der « $\beta$ -Carotin-Ratten» war bei allen vier Generationen ebensogut wie bei den unbehandelten Kontrolltieren. Die Verträglichkeit der untersuchten Carotinoide kann demnach als sehr gut bezeichnet werden.

<sup>36</sup> G. ZBINDEN und A. STUDER, *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.* 108 (1958) 113.

<sup>37</sup> R. E. BAGDON, G. ZBINDEN und A. STUDER, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2 (1960) 225.

Tabelle 4: Chronische Verträglichkeit von Carotinoiden  
Stand der Prüfungen am 1. April 1960

Carotinoid	Tierart	Tierzahl		Versuchsdauer Tage	Total verabreichte Carotinoide
		behandelt	Kontrolle		
$\beta$ -Carotin . . . . .	Hund	9	3	6-200	2600 g
	Kaninchen	5	0	77-730	1100 g
	Ratte	130	105	350-875	1200 g
Lycopin . . . . .	Hund	1	0	192	270 g
	Ratte	111	118	210-730	500 g
Canthaxanthin . . . . .	Hund	2	0	65-130	190 g
	Ratte	98	94	250-730	450 g
$\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) . . . . .	Ratte	92	94	250-730	450 g
$\beta$ -Apo-8'-carotinsäure ( $C_{30}$ )-ester . .	Ratte	174	40	200-430	1600 g

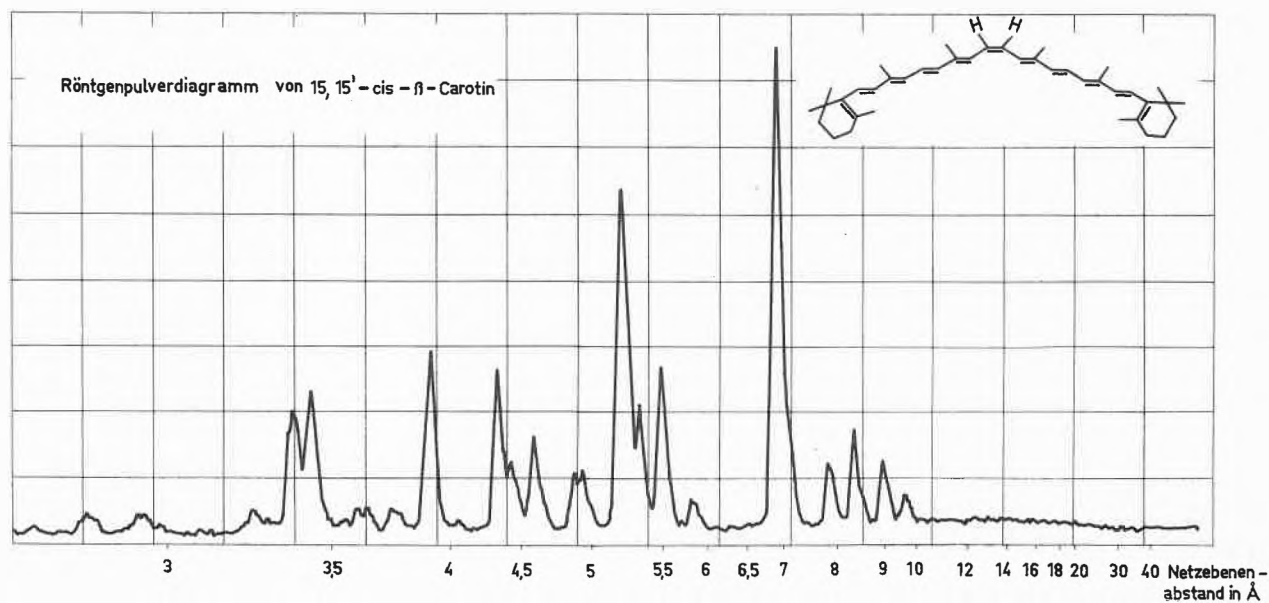
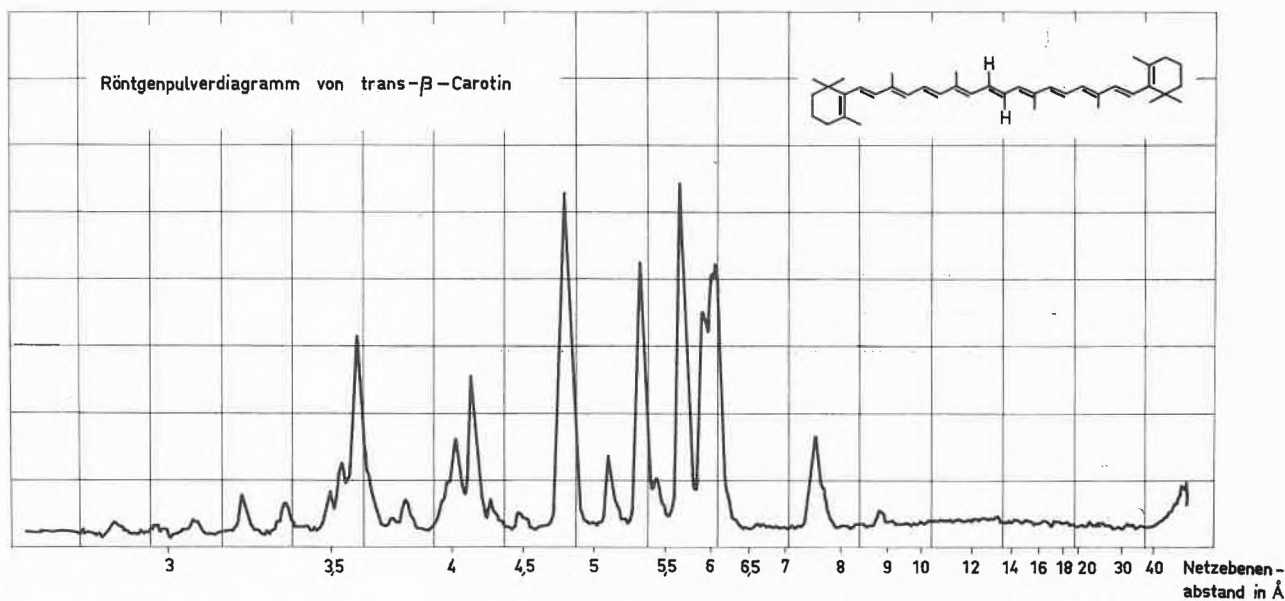


Abb. 14

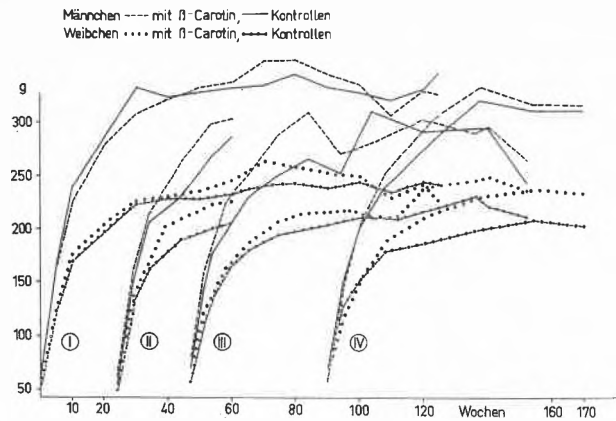


Abb. 15. Durchschnittsgewicht von Ratten mit 0,1%  $\beta$ -Carotin im Futter, vier Generationen

### Gebrauchsformen

Die Carotinoide sind im allgemeinen äußerst luftempfindliche Substanzen und in wässrigen Medien praktisch unlöslich. Die reinen, bei der Synthese anfallenden Kristalle lösen sich in Ölen und Fetten nur sehr langsam und in geringer Menge. Für ihre Verwendung in der Lebensmittelindustrie müssen deshalb beständige, leicht verarbeitbare und im zu färbenden Produkt genügend lösliche Gebrauchsformen geschaffen werden.

Die Färbung der Margarine mit  $\beta$ -Carotin erfolgt bei der Fabrikation zweckmäßigerweise in der geschmolzenen Fettphase. Um eine homogene Fettfärbung zu erzielen, ist es unerlässlich, daß sich das zugefügte  $\beta$ -Carotin in kürzester Zeit unter den üblichen Fabrikationsbedingungen vollständig löst. Dies wird erreicht mit einer besonders für die Margarine- und Fettfärbung geschaffenen Anwendungsform, einer Mikrokalldispersion von  $\beta$ -Carotin in Öl oder Fett (Farbtafel I). Mehr als 90% der darin enthaltenen Mikrokalldispersion sind kleiner als 10  $\mu$ . Dadurch ist die Oberfläche stark vergrößert und die Lösungsgeschwindigkeit entsprechend erhöht.

Für die Färbung von Butter und Rahm wurde eine noch leichter lösliche Gelform entwickelt<sup>38</sup>. Zu diesem Zweck wird die Mikrokalldispersion bei 50° mit einem pflanzlichen Öl verrührt, das eine geringe Menge Palmitinsäure enthält. Auf diese Weise entsteht ein bei Raumtemperatur gelierendes Produkt, das sich beim Rühren verflüssigt und leicht mit Butter und Rahm vermischt.

In den erwähnten Anwendungsformen wäre die Luftempfindlichkeit infolge der großen Oberfläche des  $\beta$ -Carotins sehr stark erhöht, wenn die Mikrokalldispersion nicht in Öl dispergiert würden. Aus der Stabilitätsprüfung bei 45° (Abb. 16) geht deutlich hervor, daß die Mikrokalldispersion in Pulverform als Gebrauchsform ungeeignet sind. Der Gehaltsverlust des makrokristallinen  $\beta$ -Carotins beträgt beim Lagern bei 45° nach sechs Wochen 20%, derjenige des Mikrokalldispersionspulvers unter den gleichen Be-

dingungen 70%. Die Suspension der Mikrokalldispersion in Öl (z. B. Arachisöl) hingegen zeigt praktisch keinen Gehaltsverlust und ist somit noch beständiger als  $\beta$ -Carotin in makrokristalliner Form.

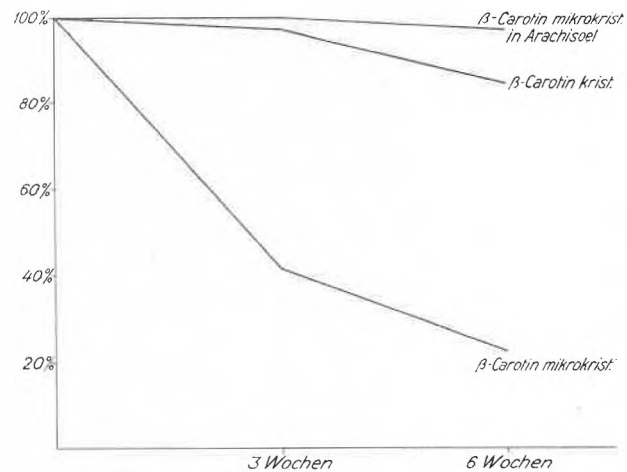


Abb. 16. Stabilität von  $\beta$ -Carotinpräparaten bei 45°

Die Mikrokalldispersion erhöht, wie oben erwähnt, die Lösungsgeschwindigkeit des  $\beta$ -Carotins, dagegen kann die gelöste Substanzmenge pro Volumeneinheit dadurch nicht beeinflusst werden. Eine Erhöhung der Konzentration der gelösten Substanz wird jedoch durch kurzes Erhitzen von  $\beta$ -Carotin in Öl auf über 100° erreicht<sup>39</sup>. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen all-*trans*- $\beta$ -Carotin und verschiedenen *cis*-Formen ein. Eine solche Öllösung zeigt eine leichte Farbverschiebung gegen Gelb und eine etwa 10prozentige Verminderung der Provitamin-A-Wirksamkeit.

Für Fruchtsäfte, Suppenprodukte und Dessertmischungen wurde eine wasserdispergierbare Form entwickelt<sup>40</sup>. Zu diesem Zweck wird eine übersättigte, ölige Carotininlösung unter Zusatz von Zucker in Gelatine emulgiert. Durch Versprühen der Emulsion und Auffangen in Stärkepulver erhält man ein Präparat in Form trockener Kügelchen, «beadlets» (Farbtafel II). Diese bilden beim Lösen in Wasser eine feine Emulsion, die dem Auge homogen erscheint, in der man aber unter dem Mikroskop Öltröpfchen erkennt (Farbtafel II).

Ölfreie Präparate, die sich in wässrigem Medium (z. B. Fruchtsäfte) kolloidal lösen, sind zurzeit im Versuchsstadium. Das Farbbild (Farbtafel I) zeigt, wie sich ein derartiges  $\beta$ -Carotinpräparat unter Gelierung kolloidal in Wasser löst.

Die auf der Farbtafel II abgebildete Flaschenreihe enthält reines Zuckerwasser, das nur mit  $\beta$ -Carotin und dem rotstichigeren  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) gefärbt wurde. Sie läßt die Mannigfaltigkeit der Farbtöne erkennen, die man mit diesen beiden Provitamin-A-Verbindungen erzielen kann.

<sup>38</sup> H. KLÄUI und H. MOOR, Schweiz. Pat. 338350.

<sup>40</sup> J. C. BAUERNFEIND und R. H. BUNNELL, U.S. Pat. 2861891 vom 13. Dezember 1956.

<sup>38</sup> R. H. BUNNELL und J. C. BAUERNFEIND, U.S. Pat. 2916385.

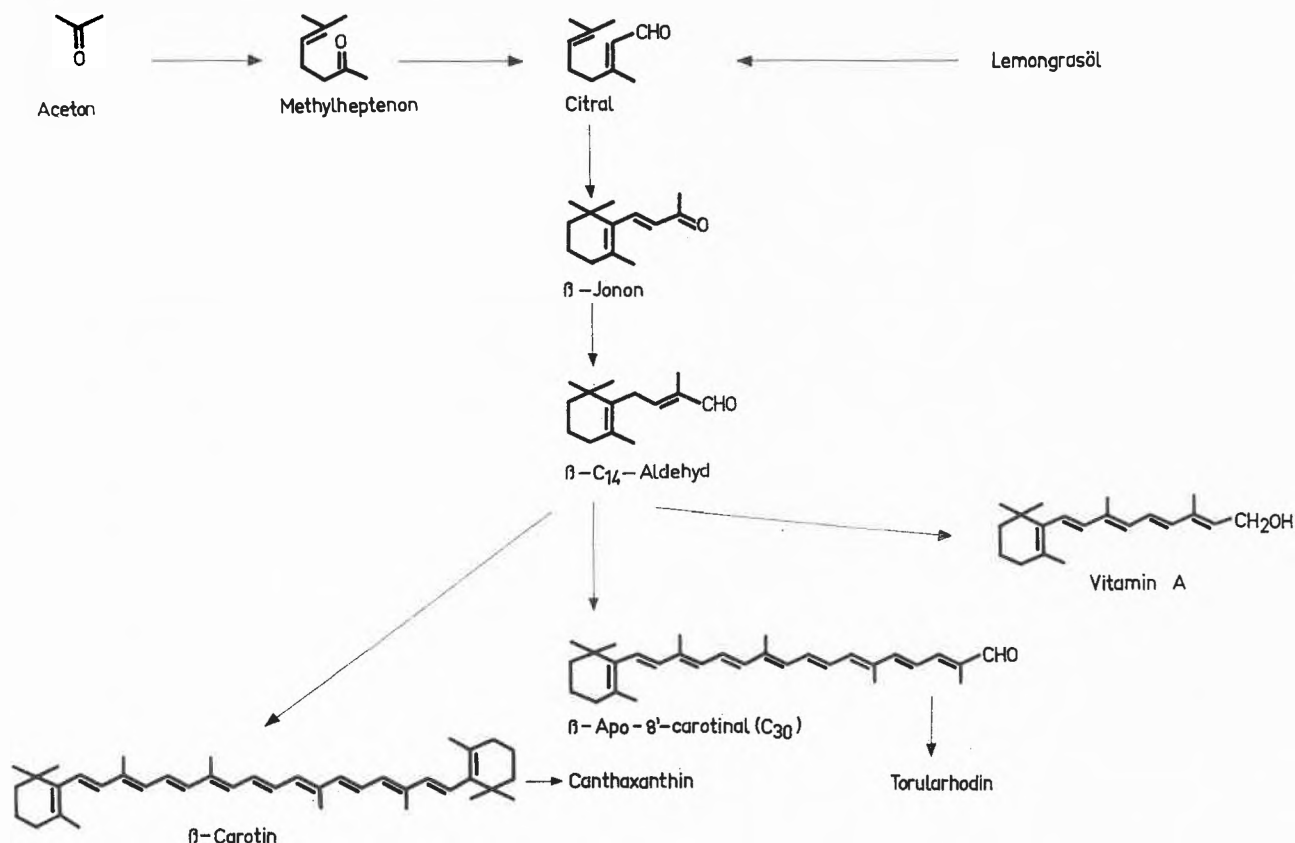


Abb. 17. Industrielle Synthesen

### Anwendung von Carotinoiden in der Geflügelhaltung

Seit fünfundzwanzig Jahren ist bekannt<sup>41</sup>, daß sauerstoffhaltige Carotinoide, die mit dem Futter aufgenommen werden, für die Färbung von Eigelb, Schnabel und Beinen zahlreicher Vögel verantwortlich sind. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit werden in modernen Geflügelzuchtereien die Tiere statt auf Grünflächen in Käfigen oder auf Tiefstreu gehalten und mit energiereichem, konzentriertem, oftmals Carotinoid-armem Futter ernährt. Bei Intensivhaltung stehen dem Geflügel oft nicht genügende Carotinoidmengen im Futter zur Verfügung, was zu schwach pigmentiertem Eidotter und blasser Hautfarbe der Tiere führt. Um dem entgegenzuwirken, ist es notwendig, das Futter mit Carotinoidzusätzen anzureichern.

Zahlreiche Versuche<sup>42</sup> ergaben, daß sich von den heute technisch zur Verfügung stehenden Carotinoiden β-Apo-8'-carotinal (C<sub>30</sub>) und Canthaxanthin am besten eignen. Das Farbbild (Farbtafel II) zeigt oben links das aufgeschlagene Ei einer mit Carotinoid-armen Grundfutter ernährten Henne. Durch Zusatz von β-Apo-8'-carotinal

(C<sub>30</sub>) zum Intensivfutter (beide Eier unten im Bild) gelingt es, jede beliebige, natürliche Eidotterfärbung zu erzielen.

Zusatz von Canthaxanthin bewirkt eine deutliche Pigmentierung von Haut und Läufen des Geflügels. Das Farbbild (Farbtafel II) zeigt oben ein mit Carotinoid-armem Intensivfutter gemästetes Huhn (blasse Hautfarbe!) im Vergleich zu einem mit demselben Grundfutter, aber zusätzlich mit Canthaxanthin ernährten Tier.

### Schlußbemerkungen

Abschließend sei die industrielle Synthese der Biosynthese der Carotinoide gegenübergestellt und die Stellung der Carotinoide in der Naturstoffklasse der terpenoiden Verbindungen aufgezeigt. Die industrielle Synthese (Abb. 17) basiert auf Citral, einem Monoterpen-Aldehyd, der totalsynthetisch oder aus Lemongrasöl gewonnen wird. Sie führt über β-Jonon und β-C<sub>14</sub>-Aldehyd einerseits zum β-Carotin und Canthaxanthin, andererseits zum β-Apo-8'-carotinal (C<sub>30</sub>) bzw. β-Apo-8'-carotinsäure (C<sub>30</sub>)-ester sowie Torularhodin und Vitamin A.

Die Biosynthese dieser Verbindungen geht aus von Acetat (Abb. 18). Über den C<sub>5</sub>-Baustein Isopentenylpyrophosphat und die C<sub>20</sub>-Einheit entsteht Phytoen und

<sup>41</sup> H. BROCKMANN und O. VÖLKER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 224 (1934) 193.

<sup>42</sup> P. STEINEGGER, K. STREIFF und P. ZELLER, *Mitt. Lebensm. Hyg.* 48 (1957) 445.

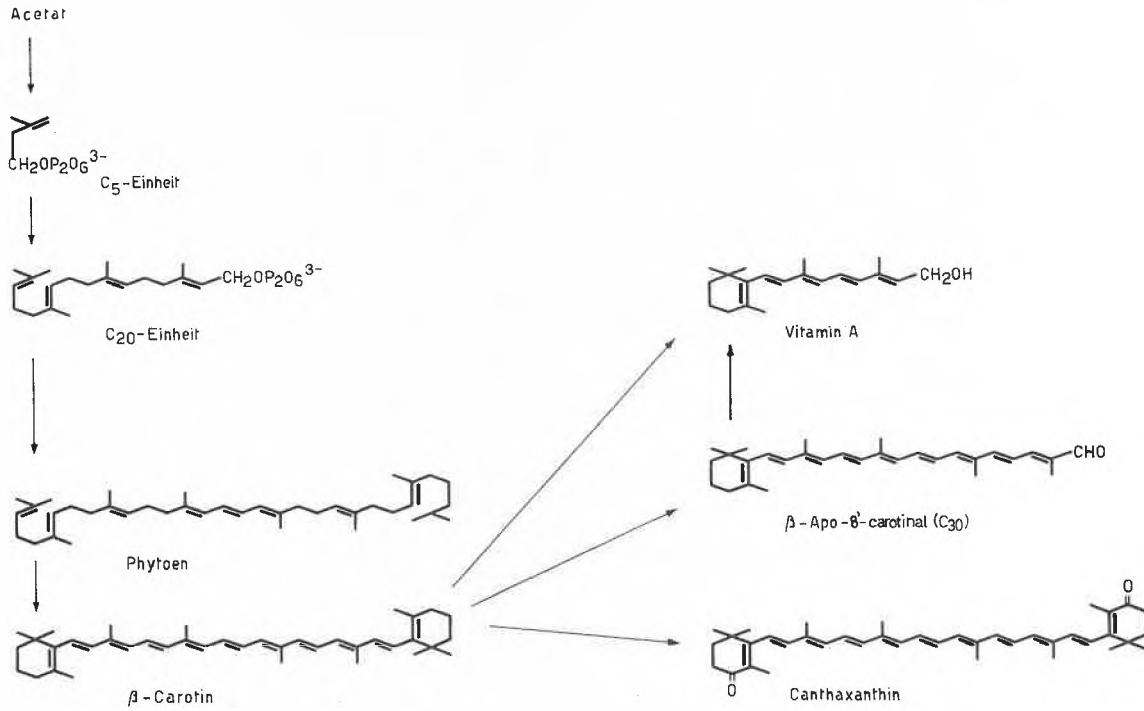


Abb. 18. Carotinoid-Biosynthese

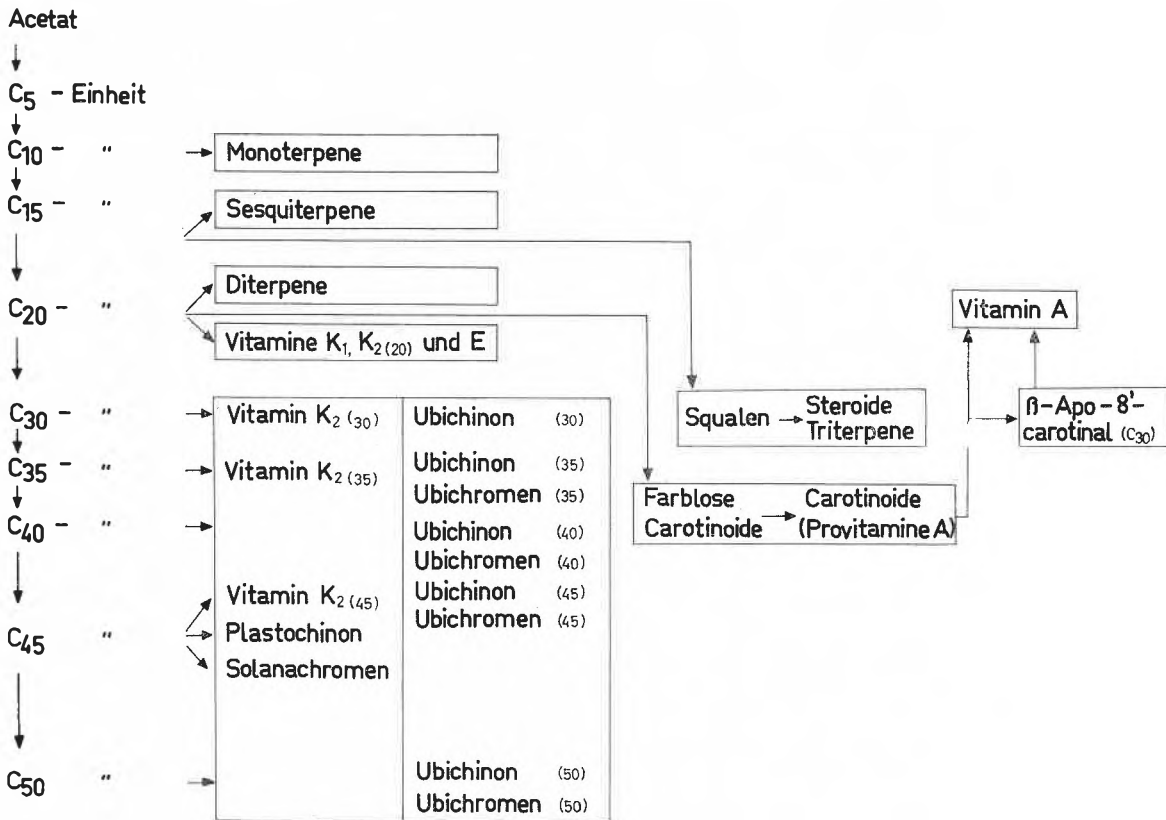


Abb. 19. Biogenese terpenoider Verbindungen

daraus  $\beta$ -Carotin. Durch Oxydation der beiden Allylstellungen des konjugierten Systems der Doppelbindungen von  $\beta$ -Carotin entsteht Canthaxanthin. Einseitiger oxydativer Abbau von  $\beta$ -Carotin ergibt  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ). Spaltung von  $\beta$ -Carotin in der Mitte und Abbau von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ( $C_{30}$ ) führen zu Vitamin A.

Abb. 19 veranschaulicht die biogenetische Stellung der Carotinoide innerhalb der Terpenverbindungen. Die Zelle baut sich durch schrittweise Kondensation von Isopren ( $C_5$ )-Einheiten die links angegebenen terpenoiden Kohlenstoffketten auf. Durch weitere Umwandlungen derselben entstehen die umrahmt angegebenen Verbindungsklassen. Beispielsweise führt die  $C_{10}$ -Einheit zu den Monoterpenen, die  $C_{15}$ -Kette zu den Sesquiterpenen. Aus der  $C_{20}$ -Komponente leiten sich die Diterpene und durch Kondensation mit aromatischen Komponenten die Vitamine  $K_1$ ,  $K_{2(20)}$  und E ab. Aus den längeren Terpenketten ( $C_{30}$  bis  $C_{50}$ ) entstehen die Vitamine  $K_2$ ,

die Ubichinone, das Plastochinon (oder Kofferchinon) und deren Umwandlungsprodukte, wie die Ubichromene und das Solanachromen<sup>43,44</sup>. Squalen, die Muttersubstanz der Steroide und Triterpene, bildet sich durch Verknüpfung von zwei  $C_{15}$ -Einheiten. Die Dimerisierung der  $C_{20}$ -Kette führt über die Stufen der farblosen Carotinoide zu den Carotinoid-Pigmenten.

Die Realisierung der industriellen Synthese mehrerer Carotinoide ist das Ergebnis jahrelanger Bemühungen, bei denen Naturstoffchemiker, Synthetiker, Verfahrensentwickler, Analytiker, Physiko-chemiker, Biologen und Mediziner zusammenwirkten. Es ist uns ein Bedürfnis, unseren Kollegen und Freunden auch an dieser Stelle für ihren Einsatz und die gute Zusammenarbeit herzlich zu danken.

<sup>43</sup> R. RÜEGG, A. LANGEMANN, G. RYSER und O. ISLER, *Chimia* 14 (1960) 129.

<sup>44</sup> O. ISLER, R. RÜEGG und A. LANGEMANN, *Chem. Weekbl.*, im Druck.