

312. Richard Kuhn und Nils Andreas Sörensen: Über Astaxanthin und Ooverdin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie; vorgetragen in d. Fachgruppe für Organ. Chemie auf d. 51. Hauptversammlung d. Vereins Deutscher Chemiker in Bayreuth am 9. Juni 1938*].

(Eingegangen am 28. Juli 1938.)

Das grüne Chromoprotein, das in den Eiern des Hummers (*Astacus gammarus*) in erstaunlich großen Mengen vorkommt, wird durch Alkohol, Aceton, verd. Säuren sowie durch Erhitzen leicht zerstört, wobei die Farbe nach Rot umschlägt. Die rote Farbstoffkomponente ist von R. Kuhn und E. Lederer¹⁾ in violetten, metallisch glänzenden Täfelchen, die oft schwalbenschwanzartige Zwillinge bilden, erhalten worden. Sie bezeichneten diesen Farbstoff als „Ovoester“, weil es ihnen gelang, aus ihm durch Einwirkung von alkohol. Natronlauge das auch aus dem Panzer und der Hypodermis von Hummern kristallisiert erhaltene Astacin zu gewinnen. Den „Ovoester“ konnten R. Kuhn, E. Lederer und A. Deutsch²⁾ ferner aus den Eiern der Seespinne (*Maja squinado*) isolieren. Die Elementaranalyse ergab 80.75% C und 8.75% H. Durch alkohol. Kalilauge erfolgte auch in diesem Falle Umwandlung in Astacin. P. Karrer und H. Hübner³⁾, welche die Eier von gekochten Hummern verarbeitet haben, fanden für den „Ovoester“ etwas niedrigere Kohlenstoffwerte (C = 79.91, 80.24; H = 8.82, 8.61) und bemerkten, daß diese ungefähr mit denjenigen übereinstimmen, die den Mono-estern des Astacins mit Capronsäure, Oenanthsäure und Caprylsäure zukommen. Sie zogen auch ungesättigte Carbonsäuren in Betracht und gaben an, daß beim Verseifen des Ovoesters sich ein eigentümlicher „traniger Geruch“ bemerkbar mache. Nicht erklärbar blieb, wieso ein Mono-ester des Astacins, das ja 2 saure Gruppen besitzt, aus Methanol auch auf Zusatz von verd. Natronlauge in Benzin übergetrieben werden kann, wie dies nach R. Kuhn und E. Lederer¹⁾ für den „Ovoester“ zutrifft. Diese Unstimmigkeiten waren aber nicht ausschlaggebend für die Neubearbeitung, zu der wir uns entschlossen haben.

Die interessanteste, noch ungelöste Frage war vielmehr: Wie kommt es, daß die Vereinigung eines roten Carotinoids mit einer farblosen Eiweißkomponente zu einem tief blaugrünen Chromoprotein führt? Bei der Bindung von farbigen prosthetischen Gruppen an Proteine sind Farbänderungen bekannt. Diese Änderungen sind aber meist nicht größer als diejenigen, die auch die freie Farbstoffkomponente erkennen läßt, wenn man sie z. B. der Salzbildung mit Alkalien unterwirft. Im gelben Ferment der Hefe z. B. befindet sich die Farbstoffkomponente, wie die Verschiebung der Absorption nach langen Wellen und das Fehlen von Fluoreszenz zeigen, in einem ganz ähnlichen Zustande wie das Lactoflavin als Anion in seinem Natriumsalz. Für die grüne Farbe des Ooverdins kam aber eine derartige Erklärung nicht in Betracht. Denn die Alkalisalze des Astacins unterscheiden sich von diesem in ihrer roten Farbe nur wenig, und auch die synthetisch gewonnenen Ester des Astacins, wie das Diacetat²⁾, zeigen in dieser Hinsicht gar keine auffallenden Eigenschaften.

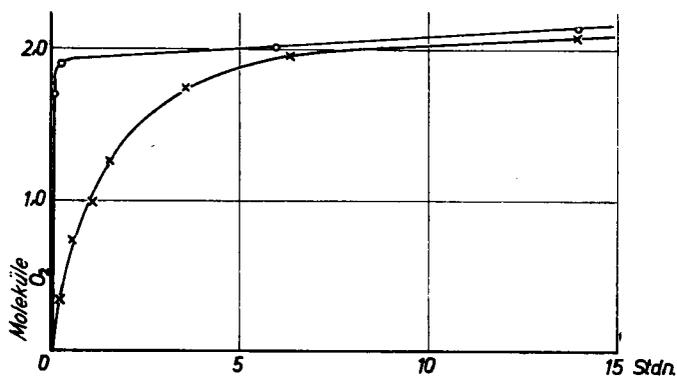
*) Angew. Chem. **51**, 465 [1938].

¹⁾ B. **66**, 488 [1933].

²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **220**, 229 [1933].

³⁾ Helv. chim. Acta **19**, 479 [1936].

Wir haben nun gefunden, daß der aus Hummereiern isolierte „Ovoester“ — entgegen seinem bisherigen Namen — gar kein Ester ist. Es liegt vielmehr ein hydroxylhaltiges Carotinoid mit 40 C-Atomen vor, also ein Xanthophyll, dessen Bruttoformel $C_{40}H_{52}O_4$ lautet, und das von nun an als Astaxanthin bezeichnet werden soll. Das Astaxanthin unterscheidet sich vom Astacin, $C_{40}H_{48}O_4$, durch einen Mehrgehalt von 4 H-Atomen. Dies zeigen die Elementaranalysen an. Beweisend ist die Feststellung, daß Astaxanthin in alkalischer Lösung genau 2 Mol. Sauerstoff verbraucht, wobei es glatt in Astacin übergeht: $C_{40}H_{52}O_4 + 2 O_2 \rightarrow C_{40}H_{48}O_4 + 2 H_2O_2$. Bei peinlichem Ausschluß von Sauerstoff bildet sich keine Spur Astacin. Es handelt sich also bei dem bisher als Verseifung angesprochenen Vorgang in Wirklichkeit um eine Autoxydation. Die Geschwindigkeit der O_2 -Aufnahme, die manometrisch gemessen wurde, ist aus Abbild. 1 ersichtlich.



Abbild. 1. O_2 -Verbrauch des Astaxanthins in alkal. Lösung.

Ausgehend von der Formel des Tetraketo- β -carotins, die P. Karrer, L. Loewe und H. Hübner⁴⁾ für das Astacin wahrscheinlich gemacht haben, läßt sich über die Konstitution des Astaxanthins folgendes aussagen: An Stelle der 4 Ketogruppen liegen 2 Ketogruppen und 2 sekundäre Hydroxyle vor. Es handelt sich um ein doppeltes α -Ketol. Die Hydroxyle des Astaxanthins lassen sich unschwer durch Veresterung nachweisen. Im Versuchsteil werden das Diacetat, Dicaprylat und Dipalmitat beschrieben. Die Darstellung von Tetraestern, die wir wiederholt versucht haben, gelang noch nicht: die Ketogruppen sind also unter den beim Astacin ausreichenden Bedingungen nicht enolisierbar⁵⁾. In Übereinstimmung damit steht es, daß Astaxanthin mit Methylmagnesiumjodid nur 2 Mol. Methan entwickelt und sein Diacetat bei 20° keine aktiven H-Atome erkennen läßt. Die 2 aktiven H-Atome des Astacins entsprechen der doppelten Anordnung $—CH_2.CO—$, beim Astaxanthin dagegen treten nur die 2 alkoholischen Hydroxyle bei der Zerewitinoff-Bestimmung und der Esterbildung in Erscheinung. Die Vorstellung, daß an die beiden Ketogruppen des Astaxanthins keine

⁴⁾ Helv. chim. Acta 18, 96 [1935].

⁵⁾ Die Acidität alicyclischer α -Ketole ist von konstitutiven Einflüssen stark abhängig. Nach A. Kötze, K. Blendermann, R. Rosenbusch u. E. Siringhaus, A. 400, 55 [1913], gibt α -Oxy-cyclo-heptanon (Oxysuberone) schon mit Pottasche das Kaliumsalz, α -Oxy-cyclo-hexanon (Cyclohexanolon) dagegen nicht.

sucht ist der Übergang von Benzoin in Benzil. Die mit Sauerstoff reagierende Verbindung ist in diesem Falle nach den kinetischen Untersuchungen von A. Weißberger, H. Manz und E. Strasser⁶⁾ zusammengesetzt aus 1 Mol. Benzoin und 1 Mol. Alkali, also entweder das Alkoholat des Benzoins oder das Mono-alkalisalz des Stilbendiols. Die letztere, wahrscheinlichere, Annahme entspricht der Erklärung von W. Manchot⁷⁾ für die Autoxydation des Dihydro-phenanthren-chinons und verwandter Verbindungen. Alicyclische α -Ketole, die dem Astaxanthin näher stehen als das Benzoin, nehmen bei Gegenwart von Alkali gleichfalls Sauerstoff auf, z. B. das 2-Oxytetralon-(1)⁸⁾, das unter Aromatisierung in Naphthalinsäure übergeht. Beim Carotinoid wird die Ausbildung aromatischer Ringe durch die *gem*-Dimethylgruppen verhindert.

Bei strengem Ausschluß von O₂ gibt Astaxanthin tief blaue Alkalisalze. Läßt man Luft Zutreten, so erfolgt augenblicklich Farbumschlag nach Rot, und es bildet sich unter Dehydrierung Astacin. Die Erscheinung erinnert an die von G. Scheuing und A. Hensle⁹⁾ aufgefundene Bildung des orangefarbenen Stilbendiolkaliums aus Benzoin und Kaliumalkoholat. Das Stilbendiolkalium reagiert nach H. Staudinger und A. Binkert¹⁰⁾ sowie nach H. Scheibler und F. Emden¹¹⁾ leicht mit Sauerstoff. Tieffarbige, äußerst luftempfindliche Alkalisalze sind auch schon bei Carotinoiden bekannt und als Dienolate formuliert worden. Nach R. Kuhn, P. J. Drumm, M. Hoffer und E. F. Möller¹²⁾ gibt Dihydro-crocetin-dimethylester tief blaue, Dihydro-bixin-dimethylester tief grüne Alkalisalze, die bei Zutritt von O₂ sofort zu *trans*-Crocetin-dimethylester bzw. *trans*-Bixin-methylester dehydriert werden. Im Hinblick auf diese Parallelen ist es sehr wahrscheinlich, daß die blauen Alkalisalze des Astaxanthins sich unter doppelter Enolisierung bilden und der Formel III entsprechen. Zur Elementaranalyse konnten diese Salze noch nicht gebracht werden. Es ließ sich aber feststellen, daß sie bei der Zerlegung durch verd. Schwefelsäure im Hochvakuum ausschließlich Astaxanthin zurückliefern. Diese Tatsache ist für die angegebene Formulierung von Bedeutung, weil im Falle des Benzoins neben dem orangeroten Stilbendiolkalium auch violette, luftempfindliche Alkalisalze bekannt sind, deren Oxydationsstufe in der Mitte zwischen jener des Benzoins und des Benzils steht, nämlich Ketylen¹³⁾ bzw. Chinhydronsalze¹⁴⁾. Wären die blauen Salze des Astaxanthins solche „Zwischenstufen“, so sollte die Zerlegung durch verd. Säuren ein Gemisch von 1 Mol. Astaxanthin + 1 Mol. Astacin liefern, wobei das letztere durch die alkalische Phasenprobe leicht nachweisbar sein müßte.

Es ist anzunehmen, daß auch das Ovoverdin ein Analogon des Stilbendiolkaliums darstellt. Wir erteilen daher dem natürlichen Chromoprotein die Formel IV, welche die blaugrüne Farbe erklärt. An die Stelle

⁶⁾ B. **62**, 1942 [1929]; **65** 1815 [1932].

⁷⁾ „Über die freiwillige Oxydation“, Leipzig 1900, S. 25.

⁸⁾ F. Straus, O. Bernouilly u. P. Mautner, A. **444**, 165 [1925].

⁹⁾ A. **440**, 72 [1924]. ¹⁰⁾ Helv. chim. Acta **5**, 703 [1922].

¹¹⁾ A. **434**, 265 u. zw. 270 [1923]. ¹²⁾ B. **65**, 1785 [1932].

¹³⁾ W. Schlenk u. A. Thal, B. **46**, 2840 [1913].

¹⁴⁾ H. Staudinger u. A. Binkert, Helv. chim. Acta **5**, 703 [1922]; vergl. auch J. U. Nef, A. **308**, 286 [1899] u. besonders E. Müller u. W. Wiesemann, A. **532**, 116 [1937].

mit zunehmender Reinigung dem Werte 1 : 500 zustrebt, den das Mol.-Gew. 300000 verlangt¹⁷⁾.

Ausgangsmaterial waren frische Eier von Nordsee-Hummern. Der Astaxanthingehalt wurde nach Zerlegung der Proteid-Fractionen durch Pyridin colorimetrisch am Stufenphotometer (C. Zeiss) abgelesen. Den Proteingehalt bestimmten wir nach dem Verfahren von A. Roche und F. Marquet¹⁸⁾ durch Fällung mit Tannin und Analyse des N-Gehalts der Niederschläge nach Kjeldahl. Zur Umrechnung auf Protein wurde die gefundene N-Menge mit 6.2 multipliziert. Die Reinigung des Ovoverdins erfolgte durch fraktionierende Adsorption an Aluminiumhydroxyd und fraktionierende Elution mit Dinatriumphosphat oder Ammonsulfat von 40% Sättigung¹⁹⁾, wobei alle Operationen im Kühlraum unter Stickstoff ausgeführt wurden. Wir gelangten so zu Präparaten mit einem Quotienten $Q = \text{Astaxanthin} : \text{Protein} = 1 : 242$, der sich durch Wiederholung der genannten Maßnahmen nicht weiter verändern ließ (Tafel 1). Die Belegzahlen finden sich im Versuchsteil. Die vorletzte Spalte (mg Astaxanthin insgesamt vorhanden) gibt ein Maß für die Ausbeuten nach jeder Elution an. Das Absorptions-Spektrum hatte sich im Laufe der Reinigungsoperationen nicht verändert (Abbild. 3).

Tafel 1.

$Q = \text{Protein} : \text{Astaxanthin}$ in Ovoverdin-Lösungen steigenden Reinheitsgrades.

Frakt.	Nr.	Q_I	Q_{II}	Q_{Mittel}	mg Astaxanthin	Mol.-Gew.
I	31 a	288	291	290	10.9	172000
II	31 b	272	282	277	8.7	165000
III	31 c	254	257	256	5.9	152000
IV	31 d	237	245	241	4.3	144000
V	31 e	245	238	242	3.2	144000
VI	31 f	238	241	240	2.7	143000

Das chemisch ermittelte Molekulargewicht des Ovoverdins ist also rund 144000. Es paßt gut zu demjenigen des Serumglobulins vom Pferd und des dissoziierten Phycocyanins aus *Ceramium*, deren Mol.-Gew. nach T. Svedberg²⁰⁾ das 8-fache der Einheit von 17600 ist ($8 \times 17600 = 140800$). Es ist doppelt so groß wie dasjenige des gelben Ferments aus Hefe, für das mit L. Birkofer²¹⁾ nach dem von uns angewandten Verfahren, ohne Hinzuziehung anderer Reinigungsoperationen, der von H. Theorell²²⁾ angegebene Wert 70000 bestätigt gefunden wurde. Beim gelben Ferment stimmt diese Zahl mit dem in der Ultrazentrifuge von R. A. Kekwick und K. O. Pedersen²³⁾ gefundenen Wert (80000) einigermaßen überein. Beim Ovoverdin ist dagegen das von uns gefundene chemische Molekulargewicht nur halb so groß wie das von R. W. G. Wyckoff in der Ultrazentrifuge ermittelte. Zur

¹⁷⁾ Das Mol.-Gew. des Astaxanthins (596.5) beträgt rund 600.

¹⁸⁾ Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 1630 [1935]; **19**, 613 [1937]; R. Kuhn u. P. Desnuelle, B. **70**, 1907 [1937].

¹⁹⁾ Zu diesem Verfahren vergl. R. Kuhn u. N. A. Sørensen, Angew. Chem. **51**, 465 [1938].

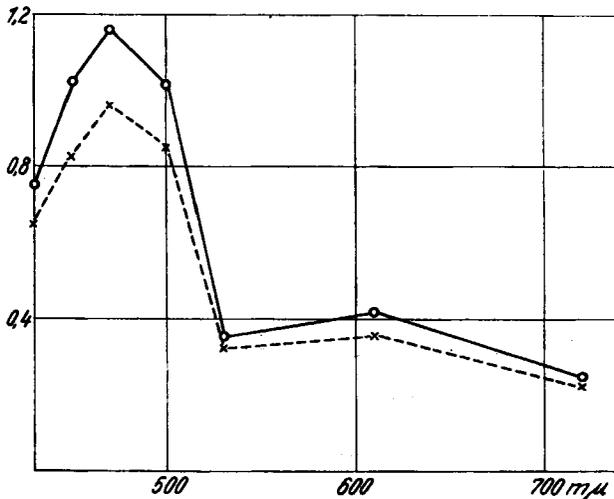
²⁰⁾ Nature **139**, 1051 [1937]; T. W. J. Taylor, Annu. Rep. Progr. Chem. for 1937 London 1938, S. 302.

²¹⁾ Unveröffentlicht.

²²⁾ Biochem. Ztschr. **272**, 155 [1935]; **278**, 263 [1935].

²³⁾ Biochem. Journ. **30**, 2201 [1937].

Klärung der Diskrepanz liegen 2 verschiedene Annahmen nahe: a) 1 Mol. Ooverdin enthält, entgegen der Angabe von K. G. Stern und K. Salomon, 2 Mol. Carotinoid; b) die grünen Farbstoffe aus den Eiern von *Homarus americanus* und von *Astacus gammarus* sind verschieden.



Abbild. 3. Stufenphotometrisch bestimmtes Absorptionsspektrum von Ooverdin. ×---× im rohen und o—o im reinen Zustand; roh: 31a, rein: 31e. Schwerpunkte der Filter: 430, 450, 470, 500, 530, 610 und 720 mμ. Ordinaten: Relative Farbstärken, auf gleiche Astaxanthinmengen bezogen.

In der roten Hypodermis des Hummers finden sich epiphatische Farbstoffe, die bisher für Ester des Astacins gehalten wurden¹⁾. Wie wir gefunden haben, handelt es sich aber um Ester des Astaxanthins. Denn man erhält, wenn man die Verseifung unter völligem Ausschluß von Sauerstoff vornimmt, die charakteristischen tieffarbigen Enolsalze, die erst bei Zutritt von Luft schlagartig zum Tetraketon dehydriert werden. Weitere Versuche haben gezeigt, daß auch die Chromoproteide des Panzers bei der Zerlegung durch Hitze oder durch verd. Säure das doppelte α -Ketol liefern. Der Farbstoff des gekochten Hummers ist also Astaxanthin (nicht Astacin). Dies wird vermutlich bei allen Crustaceen so sein, sofern nicht durch Fäulnis oder andere Einflüsse alkalische Reaktion zustandekommt, die beim Kochen die Autoxydation zum Tetraketon ermöglicht. Im Laufe der letzten Jahre ist Astacin bereits aus sehr zahlreichen Lebewesen in kristallisierter Form isoliert worden²⁴⁾. Die Durchsicht des Schrifttums ergibt, daß in jedem Falle in Anlehnung an die Vorschrift von R. Kuhn und E. Lederer¹⁾ ohne Ausschluß von Luftsauerstoff alkalisch verseift worden ist. Bis zum Beweis des Gegenteils wird man daher das Astacin aus der Liste der Naturfarbstoffe zu streichen haben.

²⁴⁾ vergl. neben L. Zechmeister, „Carotinoide“, Berlin 1934, J. Springer, S. 280 ff., besonders E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. **20**, 554, 567, 611 [1938]. Die meisten Crustaceen werden, auch in ganz frischem Zustande, beim Kochen schwach alkalisch, da allmählich etwas Ammoniak und Methylamin abgespalten werden. Nach D. B. Dill und P. B. Clark, Ind. engin. Chem. **18**, 560 [1926], werden dabei pH-Werte von 7.5 bis 8.5 erreicht.

G. Wald²⁵⁾ hat aus der Netzhaut von Vögeln Astacin isoliert: Wenn, wie wir vermuten, auch hier ursprünglich Astaxanthin vorkommt, so wird für diese Komponente des Sehpurpurs eine Bindung an Eiweiß, die für die physiologische Funktion von Bedeutung sein kann, besonders gut möglich erscheinen.

Beschreibung der Versuche.

Astaxanthin.

2.5 kg Hummereier, die in Norwegen unter gesättigter Ammonsulfatlösung gesammelt worden waren, wurden im Porzellanmörser unter Zugabe von etwas Aceton und Kohlensäureschnee zerdrückt. Der erhaltene Brei wurde abgenutscht und auf der Nutsche mit stark gekühltem Aceton ausgezogen, bis dieses farblos abließ. Den tiefrot gefärbten Aceton-Auszug versetzten wir mit $\frac{1}{5}$ Vol. Petroläther (Sdp. bis 50°) und gaben vorsichtig 1 Vol. dest. Wasser zu. Die Hauptmenge des Farbstoffs schied sich sofort in schönen glitzernden Täfelchen aus, die sich nach einiger Zeit in der Grenzschicht ansammelten. Es wurde abgesaugt, die Petrolätherschicht mit 90-proz. Methanol ausgeschüttelt, die Methanol-Lösung mit Petroläther überschichtet und durch vorsichtigen Zusatz von Wasser eine weitere Kristallisation erzielt. Das rohe Astaxanthin haben wir 2-mal aus Pyridin-Wasser nach der Vorschrift von R. Kuhn und E. Lederer¹⁾ umkristallisiert. Ausb. 750 mg. Schmp. 215.5—216° (Zers.). Getrocknet wurde über KOH und P₂O₅ (0.01 mm).

3.475 mg Sbst.: 10.24 mg CO₂, 2.70 mg H₂O.

C₄₀H₅₂O₄. Ber. C 80.48, H 8.79. Gef. C 80.36, H 8.69.

Auf die Formel C₄₀H₅₂O₄ stimmen auch die von R. Kuhn, E. Lederer und A. Deutsch²⁾ sowie von P. Karrer und H. Hübner³⁾ bereits ausgeführten Elementaranalysen des „Ovoesters“, deren Mittelwert C 80.52 und H 8.72 ergibt.

Aktive H-Atome nach Zerewitinoff-Roth²⁶⁾. 4.900 mg Sbst. in Pyridin bei 20°: 0.38 ccm CH₄; bei 95°: 0.53 ccm CH₄ (0°, 760 mm).

Gef.: 2.06 Mol. (20°) und 2.88 Mol. (95°) Methan.

5.512 mg Sbst. in Pyridin bei 21°: 0.215 ccm CH₄; bei 95°: 0.46 ccm CH₄ (0°, 760 mm). Gef.: 1.04 Mol. (21°) und 1.98 Mol. (95°) Methan.

Als α -Keton wurde zum Vergleich Benzoin („für calorimetrische Untersuchungen“) analysiert.

4.277 mg Sbst.: 0.58 ccm (24°) und 0.56 ccm CH₄ (95°).

Gef.: 1.28 Mol. (24°) und 1.24 Mol. (95°) Methan.

7.099 mg Sbst.: 0.847 ccm (20°) und 0.847 ccm CH₄ (95°).

Gef.: 1.13 Mol. (20°) und 1.13 Mol. (95°) Methan.

Benzoin reagiert also mit Methylmagnesiumjodid als einwertiger Alkohol und nicht als Stilbendiol. Die für Astaxanthin gefundenen Werte stehen daher mit der Formulierung als doppeltes α -Keton in Einklang.

Polarimetrische Prüfung: 7.22 mg Astaxanthin in 10 ccm Pyridin, $l = 2$ dm, $\lambda = 672.5$ m μ , $\alpha = \pm 0.03^\circ$. Das Drehungsvermögen kann danach nur sehr gering sein ($[\alpha]_D^{20} = \pm 20^\circ$). Sehr wahrscheinlich ist der Farbstoff optisch inaktiv.

Katalytische Mikrohydrierung²⁷⁾: 1.243 mg Astaxanthin in 2.00 ccm Eisessig mit 20.3 mg Platin-Kieselsäure (17% Pt). Nach 2 Stdn. Endwert 656 cmm H₂.

²⁵⁾ Nature **140**, 197 [1937].

²⁶⁾ F. Pregl-H. Roth, „Quant. organ. Mikroanalyse“, 4. Aufl., Berlin 1935, J. Springer, S. 192.

²⁷⁾ Nach R. Kuhn u. E. F. Möller, Angew. Chem. **47**, 145 [1934].

(0°, 760 mm) = 14.1 Mol. Wasserstoff. — 1.310 mg Astaxanthin in 2.00 ccm Eisessig mit 21.6 mg Platin-Kieselsäure (7% Pt). Nach 1½ Stdn. Endwert 696 cmm H₂ (0°, 760 mm) = 14.15 Mol. Wasserstoff.

O₂-Aufnahme in Gegenwart von Alkali: Die Messungen erfolgten mikro-manometrisch in der zur katalytischen Hydrierung üblichen Apparatur. Der Reaktionsverlauf ist aus Abbild. 1 ersichtlich.

2.996 mg Astaxanthin in 0.40 ccm Pyridin; im Anhang: 1.10 ccm Pyridin + 0.50 ccm 2-n. butylalkohol. Kalilauge. Nach 7 Stdn. 223 cmm (0°, 760 mm) = 2.13 Mol. O₂.

2.871 mg Astaxanthin in 0.40 ccm Pyridin; im Anhang: 0.80 ccm Pyridin + 0.80 ccm 2-n. butylalkohol. Kalilauge. Nach 6 Min. 209 cmm (0°, 760 mm) = 1.95 Mol. O₂, nach 14 Stdn. 248 cmm (0°, 760 mm) = 2.30 Mol. O₂.

Astaxanthin-diacetat.

49.6 mg Astaxanthin wurden in 5 ccm Pyridin gelöst, mit 2 ccm Essigsäureanhydrid versetzt und 48 Stdn. bei etwa 20° unter Luftabschluß stehengelassen. Auf vorsichtigen Zusatz von Wasser krystallisierte die Diacetyl-Verbindung in derben, tief blauschwarzen Nadeln aus. Zur Reinigung wurde 2-mal aus Pyridin-Wasser umkrystallisiert. Ausb. 39 mg und weitere 7 mg aus der Mutterlauge. Schmp. 203—205° (Berl.; evak. Röhrchen, unkorrr.).

3.735, 3.545 mg Sbst.: 10.575, 10.08 mg CO₂, 2.71, 2.59 mg H₂O.

C₄₄H₆₆O₆. Ber. C 77.59, H 8.29. Gef. C 77.22, 77.55, H 8.12, 8.17.

8.341 mg Sbst. in Pyridin bei 20°: 0.036 ccm CH₄, bei 95°: 0.216 ccm CH₄ (0°, 760 mm). Gef. 0.13 Mol. (20°) und 0.79 Mol. (95°) Methan. In der Kälte findet praktisch keine Gasentwicklung statt.

Bei der Verteilungsprobe zwischen Benzin und 90-proz. Methanol geht die Diacetylverbindung wie das freie Astaxanthin in die untere Schicht. Das Absorptionsspektrum ist in Abbild. 2 wiedergegeben.

Astaxanthin-dicaprylat.

16.4 mg Astaxanthin wurden in 3 ccm Pyridin gelöst und mit 0.15 ccm Caprylsäurechlorid versetzt. Wir hielten das Reaktionsgemisch 1 Stde. unter reinem Stickstoff bei 50—60° und gaben dann 25 ccm Äther zu. Nun wurde vorsichtig mit 25 ccm Wasser, 3-mal mit 25 ccm verd. Essigsäure, nochmals mit Wasser, 2-mal mit je 50 ccm n₁-Natriumcarbonat und schließlich wieder 2-mal mit Wasser gut ausgeschüttelt. Die getrocknete Ätherlösung wurde unter CO₂ verdampft, der Rückstand in Petroläther aufgenommen und an Calciumcarbonat chromatographiert. Wir erhielten oben einen violettstichigen Farbring, auf den eine breite rote Zone und unter dieser ein wenig scharfer braunroter Farbring folgten. Die mittlere Zone wurde mit Petroläther-Benzol eluiert, verdampft, in wenig Petrolbenzin gelöst und mit etwas Methanol versetzt, worauf sich im Eisschrank der Dicaprylsäure-ester in dunkelroten krystallinen Körnern abschied. Schmp. nicht sehr scharf 121—124° (Berl., evak. Röhrchen).

Das Astaxanthin-dicaprylat nimmt bei der Phasenprobe eine interessante Mittelstellung zwischen dem Diacetat und Dipalmitat ein. Aus der Benzinlösung läßt sich durch 90-proz. Methanol nur ganz wenig ausschütteln. Mit 95-proz. Methanol bleibt noch mehr als die Hälfte im Benzin, mit 97-proz. Methanol geht aber die Hauptmenge des Farbstoffs in die untere Schicht.

Astaxanthin-dipalmitat.

35.9 mg Astaxanthin wurden in 5.5 ccm Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0.30 ccm Palmitinsäurechlorid versetzt. Wir erwärmten 1 Stde. unter reinem Stickstoff auf etwa 50° und fügten nach dem Erkalten 40 ccm Methanol zu. Im Eisschrank fiel allmählich ein roter Niederschlag aus, der aus Petroläther mit Methanol umgefällt wurde. C,H-Bestimmungen zeigten, daß dieses Produkt noch viel Methylpalmitat enthielt. Es wurde daher in Petroläther durch eine Säule von Calciumcarbonat filtriert, das Chromatogramm mit Benzol:Petroläther = 1:9 entwickelt und mit Benzol:Petroläther = 1:1 eluiert. Durch langsames Krystallisieren aus Pyridin-Methanol-Wasser kann man die Substanz in flachen, zugespitzten Nadeln von violett-roter Farbe erhalten. Schmp. 71.5—72.5°.

3.305, 3.205 mg Sbst.: 9.71, 9.44 mg CO₂, 3.12, 2.93 mg H₂O.

C₇₂H₁₁₂O₆. Ber. C 80.53, H 10.52. Gef. C 80.13, 80.33, H 10.56, 10.23.

Das Astaxanthin-dipalmitat ist auch gegenüber 95-proz. Methanol rein epiphasisch.

Reinigung des Ovoverdins durch wiederholte Adsorptionen an Aluminiumhydroxyd.

Die der Tafel 1 zugrunde liegenden Analysen lauten:

Fraktion I (Nr. 31a, vorgereinigter Auszug). — Farbstoff: $\lambda = 500 \text{ m}\mu$, D (0.1 cm) = 20.4, $\alpha = 0.690$, $c = (2.30 \times 0.690 \times 4 \times 592) : (0.1 \times 208 \times 10^3) = 181 \gamma$ Astaxanthin/ccm. Je 0.10 ccm verbr. nach Kjeldahl 2.94 und 3.04 ccm n_{100} -HCl.

$3.98 \times 0.14 \times 6.2 \times 10 \times 2 = 51.7 \text{ mg Protein/ccm.}$

$3.04 \times 0.14 \times 6.2 \times 10 \times 2 = 52.7 \text{ mg Protein/ccm.}$

Fraktion II (Nr. 31b, Albumin-Fraktion). Farbstoff: $\lambda = 500 \text{ m}\mu$, D (0.1 cm) = 22.6, $\alpha = 0.646$, $c = (2.30 \times 0.646 \times 4 \times 592) : (0.1 \times 208 \times 10^3) = 169 \gamma$ Astaxanthin/ccm. Je 0.10 ccm verbr. nach Kjeldahl 2.65 und 2.75 ccm n_{100} -HCl.

$2.65 \times 0.14 \times 6.2 \times 10 \times 2 = 46.0 \text{ mg Protein/ccm.}$

$2.75 \times 0.14 \times 6.2 \times 10 \times 2 = 47.7 \text{ mg Protein/ccm.}$

Fraktion III (Nr. 31c, 1. Elution mit Na₂HPO₄). Farbstoff: $\lambda = 500 \text{ m}\mu$, D (0.5 cm) = 48.2, $\alpha = 0.317$, $c = (2.3 \times 0.317 \times 4 \times 592) : (0.5 \times 208 \times 10^3) = 16.6 \gamma$ Astaxanthin/ccm. Je 1 ccm nach Kjeldahl verbr. 2.43 und 2.46 ccm n_{100} -HCl.

$2.43 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 4.22 \text{ mg Protein/ccm.}$

$2.46 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 4.27 \text{ mg Protein/ccm.}$

Fraktion IV (Nr. 31d, 2. Elution mit Na₂HPO₄). Farbstoff: $\lambda = 500 \text{ m}\mu$, D (0.5 cm) = 41.1, $\alpha = 0.386$, $c = (2.3 \times 0.386 \times 4 \times 592) : (0.5 \times 208 \times 10^3) = 20.2 \gamma$ Astaxanthin/ccm. Je 1 ccm verbr. nach Kjeldahl 2.76 und 2.85 ccm n_{100} -HCl.

$2.76 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 4.79 \text{ mg Protein/ccm.}$

$2.85 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 4.95 \text{ mg Protein/ccm.}$

Fraktion V (Nr. 31e, 3. Elution mit Na₂HPO₄). Farbstoff: $\lambda = 500 \text{ m}\mu$, D (0.5 cm) = 40.36, $\alpha = 0.396$, $c = (2.3 \times 0.396 \times 4 \times 592) : (0.5 \times 208 \times 10^3) = 20.8 \gamma$ Astaxanthin/ccm. Je 1 ccm nach Kjeldahl verbr. 2.94 und 2.85 ccm n_{100} -HCl.

$2.94 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 5.10 \text{ mg Protein/ccm.}$

$2.85 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 4.95 \text{ mg Protein/ccm.}$

Fraktion VI (Nr. 31f, Elution mit (NH₄)₂SO₄). Farbstoff: $\lambda = 500 \text{ m}\mu$, D (0.5 cm) = 26.2, $\alpha = 0.582$, $c = (2.3 \times 0.582 \times 4 \times 592) : (0.5 \times 208 \times 10^3) = 30.5 \gamma$ Astaxanthin/ccm. Je 1 ccm nach Kjeldahl verbr. 4.18 und 4.24 ccm n_{100} -HCl.

$4.18 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 7.26 \text{ mg Protein/ccm.}$

$4.24 \times 0.14 \times 6.2 \times 2 = 7.36 \text{ mg Protein/ccm.}$

Die in der vorletzten Spalte von Tafel 1 verzeichneten Ausbeuten geben an, wieviel Astaxanthin als Protein noch vorhanden gewesen wäre, wenn man nichts für Farbstoff- und N-Bestimmung nach jeder Adsorption und Elution weggenommen hätte.