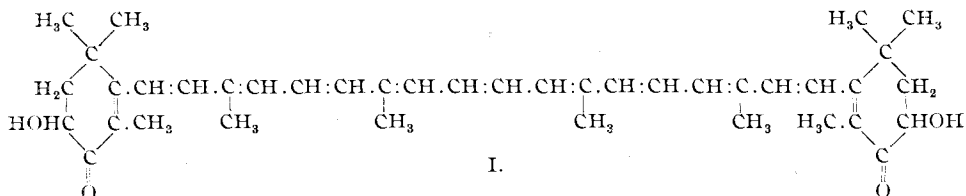


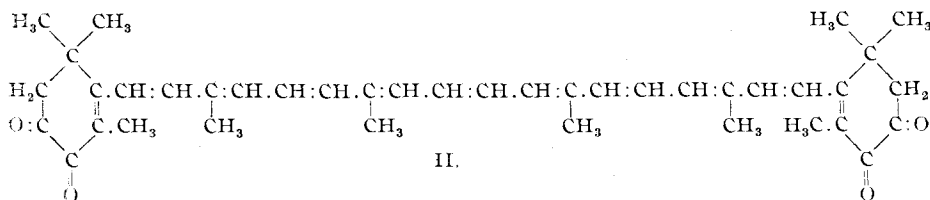
285. Richard Kuhn, Jörgine Stene und Nils Andreas Sørensen: Über die Verbreitung des Astaxanthins im Tier- und Pflanzenreich.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 6. Juli 1939.)

Die Farbstoffe des Hummers leiten sich, wie wir gezeigt haben¹⁾, ab von einem doppelten α -Ketol des β -Carotins, dem Astaxanthin(I).



In der roten Hypodermis findet sich dieser Farbstoff in Form von Fettsäureestern, im blauschwarzen Panzer und in den grünen Eiern ist er als doppeltes Dienol an Proteine gebunden. Unter der Einwirkung von Alkali bei Zutritt von Luft erfolgt äußerst leicht Autoxydation zum Tetraketon, dem Astacin (II).



Man hatte dieses ursprünglich für ein Verseifungsprodukt gehalten, woraus sich die ältere Bezeichnung „Ovoester“⁽²⁾ für das Astaxanthin erklärt. Wir haben bereits darauf hingewiesen¹⁾, daß bei der Isolierung von Astacin aus den verschiedensten Tieren stets in Anlehnung an die Vorschrift von R. Kuhn und E. Lederer²⁾ ohne Ausschluß von Luftsauerstoff alkalisch verseift worden ist und es sich daher sehr wahrscheinlich beim Astacin allgemein um ein aus Astaxanthin gebildetes Kunstprodukt handelt.

In Tafel I findet sich eine Zusammenstellung aller bisher bekannt gewordenen Vorkommen, aus denen Astacin krystallisiert erhalten worden ist. Das Zeichen + bedeutet, daß Astaxanthin in krystallisierter Form isoliert oder durch die charakteristische Farbreaktion mit Alkoholat unter Luftabschluß nachgewiesen ist. Ein ? bedeutet, daß ein solcher Nachweis noch aussteht. Man erkennt, daß in allen Fällen, in denen die entscheidende Prüfung vorliegt, tatsächlich nur Astaxanthin vorkommt. Dies gilt für die verschiedensten Klassen der Lebewesen, von den Grünalgen bis zu den Vögeln. Es ist kaum anzunehmen, daß in den noch fraglichen Beispielen sich Astacin als Naturprodukt erweisen wird.

Besonders hervorzuheben ist das Vorkommen des Astaxanthins in der Grünalge *Hämatococcus pluvialis*, da dieser Farbstoff bisher allgemein

¹⁾ R. Kuhn u. N. A. Sørensen, B. **71**, 1879 [1938].

²⁾ R. Kuhn u. E. Lederer, B. **66**, 488 [1933].

als tierisches Pigment gegolten hat. J. Tischer³⁾ hatte aus der chlorophyllführenden Flagellate *Euglena heliorubescens* ein Carotinoïdketon isoliert und unter dem Namen Euglenarhodon beschrieben, das mit Astacin isomer sein und die Formel des 4.6.4'.6'-Tetraketo- β -carotins besitzen sollte. Später⁴⁾ isolierte er denselben Farbstoff aus den roten Dauersporen von *Hämatococcus pluvialis*. Die sehr charakteristischen Krystallaufnahmen des Euglenarhodons, die J. Tischer veröffentlicht hat, stimmen ebenso wie alle übrigen Eigenschaften auf Astacin, doch gibt er an, daß mit *o*-Phenylendiamin kein Phenazinderivat erhalten werden konnte.

Es war unsere Absicht, festzustellen, ob das Euglenarhodon ähnlich dem Astacin durch Autoxydation bei der Verseifung der natürlich vorkommenden Ester aus einem noch unbekanntem Ketol entsteht. Wir wählten zur Prüfung *Hämatococcus pluvialis* und erhielten von Hrn. Prof. M. Hartmann vom Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem, dem wir dafür aufrichtig danken, eine Probe derselben Dauersporen, die seinerzeit Hr. F. Moewus Hrn. J. Tischer überlassen hatte. Die Züchtung nahmen wir nach der Vorschrift von F. Moewus vor, der auch J. Tischer gefolgt war. Der durch Chromatographie an Zucker rein dargestellte Farbstoffester A, der nach Schmp., Elementaranalyse und anderen Eigenschaften den Angaben Tischers entsprach, gab mit Alkoholat im Hochvakuum eine blauschwarze Lösung, deren Farbe bei Zutritt von Luft sofort nach Rot umschlug. Der zeitliche Verlauf und die auftretenden Farbtöne waren genau die gleichen wie bei Astaxanthin aus Hummern und dessen Fettsäureestern. Da das Euglenarhodon selbst so wie Astacin keine derartige Farb-reaktion gibt, sondern ein orangerotes Kaliumsalz bildet, ist ersichtlich, daß der native Ester A nicht der Ester eines Tetraketons sein kann. Überdies stellte dieser Befund die von J. Tischer angenommene Konstitutionsformel des Euglenarhodons in Frage, weil sich von einem 4.6.4'.6'-Tetraketon keine dem Astaxanthin entsprechenden autoxydablen Tetra-enole ableiten lassen. Das durch alkalische Verseifung der nativen Farbstoffester erhaltene Carotinoïd stimmte in allen Eigenschaften mit Astacin aus Hummern überein und gab wie dieses mit *o*-Phenylendiamin nach der Vorschrift von P. Karrer und L. Loewe⁵⁾ das bekannte Diphenazinderivat. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen beider Farbstoffe ließen ebenfalls keinen Unterschied erkennen. An der Identität von Euglenarhodon mit Astacin ist mithin kein Zweifel möglich.

Alle nativen Farbstoffester von *Hämatococcus* geben die für Astaxanthin charakteristische Farb-reaktion mit Alkoholat im Hochvakuum. Die mikro-manometrische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs ergab in allen Fällen, daß bei der Dehydrierung 4 H-Atome abgegeben werden. Für das Vorkommen eines Carotinoïds, das in der Mitte zwischen Astacin und Astaxanthin steht, also im einen Ring die Gruppierung des Ketols, im anderen diejenige des Diketons besitzt, hat sich hier, wie auch sonst, bisher kein Anhaltspunkt ergeben. Den Ester A hat J. Tischer⁶⁾ als Dipalmitinsäureester angesprochen, nachdem er aus den Mutterlaugen des krystalli-

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **239**, 257 [1936].

⁴⁾ J. Tischer, Ztschr. physiol. Chem. **250**, 147 [1937]; **252**, 225 [1938]; **259**, 163 [1939].

⁵⁾ Helv. chim. Acta **17**, 745 [1934].

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **252**, 225 [1938].

Tafel I.

Name	Astaxou- föhn	Anmerkung	Literatur
I. Grünalgen: Hämatooccus pluvialis	+	Epiphasischer Ester ¹⁾ 2)	R. Kuhn, J. Stene u. N. A. Sörensen ¹⁾ , J. Tischer ²⁾
II. Protozoa: Euglena helioorthescens	+	„ „	J. Tischer ²⁾
III. Spongiaria: Axinella crista-galli	?	„ „	P. Karrer u. U. Solmssen ⁴⁾
IV. Crustacea: a) Malacostraca: 1) Schizopoda Euphausia	?	„ „	J. C. Drummond u. Ph. MacWalter ¹²⁾
2) Decapoda: Astacus gammarnus, Panzer	+	blauschwarzes Chromoproteid	R. Kuhn u. N. A. Sörensen ⁵⁾
„ „ Hypodermis	+	epiphasischer Ester	„ „ „ ⁵⁾
„ „ Eier	+	grünes Chromoproteid (Oxyoverdin)	„ „ „ ⁶⁾
Maja squinado, Eier	+	frei	R. Kuhn, E. Lederer u. A. Deutsch ⁸⁾
Palinurus vulgaris	?	„ „	R. Fabre u. F. Lederer ⁷⁾
Portunus puber	?	„ „	„ „ „ ⁷⁾
Nephrops species	?	„ „	„ „ „ ⁷⁾
Leander serratus	?	„ „	„ „ „ ⁷⁾
Cancer pagurus	?	„ „	„ „ „ ⁷⁾
Potamobius astacus	?	„ „	„ „ „ ⁷⁾
Eupagurus prideauxii	?	„ „	„ „ „ ⁷⁾ , H. Willstaedt ⁸⁾
b) Copepoda: Calanus finmarchicus	+	teils frei, teils verestert	E. Lederer ⁹⁾
Heteropepe saliens	?	blaues Chromoproteid	H. v. Euler, H. Hellström u. E. Klussmann ¹⁰⁾ , E. Lederer ⁹⁾
c) Phyllopoda: Holopedium gibberum	?	„ „	N. A. Sörensen ¹¹⁾
d) Arthrostraca: Gammarnus pulex	+	olivbraunes oder blaues Chromo- proteid	N. A. Sörensen ¹¹⁾
V. Mollusca (Lamellibranchiata): Lima excavata	?	„ „	N. A. Sörensen ¹¹⁾

VI. Echinoderma:					
Ophiaster ophidianus	?				P. Karrer u. F. Benz ¹³⁾
Echinaster sepositus	?				P. Karrer u. U. Solmssen ⁴⁾
VII. Tunicata (Asciaceae):					
Dendrodoa grossularia	+	violettrotes Chromoproteid			E. Lederer ⁹⁾
Halocynthia papillosa	+				E. Lederer ⁹⁾
VIII. Fische:					
Regalecus glesne, Leber	+	frei			N. A. Sörensen ¹⁴⁾ , R. Kuhn, J. Stene u. N. A. Sörensen ¹⁾
Lophius piscatorius, Leber	?	olivbraunes Chromoproteid			N. A. Sörensen ¹⁴⁾
Beryx decadactylus, Haut	?	epiphasischer Ester			E. Lederer ¹⁵⁾
Carassius auratus, Haut	?	"			E. Lederer ¹⁵⁾
Cyclopterus lumpus, Leber	?				N. A. Sörensen ¹⁶⁾
Salmo salar, Muskelfleisch	?	frei			N. A. Sörensen ¹⁶⁾
Salmo trutta, "	+	epiphasischer Ester			N. A. Sörensen u. J. Stene ¹⁷⁾
Sebastes marinus, Haut	?	"			E. Lederer ⁹⁾
Perca fluviatilis, Flossen	?	"			E. Lederer ⁹⁾
IX. Reptilia:					
Clemmys insculpta, Retina	?				G. Wald u. H. Zussmann ¹⁹⁾
X. Vögel:					
Phasianus colchicus, „Rosen“	+	teils frei, teils epiphasischer Ester			R. Kuhn, J. Stene u. N. A. Sörensen ¹⁾ , H. Brockmann u. O. Völker ¹⁸⁾
Haushuhn, Retina	+	epiphasischer Ester			R. Kuhn, J. Stene u. N. A. Sörensen ¹⁾ , G. Wald u. H. Zussmann ¹⁹⁾
XI. Säugetiere:					
Balaenoptera musculus, Fett	?	frei			S. Schmidt-Nielsen, N. A. Sörensen u. B. Trumpp ²⁰⁾ , G. N. Burkhardt u. Mitarbb. ²¹⁾

¹⁾ Diese Arbeit. ²⁾ J. Tischer, Ztschr. physiol. Chem. **250**, 147 [1937]. ³⁾ J. Tischer, Ztschr. physiol. Chem. **239**, 257 [1936]. ⁴⁾ P. Karrer u. U. Solmssen, Helv. chim. Acta **18**, 915 [1935]. ⁵⁾ R. Kuhn u. N. A. Sörensen, B. **71**, 1879 [1938]. ⁶⁾ R. Kuhn, E. Lederer u. A. Deutsch, Ztschr. physiol. Chem. **220**, 229 [1933]. ⁷⁾ R. Fabre u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. **20**, 567, 554, 611 [1938]. ⁸⁾ H. Willstaedt, Svensk kem. Tidskr. **46**, 205, 261 [1934]. ⁹⁾ E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. **20**, 567, 554, 611 [1938]. ¹⁰⁾ H. v. Euler, H. Hellström u. E. Klussmann, Ztschr. physiol. Chem. **228**, 77 [1934]. ¹¹⁾ N. A. Sörensen, Kgl. Norske Vid. Selsk. Skr. **1936**, Nr. 1. ¹²⁾ J. C. Drummond u. R. McWalter, Journ. exp. Biology **12**, 105 [1934]. ¹³⁾ P. Karrer u. F. Benz, Helv. chim. Acta **17**, 412 [1934]. ¹⁴⁾ N. A. Sörensen, Tidskr. Kjemt Bergves **1935**, 12. ¹⁵⁾ E. Lederer, Compt. rend. Séances Biol. Filiales Associées **118**, 542 [1935]. ¹⁶⁾ N. A. Sörensen, Ztschr. physiol. Chem. **235**, 8 [1935]. ¹⁷⁾ N. A. Sörensen u. J. Stene, Kgl. Norske Vid. Selsk. Skr. **1938**, Nr. 9. ¹⁸⁾ H. Brockmann u. O. Völker, Ztschr. physiol. Chem. **224**, 193 [1934]. ¹⁹⁾ G. Wald u. H. Zussmann, Journ. biol. Chem. **122**, 449 [1938]. ²⁰⁾ S. Schmidt-Nielsen, N. A. Sörensen u. B. Trumpp, Kgl. Norske Vid. Selsk. Bd. V, Nr. 30 [1932]. ²¹⁾ G. N. Burkhardt, L. M. Heilbron, H. Jackson, E. G. Parry u. J. A. Lovern, Biochem. Journ. **28**, 1698 [1934].

sierten Farbstoffs Palmitinsäure isolieren konnte. Der Schmp. von Ester A liegt nun bei 100—101⁰, während das von uns synthetisch erhaltene Astaxanthin-dipalmitat¹⁾ bei 72⁰ schmilzt. Eine Identität kam danach nicht in Frage. Der Ester A ist, wie wir gefunden haben, bemerkenswerterweise ein Mono-ester des Astaxanthins. Elementaranalyse, katalytische Hydrierung und colorimetrische Molekulargewichtsbestimmung machen es wahrscheinlich, daß der Fettsäurerest 16 C-Atome und 1 Doppelbindung enthält. Das synthetisch dargestellte Monopalmitat des Astaxanthins schmilzt erheblich höher, nämlich bei 115⁰. Den Ester C gelang es krystallisiert zu gewinnen (Schmp. 34—36⁰). Es zeigte sich, daß hier ein Di-ester des Astaxanthins vorliegt, der vermutlich dieselbe Fettsäure (16 C-Atome, 1 |) enthält wie der Ester A.

H. Brockmann und O. Völker⁷⁾ konnten aus den „Rosen“ des Fasans Astacin isolieren. Die von uns unter Vermeidung von alkalischer Verseifung durchgeführte Aufarbeitung hat ergeben, daß auch hier ausschließlich Astaxanthin bzw. Ester dieses Farbstoffs vorkommen. Da die Nahrung des Fasans sowohl in der Wildbahn als auch in verschiedenen Tiergärten recht genau bekannt ist und als frei von Astaxanthin anzusehen ist⁸⁾, darf man wohl schließen, daß der Fasan dieses Pigment aus anderweitigen Carotinoiden der Nahrung selbst zu bilden vermag. Vermutlich wird das auch bei anderen Waldhühnern zutreffen, die in den Papillen der Augenfelder einen roten Farbstoff besitzen, der in der älteren Literatur unter dem Namen Tetronerythrin (Tetrao=Auerhahn) beschrieben ist.

G. Wald und H. Zußmann⁹⁾ ist es gelungen, aus der Retina von Hühnern neben anderen Carotinoiden auch Astacin krystallisiert zu erhalten. Die bereits ausgesprochene Vermutung^{9a)}, daß es sich auch in diesem Falle um ein Kunstprodukt handelt, fanden wir bestätigt. Der unter Vermeidung von Alkali isolierte Farbstoff gab mit Alkoholat die Farbreaktion des Astaxanthins. Das bei Zutritt von Luft gebildete Astacin erhielten wir aus Pyridin-Wasser wie G. Wald in den charakteristischen Krystallen. Die chromatographische Analyse an Rohrzucker zeigte, daß in der Netzhaut des Huhns mindestens 2 verschiedene Ester des Astaxanthins vorkommen. Die Tatsache der esterartigen Bindung spricht gegen das Vorkommen als Astaxanthin-Proteid in der Retina. Denn nach allen bisherigen Erfahrungen findet sich das Astaxanthin in der Natur entweder an Fettsäuren oder an Eiweiß gebunden, nicht aber an beide zugleich. Die für Ovoverdin vorgeschlagene Konstitutionsformel¹⁾ macht diese Erfahrung für symmetrisch gebaute Derivate des Farbstoffs verständlich.

Die Farbstoffe der Astaxanthinreihe schmelzen niedriger als diejenigen der Astacingruppe:

Astaxanthin	216 ⁰	Astacin	228 ⁰
Astaxanthin-diacetat	205 ⁰	Astacin-diacetat	235 ⁰
Astaxanthin-dipalmitat	72 ⁰	Astacin-dipalmitat	121 ⁰

Aus der Bildung von Astacin und Palmitinsäure bei der Verseifung eines Farbstoffesters aus Hummer hatten P. Karrer, L. Loewe und H. Hübb-

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **224**, 193 [1934].

⁸⁾ Vergl. die Analyse zahlreicher Samen bei H. Brockmann u. O. Völker, a. a. O. S. 202 usw. ⁹⁾ G. Wald u. H. Zussmann, Nature (London) **140**, 197 [1937].

^{9a)} Fußn. 1, S. 1886.

ner¹⁰⁾ auf das Vorkommen von Astacin-dipalmitat in der Natur geschlossen und diesen Farbstoff „Astacein“ benannt. Dieser Name ist jetzt entbehrlich geworden. Der wahre Dipalmitinsäureester des Astacins, auf synthetischem Wege gewonnen, wird erstmals im Versuchsteil der vorliegenden Abhandlung beschrieben.

Beschreibung der Versuche.

1) Astaxanthin aus den roten Papillen der Augenfelder von Phasianus colchicus.

Die „Rosen“ von 50 frisch geschossenen Jagdfasanen aus der Umgebung von Heidelberg wurden abpräpariert und unter gesättigter Ammonsulfatlösung gesammelt. Zur Extraktion wurde salzfrei gewaschen und in der Kälte mit Pyridin übergossen. Nach etwa 24 Stdn. waren die „Rosen“ entfärbt. Die vereinigten roten Pyridinauszüge haben wir mit Petroläther versetzt und die Farbstoffe durch Zusatz von viel Wasser in die obere Schicht getrieben. Die Petroläther-Lösung wurde gründlich mit verd. Essigsäure sowie mit Wasser gewaschen, getrocknet und verdampft. Den Rückstand haben wir in wenig Aceton aufgenommen, aus dem bei 0° die überwiegende Menge der vorhandenen Sterine ausfiel. Der im Filtrat verbliebene Rohfarbstoff wurde nach Verjagen des Acetons in Petroläther aufgenommen und 3-mal mit 90-proz. Methanol durchgeschüttelt, das verhältnismäßig wenig Pigment aufnahm.

Dieser hypophasische Anteil wurde wieder in Petroläther übergeführt. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und Trocknen über Natriumsulfat engten wir die Petroläther-Lösung auf 1 ccm ein und schmolzen sie unter Stickstoff in einer Ampulle zu. Im Laufe von mehreren Tagen fielen nun dunkle Krystalle aus, die sich mit eiskaltem Petroläther von anhaftendem Öl gut befreien ließen. Zum Umkrystallisieren wurde in Pyridin gelöst und mit Wasser versetzt. Wir erhielten 3 mg der für Astaxanthin charakteristischen Tafeln, die lebhaften Metallglanz zeigten. Schmp. 208—210° (unkorr., Berl). Die Farbreaktion des krystallisierten Farbstoffs in Pyridin mit alkoholischer Lauge im Vakuum fiel stark positiv aus. Die mikro-manometrische Bestimmung des O₂-Verbrauchs ergab den für Astaxanthin erwarteten Wert:

2.104 mg Sbst. in 0.40 ccm Pyridin + 0.90 ccm 2-n. butylalkohol. Kalilauge und 0.70 ccm Pyridin verbr. nach 30 Min. 1.74 Mol. und nach 4 Stdn. 1.90 Mol. O₂ (Endwert).

Den im Dehydrierungsversuch gebildeten Farbstoff haben wir durch Ansäuern und Zugabe von Wasser ausgefällt, abfiltriert und aus Pyridin-Wasser umkrystallisiert: schöne charakteristische Astacin-Krystalle vom Schmp. 226—228° (unkorr., Berl).

Der mengenmäßig stark überwiegende epiphasische Farbstoffanteil der „Rosen“ besteht in der Hauptsache aus 2 tiefschmelzenden Estern des Astaxanthins. Diese lassen sich an Calciumcarbonat chromatographisch trennen; beide geben mit Alkali unter Luftabschluß die das Astaxanthin kennzeichnende Farbreaktion. Nach der Dehydrierung durch Luft wurde auch hier Astacin erhalten, das sich aus Pyridin-Wasser in den charakteristischen Krystallformen (Schmp. 220—221°, uncorr.) abschied.

¹⁰⁾ Helv. chim. Acta 18, 96 [1935].

2) Astaxanthin aus der Netzhaut von Hühnern.

Durch das freundliche Entgegenkommen von Hrn. J. Eie auf Stokker Gord, Norwegen, erhielten wir 30 Augen von 10 Wochen alten weißen Italiener-Küchen, die ganz astaxanthinfreies Futter erhalten hatten. Die Augen waren sofort nach dem Schlachten unter konz. Ammonsulfatlösung konserviert worden und konnten nach Beförderung durch die Luftpost bereits 30 Stdn. später in Heidelberg in Aufarbeitung genommen werden.

Die abpräparierten Netzhäute wurden 3-mal mit Aceton p. a. extrahiert und die in Lösung gegangenen Farbstoffe in Petroläther übergeführt. Nach dem Auswaschen des Acetons und Trocknen über Natriumsulfat wurde durch eine Säule von Rohrzucker filtriert. Dabei bildeten sich 2 rote Zonen, während ein gelber Farbstoff durchlief.

Durch längeres Nachwaschen mit Petroläther wurden auch die roten Farbstoffe ins Filtrat getrieben. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels unter Stickstoff hinterblieb ein öliges Rückstand, der in Pyridin mit butylalkoholischer Kalilauge stark positive Astaxanthin-Reaktion gab. Bei Zutritt von Luft schlug die Farbe nach Rot um. Das dabei gebildete Astacin ließ sich aus Pyridin-Wasser umkrystallisieren und wurde so in den typischen, in der Mitte ausgebauchten Nadeln erhalten.

Der gelbe Farbstoff, der nicht am Zucker hängen geblieben war, wurde der Verseifung unterworfen. Der epiphatische Anteil zeigte in Petroläther Absorptionsbanden bei 469 und 440 $m\mu$ (Wald und Zußmann: 469.5, 440 und 418 $m\mu$), der hypophatische Anteil in Methanol 479 und 452 $m\mu$ (Lutein: 480 und 450 $m\mu$).

3) Astaxanthin aus der Leber von Regalecus glesne.

Die Leber eines etwa 6 m langen Exemplars, das an der norwegischen Küste gefangen worden war, besaß ziegelrote Farbe und wog 1050 g. Sie wurde unter Kohlensäureschnee verrieben, mit wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und mit Äther extrahiert. Wir erhielten so 450 g Öl. Dieses wurde in 1350 ccm Petroläther gelöst und die Lösung mehrmals mit 90-proz. Methanol durchgeschüttelt. Die vereinigten Methanolauszüge (mit 200 ccm Petroläther gewaschen und rückentmisch) wurden im Vak. auf $\frac{1}{4}$ des Vol. eingeeengt, worauf wir den Farbstoff unter Zugabe von viel Natriumsulfat-Lösung in Äther trieben. Die Ätherschicht wurde durch Waschen von Alkohol befreit und unter Stickstoff verdampft. Der Rückstand, der im Eisschrank breiartig erstarrte, löste sich in 200 ccm Petroläther (Sdp. bis 50°) klar, doch begannen schon nach 2 Min. violette Krystalle auszufallen. Sie wurden abgesaugt, in 80 ccm Benzol + 320 ccm Petroläther gelöst und der Chromatographie an Rohrzucker unterworfen.

Beim Entwickeln mit Benzol-Petroläther (3:7) bildete sich eine hell orangefelbe Zone und darunter eine sehr breite rote Schicht. Die untere Zone wurde mit reinem Benzol eluiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels nahmen wir den Rohfarbstoff in 120 ccm Benzol + 480 ccm Petroläther auf und wiederholten die Chromatographie an Rohrzucker, wobei mit Benzol-Petroläther 1:4 entwickelt wurde. Der Farbstoff der Hauptzone

gab nach dem Umkrystallisieren aus Pyridin-Wasser 23.6 mg Astaxanthin vom Schmp. 212—213° (Kofler).

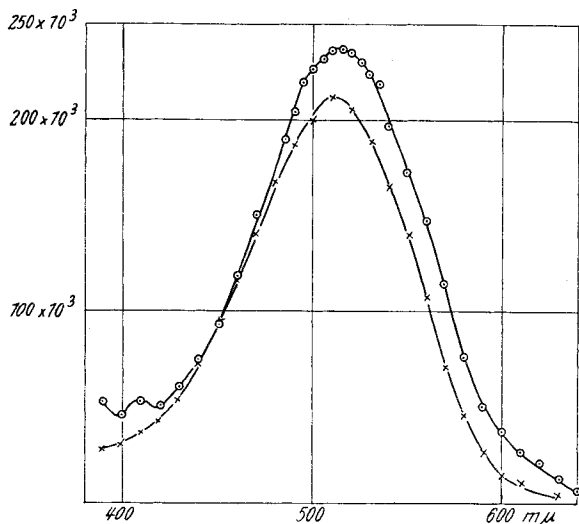
3.480 mg Sbst.: 10.24 mg CO₂, 2.705 mg H₂O.

C₄₀H₅₂O₄. Ber. C 80.48, H 8.79. Gef. C 80.25, H 8.70.

Bei der alkalischen Dehydrierung wurde mikro-manometrisch ein Verbrauch von 1.96 Mol. O₂ (Endwert nach 9 Min.) festgestellt.

4) Astacin aus Haematococcus pluvialis.

12 g feuchte rote Dauersporen (aus 31 Kulturkölbchen mit insgesamt 2.5 l Nährlösung) wurden nach der Vorschrift von J. Tischer¹¹⁾ auf „Euglenarhodon“ verarbeitet. Wir erhielten 29.4 mg Farbstoff vom Schmp. 226—227° (unkorr., evak. Röhrchen) in den für das Astacin (Schmp. 228°) charakteristischen sichelförmig geschwungenen Nadeln.



Abbild. 1. ×—× Astacin; ○—○ Diphenazinderivat des Astacins. Lösungsmittel: Schwefelkohlenstoff.

25 mg wurden mit 30.6 mg *o*-Phenylendiamin in 2 ccm Eisessig z. A. 1.5 Stdn. im siedenden Wasserbad unter Stickstoff erhitzt. Nach Zusatz von 1.5 ccm Wasser wurde in den Eisschrank gestellt. Das ausgefallene Diphenazinderivat haben wir mit 2-n. Essigsäure und Wasser gut gewaschen und aus 1 Tl. Schwefelkohlenstoff + 4 Tln. Alkohol in dünnen schwarzen Nadeln vom Schmp. 222—223° erhalten. Das Diphenazinderivat von Astacin aus Hummern fiel aus demselben Lösungsmittelgemisch in ganz gleichartigen Nadeln aus, die bei 224—225° schmolzen. Die Bestimmung des Stickstoffs ergab:

Ber. für C₅₂H₅₆N₄ (736.5) N 7.61.

a) Präp. aus Haematococcus. 3.045 mg Sbst.: 0.211 ccm N₂ (762 mm, 24°). Gef. N 7.99.

b) Präp. aus Astacus. 3.032 mg Sbst.: 0.213 ccm N₂ (755 mm, 24°). Gef. N 8.02.

Das Diphenazinderivat ist dem freien Astacin nicht nur im Schmp. (Diff. 3—4°) sondern auch im Absorptions-Spektrum (Abbild. 1) auffallend ähnlich.

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **250**, 151 [1937].

Als Unterschied zwischen Euglenarhodon und Astacin hatte J. Tischer angegeben, daß ersteres ein Tetraoxim, letzteres nach P. Karrer und K. Loewe⁵⁾ aber nur ein Dioxim bildet. Die zu hohen Stikstoffwerte von Rohkrystallisaten, aus denen auf die Bildung eines Tetraoxims geschlossen wurde, kommen, wie Oximierungsversuche am Astacin gezeigt haben, dadurch zustande, daß das gut definierte Dioxim die Fähigkeit besitzt noch Hydroxylamin an Doppelbindungen anzulagern. Als Beispiel sei die Analyse eines N-reichen Oximierungsproduktes angeführt:

Ber. für $C_{40}H_{50}O_4N_2$ (Dioxim)	C 77.12, H 8.10, N 4.50.
Ber. für $C_{40}H_{52}O_4N_4$ (Tetraoxim)	„ 73.57, „ 8.03, „ 8.59.
Gef.	„ 73.92, „ 8.34, „ 5.49.

5) Astaxanthinester A aus Haematococcus pluvialis.

Je 20 g feuchte Aplanosporen (aus 50 Kölbchen mit etwa 4 l Kulturflüssigkeit) wurden mit Quarzsand und Kohlensäureschnee verrieben und 4—5-mal mit insgesamt etwa $\frac{3}{4}$ l Aceton extrahiert. Nach Zusatz von 500 ccm Petroläther (Sdp. bis 50°) wurde mit Wasser entmischt und die Petrolätherschicht restlos von Aceton durch wiederholtes Auswaschen befreit. Hierauf wurde 2-mal mit 90-proz. Methanol durchgeschüttelt, das nur wenig Farbstoff aufnahm. Die Petrolätherschicht haben wir von Methanol befreit, über Natriumsulfat getrocknet und auf 80 ccm eingengt. Die anschließende Chromatographie an Calciumcarbonat (Länge der Säule 40 cm, Durchmesser 5 cm) ergab:

- I. 0 bis 5 cm von oben orange (Ester A enthaltend)
- II. 5 „ 7.5 „ „ „ graugrün (Chlorophylle + Ester II)
- III. 7.5 „ 10 „ „ „ tief violett (Ester A enthaltend)
- IV. 10 „ 23 „ „ „ hell lachsrot (Ester A enthaltend)
- V. eine schnell durchlaufende orangefarbige Zone (Ester C)
- VI. sofort ins Filtrat gehend: β -Carotin.

Die Farbstoffe der Zonen I—IV wurden mit absol. Alkohol eluiert, in Petroläther übergeführt, alkoholfrei gewaschen, getrocknet und das Chlorophyll durch Chromatographie an Rohrzucker entfernt. Dabei zeigte sich zu unserer Freude, daß die Astaxanthinester unterhalb der Chlorophylle a und b an Zucker adsorbiert werden, wodurch auch viele farblose Begleiter abgetrennt werden konnten. In diesem zweiten Chromatogramm blieb nun praktisch aller Ester A in einer rein roten Schicht beisammen, und es wanderte nur noch eine geringe rote Zone beim Entwickeln voraus. Nach mechanischer Abtrennung der Chlorophylle wurde mit Benzol eluiert, das Elutionsmittel im Vak. verdampft und der schon krystalline Rückstand im Hochvakuum eingeschmolzen. In dieser Form wurde der Rohfarbstoff aus 89 g feuchten Dauersporen gesammelt.

Zur Analyse wurde der Astaxanthin-Ester A aus Zone I nochmals aus Benzol:Benzin = 1:5 an Rohrzucker chromatographisch gereinigt. Er wurde mit reinem Benzol eluiert und zunächst aus etwa 40 ccm Benzin (Sdp. bis 50°), hierauf aus 1.5 ccm Benzol + 4.5 ccm Methanol umkrystallisiert. Rotviolette, kugelig vereinigte, feine Nadeln mit schönem Seidenglanz. Schmp. 102.5—103° (korr.). Ausb. 34 mg.

4.015 mg Sbst.: 11.880 mg CO₂, 3.365 mg H₂O. — 3.935 mg Sbst.: 11.660 mg CO₂, 3.350 mg H₂O.

C₄₀H₅₁O₄ · CO · C₁₅H₂₉ (832.6). Ber. C 89.71, H 9.69. Gef. C 80.70, 80.81, H 9.38, 9.54. J. Tischer fand C 81.18, H 9.74.

Die Prüfung auf optische Aktivität ergab:

$$[\alpha]_{D}^{20} = (\pm 0.03^{\circ} \times 100) : (1 \times 0.13) = \pm 20^{\circ}.$$

Dehydrierung durch Sauerstoff: 3.773 mg Sbst. in 0.4 ccm Pyridin + 0.9 ccm 2-*n*. butylalkohol. Kalilauge mit 0.7 ccm Pyridin: nach 14 Min. 2.45 Mol. O₂ (Endwert). Astaxanthin verbr. unter diesen Bedingungen 2.0 ± 0.1 Mol. O₂.

Katalytische Hydrierung: 1.813 mg Sbst. in 2 ccm Eisessig verbr. nach 50 Min. 15.6 Mol. H₂ (Endwert). Astacin verbr. unter diesen Bedingungen 14.1—14.2 Mol. H₂, Astacindiacetat 14.4 Mol. H₂. Aus dem Mehrverbrauch von rund 1 Mol. schließen wir auf die ungesättigte Natur der Fettsäure im Ester A. Diese ist wahrscheinlich auch für den Mehrverbrauch an O₂ im Dehydrierungsversuch verantwortlich.

Farbreaktion mit Alkoholat im Hochvakuum: stark positiv.

6) Colorimetrische Molekulargewichtsbestimmung.

Die für den Astaxanthinester A bisher mitgeteilten Analysen sind noch mit vielen Bruttoformeln vereinbar. Die Fettsäure könnte 14—20 C-Atome enthalten. Eine nähere Aussage ist in diesem oder ähnlichen Fällen nur durch genaue Bestimmung des Mol.-Gew. möglich. Die osmotischen Methoden sind in Anbetracht der sehr kleinen verfügbaren Substanzmengen und der verhältnismäßig hohen Molekulargewichte nicht ausreichend. Der folgende Weg führte zum Ziel.

Zeaxanthin und sein Dipalmitinsäure-ester, das Physalien, zeigen in äquimolaren Lösungen genau die gleiche Farbstärke¹²⁾. Dasselbe gilt, wie wir gefunden haben, für das Astaxanthin beim Vergleich mit seinem Diacetat und Monopalmitat¹³⁾. Auch das Astacin zeigt dieselbe molare Farbstärke wie sein Diacetat und Dipalmitat. Merkwürdigerweise stimmen die Farbwerte des Astaxanthins und Astacins auch untereinander überein. Für diese Farbstoffe ergibt sich (Tafel 2) in Pyridinlösung $\log I_0/I = 113 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$ bei einer Konzentration von 1 Mol/l und einer Schichtdicke von 1 cm (Stufenphotometer, Lichtfilter S 50). Liegt daher ein unbekannter Farbstoff dieser Klasse vor, so ist es möglich, aus dem spezif. Absorptionskoeffizienten das Molekulargewicht so genau zu berechnen, daß sich zwischen zwei um 2 C-Atome differierenden Fettsäureresten mit Sicherheit entscheiden läßt.

Für den Ester A aus Haematococcus haben wir auf diesem Wege das Mol.-Gew. = 834.5 gefunden, während sich für Astaxanthin-monozoomarinat 832.6 (Zoomarinsäure = H₃C[CH₂]₅CH:CH[CH₂]₇CO₂H) berechnet. Die Möglichkeit, daß ein Di-ester mit 2 kürzeren Fettsäure-Resten vorliegt, läßt sich durch das Ergebnis der Elementaranalyse ausschließen (1 O-Atom mehr in der Bruttoformel verlangt 1.5% tiefere C-Werte).

Abweichend von Astacin- und Astaxanthin-estern ist der Farbwert des Diphenazin-derivates = 121×10^3 . Die am Stufenphotometer gefundene Differenz (121—113) entspricht dem Unterschied der lichtelektrisch gemessenen Maxima der Absorptionskurven in Abbild. 1.

¹²⁾ R. Kuhn u. H. Brockmann, Ztschr. physiol. Chem. **206**, 41 [1932].

¹³⁾ Die Unterschiede der Maxima der 3 Absorptionskurven, B. **71**, 1881 [1938] Abbild. 2, sind auf Meßfehler zurückzuführen.

Tafel 2.

Substanz	Mol.-Gew.	Einwaage (mg)	Pyridin (ccm)	Schichtdicke (cm)	$\log \frac{J_0}{J}$	1 cm Mol/l		
Astaxanthin aus Hummer	596.4	0.145	25	0.500	0.553	114×10^3		
				1.003	1.103	113		
		1.446	25	0.107	1.1634	112		
				1.219	50	0.107	0.5001	115
						0.256	1.1833	113
Astaxanthin aus Regalecus glesne	596.4	0.226	25	0.500	0.863	114		
				1.003	1.740	114		
		1.285	50	0.107	0.529	115		
				0.256	1.246	113		
Astaxanthin-diacetat	680.4	1.032	25	0.107	0.738	114		
				0.256	1.759	113		
		0.638	25	0.107	0.452	113		
				0.256	1.077	112		
Astaxanthin-monopalmitat	834.7	0.765	25	0.107	0.447	114		
				0.256	1.039	111		
Haematococcus pl. Ester aus Zone I	832.6	0.211	25	0.500	0.571	113		
				1.003	1.127	113		
				0.265	0.743	117		
		0.695	75	1.003	1.471	115		
				0.500	0.628	113		
1.003	1.242	111						
Haematococcus pl. Ester aus Zone II	916.7	0.523	25	0.256	0.6468	111		
				0.500	1.235	109		
		0.676	25	0.107	0.3639	115		
				0.256	0.8505	113		
				0.500	1.644	111		
		0.835	25	0.107	0.4367	112		
				0.256	1.0138	109		
				1.105	0.107	0.5645	109	
0.256	1.324	107						
Haematococcus pl. Ester aus Zone III	832.6	0.838	25	0.107	0.496	115		
				0.256	1.174	114		
		0.873	25	0.107	0.522	116		
				0.256	1.221	114		
		0.817	25	0.107	0.4781	114		
				0.256	1.1314	113		
				1.143	0.107	0.666	113	
0.256	1.573	112						
Haematococcus pl. Ester aus Zone IV	832.6	0.976	25	0.107	0.565	113		
				0.256	1.324	110		
		0.820	25	0.107	0.471	112		
0.256	1.128	112						

Tafel 2 (Fortsetzung).

Substanz	Mol.-Gew.	Einwaage (mg)	Pyridin (ccm)	Schichtdicke (cm)	$\log \frac{J_0}{J}$	1 cm Mol/l
Haematococcus pl. Ester aus Zone V (Ester C)	1068.8	1.081	25	0.107	0.490	113×10^3
				0.256	1.144	110
		0.638	25	0.256	0.683	112
				0.500	1.314	110
Astacin	592.4	0.644	25	0.107	0.540	116
				0.256	1.283	115
		0.469	25	0.107	0.381	112
				0.256	0.910	112
		0.417	25	0.107	0.336	112
				0.256	0.798	111
				0.107	0.645	114
0.784	25	0.107	0.645	114		
		0.256	1.489	110		
Astacin-diacetat	776.4	0.689	25	0.107	0.486	111
				0.256	1.141	110
		0.558	25	0.107	0.398	113
				0.256	0.932	110
Astacin-dipalmitat	1068.9	0.886	25	0.107	0.413	116
				0.256	0.964	114
		1.087	25	0.107	0.509	117
				0.256	1.165	112
Astacin-diphenazin	736.5	0.563	100	0.500	0.467	122
				1.003	0.922	120
		0.466	100	0.500	0.387	122
				1.003	0.757	120

7) Die weiteren Astaxanthinester aus *Haematococcus pluvialis*.

Aus Zone II ließ sich durch 2-malige Chromatographie an Rohrzucker aus Benzol:Petroläther = 1:7 und 2-malige Krystallisation aus Benzol:96-proz. Alkohol = 1:5 ein Farbstoffester in feinen roten Nadeln vom Schmp. 95—96° gewinnen. Ausb. 23 mg. Dieser Astaxanthinester II könnte nach der colorimetrischen Molekulargewichtsbestimmung (Tafel 2) der Mono-ester einer C_{22} -Fettsäure sein, die nach dem Ergebnis der katalytischen Hydrierung und der Dehydrierung durch O_2 einfach ungesättigt sein dürfte. Bei den folgenden Elementaranalysen, die den für Astaxanthin-mono-erucasäureester berechneten nahe liegen, ist zu berücksichtigen, daß der Ester II auffallend leicht der Autoxydation unterliegt.

3.510 mg Sbst.: 10.360 mg CO_2 , 2.985 mg H_2O . — 2.965 mg Sbst.: 8.745 mg CO_2 , 2.500 mg H_2O .

$C_{62}H_{92}O_5$, Ber. C 81.16, H 10.12, Mol.-Gew. 917. Gef. C 80.50, 80.44, H 9.51, 9.43, Mol.-Gew. 929.

Katalytische Hydrierung: 1.712 mg Sbst. nahmen in 45 Min. 640 cmm H_2 (0°, 760 mm) auf. Gef. nach 45 Min. 15.3 Mol., nach 110 Min. 15.8 Mol. H_2 . Dehydrierung: 2.567 mg Sbst. verbr. in 11 Min. 2.60 Mol., in 35 Min. 2.66 Mol. O_2 .

Aus Zone III wurden durch Chromatographie an Zucker usw. 49.4 mg und aus Zone IV noch 8.6 mg eines in kugelförmig angeordneten tiefroten Nadeln krystallisierenden Astaxanthinesters gewonnen, der zu unserer großen Überraschung nach Schmp., Elementaranalyse, Mol.-Gew., katalytischer Hydrierung und Dehydrierung von dem aus Zone I isolierten Ester A nicht zu unterscheiden war.

4.030 mg Sbst.: 11.980 mg CO₂, 3.550 mg H₂O.

C₅₆H₈₀O₅. Ber. C 80.71, H 9.69, Mol.-Gew. 832.6. Gef. C 81.07, H 9.85, Mol.-Gew. 829. Katalytische Dehydrierung: 2.815 mg Sbst. nahmen in 12 Min. 2.68 Mol. O₂ auf (Endwert).

Die höchst merkwürdige Erscheinung, daß anscheinend ein und derselbe Farbstoff in den durch Chlorophyll voneinander getrennten Zonen I und III + IV auftritt, hat uns veranlaßt, Misch-Chromatogramme mit den aus Zone I und aus Zone III in kryst. Form isolierten Estern auszuführen. Eine Trennung ließ sich jedoch weder an Calciumcarbonat noch an Rohrzucker erzielen. Mischt man den reinen Ester A mit Chlorophyll (aus Kastanienblättern, chromatographisch gereinigt), so bleibt er an Calciumcarbonat und an Rohrzucker unterhalb des Chlorophylls hängen. Es ist zu schließen, daß farblose Begleiter das Adsorptionsverhalten des Esters A in den Rohrlösungen in ungewöhnlicher Weise beeinflussen, so daß ein Teil schon oberhalb des Chlorophylls hängen bleibt. Diese Zone (I) ist auch durch ihre orangefarbene Farbe auffallend verschieden von der violettroten Farbe, mit der der reine Ester A an Calciumcarbonat adsorbiert wird.

Nachdem Astaxanthin seiner Formel entsprechend in einer *d*-, *l*-, *racem*- und *meso*-Form auftreten könnte, haben wir es für möglich gehalten, daß im Laufe der Aufarbeitung eine sterische Umlagerung erfolgt. Der aus Zone III gewonnene Ester A hat sich jedoch so wie der aus Zone I erhaltene als optisch inaktiv erwiesen:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \pm 20^{\circ}$. Für den Ester aus Zone IV fanden wir: Katalytische Hydrierung: 1.420 mg Sbst. in 10 Min. 14.9 Mol. nach 80 Min. 15.65 Mol. H₂. Dehydrierung durch O₂: 2.315 mg Sbst. verbr. in 18 Min. 2.45 Mol. O₂ (Endwert).

Ester C.

Ganz anders verhält sich der Astaxanthinester der Zone V, der, wie schon J. Tischer festgestellt hat, beim Waschen der Calciumcarbonatsäule mit Petroläther rasch ins Filtrat wandert. Die Abtrennung von öligen farblosen Begleitstoffen gelang uns nicht an Calciumcarbonat, wohl aber durch 2-malige Adsorption an Rohrzucker. So wurde es möglich, den Ester C krystallisiert zu gewinnen. Aus Petroläther, der mit Kohlensäureschnee-Aceton gekühlt wurde, erhielten wir ihn in roten verfilzten Nadeln vom Schmp. 34 bis 36°. Nach CH-Bestimmung, Mol.-Gew., katalytischer Hydrier- und Dehydrierung liegt ein Di-ester vor, der dieselbe Fettsäure wie der Ester A (Zoomarinsäure ?) enthalten dürfte.

3.935 mg Sbst.: 11.630 mg CO₂, 3.500 mg H₂O.

C₇₂H₁₁₀O₆. Ber. C 80.85, H 10.19, Mol.-Gew. 1069. Gef. C 80.60, H 9.95, Mol.-Gew. 1089.

Katalytische Hydrierung: 1.194 mg Sbst. nahmen in 16 Min. 17.3 Mol., in 110 Min. 18.0 Mol. H₂ auf. 1.247 mg Sbst. verbr. in 15 Min. 16.5 Mol., in 155 Min. 17.4 Mol. H₂.

Dehydrierung: 2.264 mg Sbst. verbr. in 8 Min. 2.20 Mol., in 32 Min. 2.50 Mol., in 92 Min. 2.76 Mol., in 152 Min. 3.303 Mol. O₂.

8) Astaxanthin-monopalmitat.

38.8 mg Astaxanthin wurden unter den Vorsichtsmaßnahmen einer Zerewitinoff-Bestimmung in 4 ccm reinstem Pyridin gelöst und mit 0.015 ccm Palmitinsäurechlorid 36 Stdn. bei etwa 20° stehen gelassen. Beim Eingießen in 400 ccm Petroläther fiel sofort ein roter Niederschlag, der sich beim Auswaschen des Pyridins mit Wasser erheblich vermehrte (unverändertes Astaxanthin). Das noch in Lösung gebliebene Astaxanthin wurde mit 85-proz. Methanol dem Petroläther entzogen. Die rein epiphasischen Farbstoffe bildeten beim Chromatographieren an Rohrzucker eine breite rote Zone, der nur ein orangefarbiger roter Saum vorlief. Es wurde mit Benzol eluiert, im Vak. verdampft, in 0.4 ccm Benzol gelöst und mit 2 ccm Methanol versetzt. Im Eisschrank fielen 4.2 mg rein rote himbeerförmige Kugeln aus, die blättrigen Bruch zeigten. Schmp. 113.5—114.5° (korr.). Dieser Ester ist gegen 90-proz. Methanol rein epiphasisch. Die colorimetrische Bestimmung ergab den für Astaxanthin-monopalmitat ber. Wert.

$C_{56}H_{82}O_5$. Ber. Mol.-Gew. 834.7. Gef. Mol.-Gew. 839.5.

9) Astacin-dipalmitat.

49.3 mg Astacin wurden in 5 ccm Zerewitinoff-Pyridin gelöst, mit 0.15 ccm Palmitinsäurechlorid versetzt und 2 Stdn. bei 50° unter reinstem Stickstoff aufbewahrt. Nach Zusatz von 45 ccm Petroläther wurde wiederholt mit je 25 ccm Wasser, verd. Essigsäure und wieder Wasser durchgeschüttelt, wobei ein roter, fein krystalliner Niederschlag ausfiel, der sich bei Zugabe von etwas Methanol leicht löste. Die Petrolätherlösung gab an 90-proz. Methanol nur ganz wenig ab. Nach dem Auswaschen mit Wasser fiel im Eisschrank das Dipalmitat in dünnen, nahezu rechtwinkligen roten Blättchen aus (43.1 mg).

Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus Benzol-96-proz. Alkohol lag der Schmp. konstant bei 121°.

3.910 mg Sbst.: 11.51 mg CO_2 , 3.57 mg H_2O . — 3.945 mg Sbst.: 11.66 mg CO_2 , 3.54 mg H_2O .

$C_{72}H_{106}O_6$ (1068.9). Ber. C 80.83, H 10.18, Mol.-Gew. 1069.
Gef. „ 80.28, 80.61, „ 10.21, 10.04, Mol.-Gew. 1051.

Die Lösung des Astacin-dipalmitats in Petroläther gibt an 95-proz. Methanol nur ganz wenig, an 92-proz. Methanol gar keinen Farbstoff ab.

Der Firma L. O. Hegstad, Trondheim, haben wir für die Überlassung größerer Mengen von frischen Hummereiern zu danken, dem „Statens videnskapelige Forskningsfond av 1919“ und dem „Nationalgaven til Chr. Michelsen“, Bergen, für die Gewährung von Stipendien, welche die vorliegende Untersuchung ermöglicht haben.