

265. Beiträge zur Chemie der pflanzlichen Plastiden

3. Mitteilung¹⁾Über das Vorkommen von Lutein-3-linolenat in gelben Herbstblättern von *Acer platanoides* (L.)

von W. Eichenberger und E. C. Grob

(26. VIII. 63)

Die Carotinoide gelber Herbstblätter von *Acer platanoides* bestehen zum grössten Teil aus Estern von Xanthophyllen, insbesondere solchen des Luteins (Xanthophyll^{1) 2)}). Wir wir kürzlich zeigen konnten, liegt dieses als Mono-, wie auch als Diester vor²⁾). Bei den Luteinmonoestern sind, da ein α - und ein β -Iononring vorhanden ist, prinzipiell 2 isomere Monoester möglich. Der eine, Lutein-3-ester, besitzt eine freie allylständige Hydroxylgruppe, während der Lutein-3'-ester eine freie, nicht allylständige Hydroxylgruppe enthält. Am Monoester, den wir auf Grund seiner Lage im Dünnschichtchromatogramm als Zone 8 bezeichneten, haben wir die Säurekomponente näher untersucht. Ihre Stellung am Lutein wurde indirekt aus derjenigen der noch freien Hydroxylgruppe bestimmt. Da diese allylständig sein konnte, wurde zu ihrer Charakterisierung eine kürzlich von GROB & PFLUGSHAUPT³⁾ gefundene Reaktion herangezogen. Bei dieser werden allylständige freie Hydroxylgruppen durch HCl-haltige Alkohole veräthert, während nicht allylständige nicht reagieren. Da die Verätherung eine beträchtliche Verminderung der Polarität zur Folge hat, kann sie leicht im Dünnschichtchromatogramm verfolgt werden.

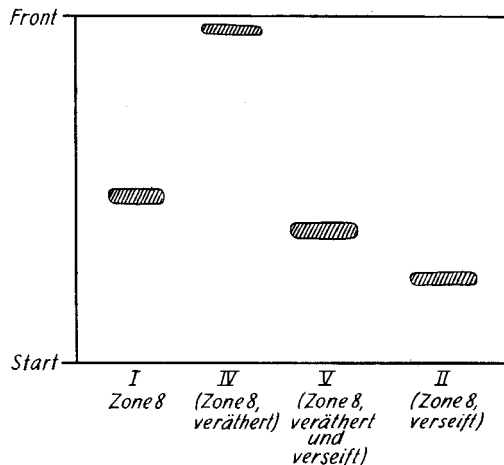


Fig. 1. Luteinmonoester (Zone 8) aus *Acer platanoides* und seine Verätherungs- und Verseifungsprodukte

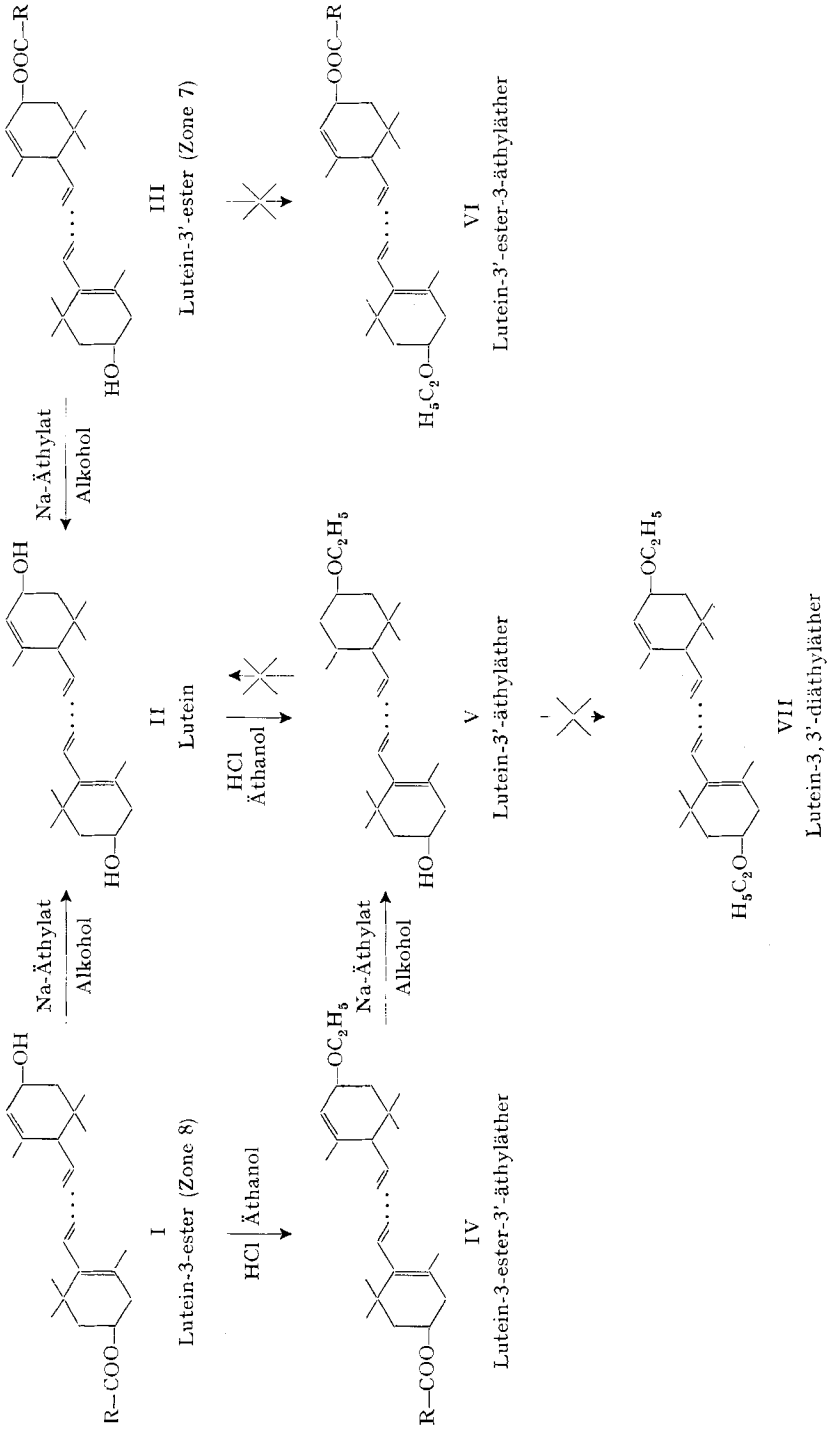
Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit Petroläther-Benzol-Äthanol 10:2:1

¹⁾ 2. Mitteilung: W. EICHENBERGER & E. C. GROB, *Helv. 45*, 1556 (1962).

²⁾ W. EICHENBERGER & E. C. GROB, *Helv. 45*, 974 (1962).

³⁾ E. C. GROB & R. P. PFLUGSHAUPT, *Helv. 45*, 1592 (1962).

Verätherung und Verseifung der Luteinmonoester



1. *Stellung der Estergruppe.* Bei der Behandlung von Zone 8 mit HCl-haltigem Äthanol entstand bereits nach kurzer Zeit in guter Ausbeute ein einheitliches Produkt. Wie Figur 1 zeigt, verhält es sich im Dünnschichtchromatogramm wie ein Carotinoid ohne freie Hydroxylgruppe. Diese Umwandlung ist nur möglich, wenn die freie Hydroxylgruppe von Zone 8 allylständig ist. Für die Estergruppe kommt deshalb nur noch die 3-Stellung (am β -Iononring) in Frage.

Die Reaktionsmöglichkeiten der Luteinmonoester sind in einem Schema veranschaulicht. Darin sind die Verseifungsreaktionen in waagrechter und die Verätherungsreaktionen in senkrechter Richtung dargestellt. Die Verätherung des Lutein-3-esters (I) führt zu IV, das keine freie Hydroxylgruppe mehr besitzt und deshalb im Chromatogramm nahe der Front laufen muss. Durch Verseifung von IV gelangt man zu V, dem Lutein-3'-äthyläther. Dabei muss die neu freigesetzte Hydroxylgruppe eine Verringerung des Rf-Wertes zur Folge haben. Wenn diese Gruppe am β -Iononring sitzt (nicht allylständig), kann V nicht in VII, den Lutein-3,3'-diäthyläther, übergeführt werden. Auch sollte infolge der Beständigkeit der schon bestehenden Äthergruppe V nicht mehr in II rückführbar sein.

Die Experimente haben die Richtigkeit dieser Überlegungen voll bestätigt. Da die Verätherung von Lutein (II) zum Lutein-3'-äthyläther (V) leicht gelingt³⁾, haben wir diesen nach der Reaktionsfolge I \rightarrow II \rightarrow V hergestellt und mit dem Endprodukt aus der Reaktionsfolge I \rightarrow IV \rightarrow V verglichen. Wie Figur 2 zeigt, stimmen die IR.-

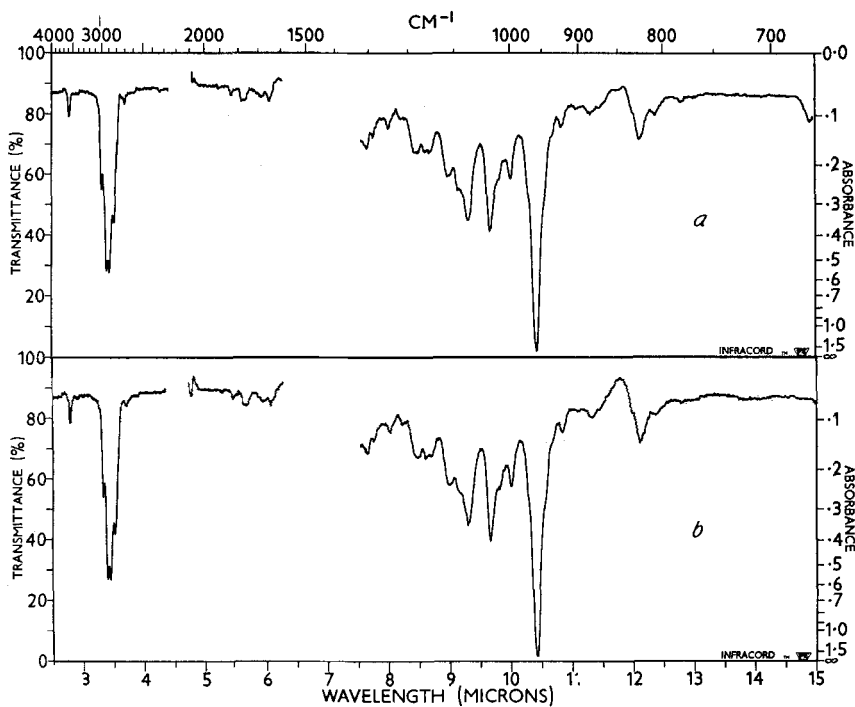


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektren von Lutein-3'-äthyläther in CS_2 , $\alpha = 1$ mm
 a) aus Lutein-3-ester durch Verätherung und nachfolgende Verseifung; b) aus Lutein durch Verätherung

Absorptionsspektren vollkommen überein und beweisen damit die Identität der beiden Produkte.

Wie Tabelle 1 zeigt, ändert sich die Lage der Absorptionsmaxima während dieser Reaktionen praktisch nicht, was darauf hinweist, dass das Doppelbindungssystem des Luteins nicht beeinträchtigt wird. Der kristallin erhaltene Lutein-3'-äthyläther enthält *eine* Äthoxylgruppe (nach ZEISEL bestimmt).

Tabelle 1. *Absorptionsmaxima des Luteinmonoesters (Zone 8) aus Acer platanoides und seiner Verätherungs- und Verseifungsprodukte*

	Zone 8 I	Zone 8 verseift II	Zone 8 veräthert IV	Zone 8 veräthert und verseift V
Absorptions- maxima ($m\mu$)	473,5	475	474,5	472
in Äthanol	445	446	445,5	444
	422	423,5	423	

Damit ist der Beweis erbracht, dass es sich beim untersuchten Herbstcarotinoid um ein am β -Iononring verestertes Lutein (Lutein-3-ester) handelt.

Im Chromatogramm der Herbstpigmente läuft hinter Zone 8 die Zone 7, die wahrscheinlich einen Lutein-3'-ester enthält. Im Vergleich mit Zone 8 ist sie ca. viermal weniger intensiv. Trotz der etwas rötlicheren Färbung liegt die Absorption, wie Tab. 2 zeigt, nur wenig längerwellig.

Tabelle 2. *Absorptionsmaxima von Zone 7 und ihren Verseifungsprodukten*

	Zone 7 III	Zone 7, verseift Reaktionsprodukt II	unverseifter Rückstand
Absorptions- maxima ($m\mu$)	475,5	474	476
in Äthanol	449,5	446	449,5

Bei der Verseifung bildet sich Lutein, doch bleibt ein Rückstand, der durch eine Nachverseifung nicht weiter verändert wird. Die Absorptionskurve des Rückstandes, verglichen mit der des Ausgangsproduktes, besitzt zwar nur wenig längerwellige Maxima, aber eine andere Gestalt. Dies deutet darauf hin, dass Zone 7 nicht einheitlich ist. Da bei Behandlung mit HCl-haltigem Äthanol keine Veränderung eintritt, sind freie allylständige Hydroxylgruppen abwesend. Diese Eigenschaft und das chromatographische Verhalten entsprechen den mutmasslichen Eigenschaften eines Lutein-3'-esters. Die Verseifung verläuft allerdings langsamer als beim Lutein-3-ester, was mit der Allylstellung der Estergruppe in Zusammenhang zu stehen scheint. Zur Orientierung wurde Luteindiester, der aus Herbstblättern gewonnen wurde, verseift und dabei die Menge der als Zwischenprodukte anfallenden Monoester beobachtet. Dabei überwog die Menge des nicht verätherbaren Produkts (Lutein-3'-ester), was auf eine erhöhte Beständigkeit der allylständigen Estergruppe hindeutet und mit den Beobachtungen an Zone 7 übereinstimmt. Wir sind im Begriffe, diese Befunde an synthetischen Diestern noch zu überprüfen.

2. *Art der Säurekomponente.* Die Verätherung der freien Hydroxylgruppe des Lutein-3-esters verändert spezifisch seine chromatographischen Eigenschaften und

erleichtert damit seine Abtrennung von den Begleitstoffen. Deshalb wurde der durch chromatographische Trennung erhaltene Lutein-3-ester zuerst mit HCl-haltigem Äthanol veräthert und dann erneut chromatographiert. Der Anteil des Farbstoffalkohols im Trockenrückstand der Hauptzone betrug ungefähr die Hälfte. Diese Bestimmung war in guter Näherung photometrisch möglich, da sich die spez. Extinktion des Luteins bei der Veresterung nicht wesentlich ändert.

Anschliessend wurde die Säurekomponente durch Umesterung abgespalten. Der Ablauf dieser Reaktion wurde im Dünnschichtchromatogramm verfolgt. Dabei verschwand der Fleck des Lutein-3-ester-3'-äthyläthers sehr rasch unter gleichzeitiger Entstehung der typischen Zone des Lutein-3'-äthyläthers. Nach fast völligem Verschwinden des Ausgangsproduktes wurde das Gemisch chromatographiert. Die Methylester der Fettsäuren wurden durchgespült und gaschromatographisch untersucht. Vergleicht man das entsprechende Chromatogramm (Fig. 3b) mit dem eines Testgemisches (Fig. 3a), so ist sofort ersichtlich, dass das unbekannte Gemisch zur Hauptsache Linolensäure enthält, neben geringeren Mengen einer nicht identifizierten Säure S und Palmitinsäure. Die Spuren der übrigen, nicht identifizierten Säuren stammen vermutlich aus noch vorhandenen Verunreinigungen. Durch Planimetrierung der Kurven lässt sich in erster Näherung das Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander bestimmen (s. Tab. 3).

Tabelle 3. *Anteile der einzelnen Hauptkomponenten im Gemisch der Fettsäuremethylester aus dem Farbstoff aus Zone 8*

Säure	Linolensäure	Säure S	Palmitinsäure
Menge mg (%)	13,2 (63%)	5,3 (25%)	1,4 (7%)

Um abzuklären, welche dieser Säuren tatsächlich den Farbstoff der Zone 8 bildet, wurde die zur einseitigen Veresterung des Luteins theoretisch nötige Säuremenge berechnet und mit der Menge der einzelnen Komponenten verglichen. Es zeigte sich, dass einzig Linolensäure in genügender Menge vorhanden ist, um den isolierten Monoester zu bilden. Darauf hin weist auch, dass mit steigendem Reinheitsgrad der Anteil an Linolensäure zunimmt.

Aus diesen Ergebnissen dürfen wir schliessen, dass das untersuchte Herbstcarotinoid aus *Acer platanoides* aus Lutein-3-linolenat besteht. Die Säurekomponente des vermuteten Lutein-3'-esters ist noch nicht näher untersucht.

Das Vorkommen von Lutein-3-linolenat als Naturprodukt ist in verschiedener Hinsicht interessant. Der Nachweis der Fettsäure zeigt von neuem eindrücklich, dass in den Herbstblättern Xanthophylle mit Fettsäuren verknüpft vorliegen. Die Veresterung kann dabei auch eine partielle sein und, wie im Fall des Luteins, zu Monoestern führen. Die Luteinester, z. B. deren bekanntester Vertreter, das Dipalmitat (Helenien)⁴), enthalten zumeist gesättigte Fettsäuren. Ungesättigte, wie sie etwa im Capsanthindioleat⁵) auftreten, scheinen in Luteinestern bisher nicht gefunden worden zu sein. Da nach neueren Arbeiten die Linolensäure in den Lipiden der Chloroplasten allgemein reichlich vertreten ist⁶), wird zu prüfen sein, ob dies auch für unsere Ver-

⁴) R. KUHN & A. WINTERSTEIN, *Naturwiss.* 18, 754 (1930).

⁵) L. ZECHMEISTER & L. CHOLNOKY, *Liebigs Ann. Chem.* 487, 197 (1931).

⁶) H. DEBUCH, *Z. Naturforsch.* 16b, 246, 561 (1961); F. T. WOLF, J. G. CONIGLIO & J. T. DAVIS, *Plant Physiol.* 37, 83 (1962).

suchspflanze, *Acer platanoides*, zutrifft. Überdies stellt sich die Frage, ob die Linolensäure unseres Farbstoffes aus den Chloroplasten stammt, oder ob sie bei der Umwandlung derselben in Herbstchromoplasten neu gebildet wird. Möglicherweise besteht zwischen dem Auftreten der Linolensäure und der seit langem bekannten Bildung grosser Mengen fett- und wachsartiger Substanzen in Herbstblättern ein Zusammenhang.

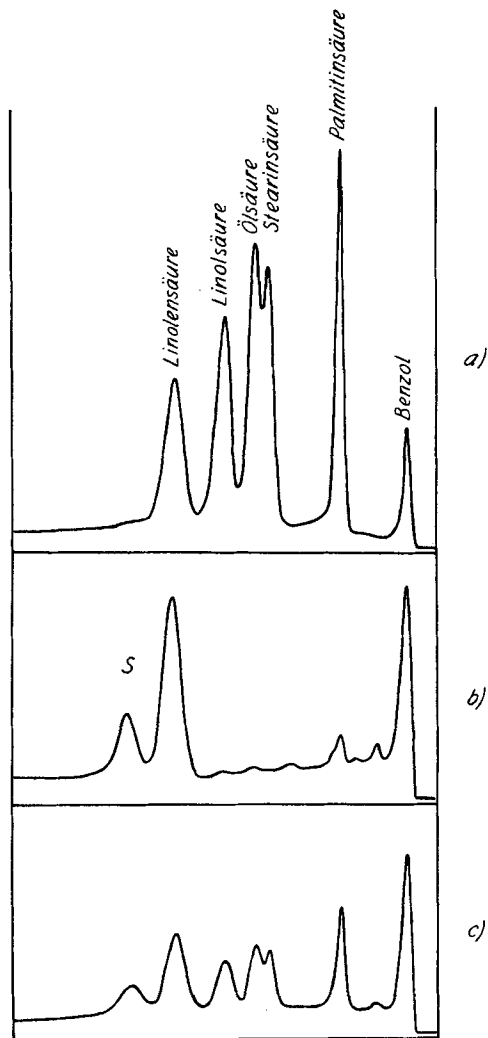


Fig. 3. Gas-Chromatogramme der Fettsäuremethylester

- a) Testgemisch von Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure-ester (PERKIN-ELMER);
 b) Fettsäuremethylester aus dem Farbstoff; c) Mischung von a) und b)

Experimentelles. – a) *Anreicherung des Lutein-3-linolenats*: Frisch gepflückte, gelbe Blätter von *Acer platanoides* wurden nacheinander mit Alkohol, Aceton und Äther extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden in Petroläther übergeführt und an Aluminiumoxid (desaktiviert) mit

Petroläther-Äther-Gemischen (bis zum Verhältnis 5:1) chromatographiert. Die gebildeten Zonen wurden mit Aceton eluiert und im Dünnschichtchromatogramm untersucht.

b) *Verätherung*: Das Eluat der Hauptzone wurde im Vakuum eingedampft und nach Verdrängen der Luft durch Stickstoff mit 30 ml $N/100$ HCl in Äthanol versetzt. Der Verlauf der Reaktion wurde im Dünnschichtchromatogramm verfolgt. Nach 3 Std. wurden zur Abstumpfung der Salzsäure 50 ml einer 2-proz. Kaliumcarbonatlösung zugesetzt, dann der Farbstoff mit Äther ausgeschüttelt, in Petroläther übergeführt und mit Petroläther-Äther 50:1 an Aluminiumoxid chromatographiert. Die Hauptzone ergab nach Eluieren mit Aceton und Eindampfen einen Rückstand von 59 mg, der laut photometrischer Bestimmung ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ für Lutein = 2540⁷⁾) 23 mg Lutein enthielt. Die Verätherung des Luteins erfolgte in gleicher Weise. Zum Chromatographieren wurde das Petroläther-Äther-Verhältnis auf 1:1 gesteigert. Der Lutein-3'-äthyläther konnte aus Benzol-Methanol kristallisiert werden.

c) *Verseifung des Lutein-3-ester-3'-äthyläthers zum Lutein-3'-äthyläther*: 46 mg Farbstoff wurden in 30 ml Äther gelöst und mit 5 ml einer Lösung von 5 g Natrium in 100 ml Methanol versetzt. Nach 2 Std. Stehen bei Raumtemperatur war die Reaktion beendet. Die Base wurde mit Wasser ausgeschüttelt. Die Ätherphase ergab einen Rückstand von 61 mg. Zur Gewinnung der bei der Umesterung allfällig entstandenen freien Säuren wurde die wässrige Phase mit 5N H_2SO_4 angesäuert und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand aus der Ätherlösung betrug 2 mg. Der Farbstoff wurde an Aluminiumoxid mit Petroläther mit Ätherzusätzen bis zum Verhältnis 1:1 chromatographiert. Aus dem schwach gelb gefärbten Durchlauf wurden 21 mg Rückstand erhalten. Durch Eluieren mit Aceton wurden anschliessend aus der Säule 29 mg Farbstoff erhalten, der aus Benzol-Methanol umkristallisiert wurde.

d) *Gas-Chromatographie der Fettsäure-methylester*: Gas-Chromatograph: PYE-ARGON. Säule: Celit 100/120 mesh (PYE) mit 5% Polyäthylenglycoladipat (PYE). $T = 200^\circ$. Strömungsgeschwindigkeit: 10 ml Argon in 20,7 s. Detektorspannung 1500 V. Papiervortrieb 45 inch/h. Testgemisch: PERKIN-ELMER Nr. 1, bestehend aus gleichen Teilen von Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure-methylester. 35 mg Gemisch wurden mit 80 μ l Benzol *p. a.* «MERCK» verdünnt und davon 0,1 μ l auf die Säule gegeben. Methylester der unbekanntes Fettsäuren: 21 mg Trockenrückstand wurden in 150 μ l Benzol *p. a.* «MERCK» gelöst und davon 0,1 μ l chromatographiert. Die Fläche unter der Kurve wurde gravimetrisch bestimmt.

e) *Absorptionsspektren*: Im Sichtbaren aufgenommen mit BECKMAN Spektrophotometer DK-2A; im IR. aufgenommen mit PERKIN-ELMER Infracord.

f) *Dünnschichtchromatographie*: Auf Kieselgel G-Schichten, Entwicklung mit Petroläther-Benzol-Äthanol 10:2:1.

g) *Bestimmung der Äthoxygruppe*: Apparatur und Ausführung nach ZEISEL. Der Lutein-3'-äthyläther wurde vorgängig 5 Std. im Hochvakuum getrocknet. Zwei Bestimmungen mit Einwaagen von 14,9 und 23,5 mg ergaben 0,98 und 0,83 Äthoxygruppen pro Molekel.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter den Carotinoiden gelber Herbstblätter von *Acer platanoides* wurde Lutein-3-linolenat gefunden. Die Stellung der Estergruppe wurde durch Verätherung der noch freien allylständigen Hydroxylgruppe nach GROB & PFLUGSHAUPT³⁾ bestimmt. Die Säurekomponente wurde in Form des Methylesters gas-chromatographisch identifiziert. Es bestehen gute Hinweise dafür, dass in diesen Herbstblättern auch ein Lutein-3'-ester zugegen ist, dessen Fettsäurekomponente allerdings noch nicht bekannt ist.

Diese Arbeit wurde durch den SCHWEIZ. NATIONALFONDS unterstützt. Ausserdem danken wir der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE in Basel für ihre stets bereitwillige Mitwirkung. Herrn Dr. ARM vom Institut für organische Chemie danken wir für seine Mithilfe bei der Gas-chromatographie. Frau I. FREI danken wir für die Aufnahme der Absorptionsspektren.

Institut für organische Chemie der Universität Bern

⁷⁾ T. W. GOODWIN in K. PAECH & M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. III, S. 273, Springer-Verlag, Berlin 1955.