

## DIE KETOCAROTINOIDE IN *ADONIS ANNUA* L.

KURT EGGER

Botanischen Institut der Universität, Heidelberg, Germany

(Received 6 October 1964)

**Zusammenfassung**—Die Carotinoide der roten Blumenblätter von *Adonis annua* L. werden untersucht Neben Astaxanthin, das von Seybold<sup>1</sup> als der Hauptfarbstoff erkannt wurde, lassen sich drei weitere Pigmente nachweisen, für die Strukturformeln abgeleitet werden: 1. Adonirubin—4,4'-Diketo-3-hydroxy- $\beta$ -carotin, 2. Adonixanthin—3,3'-Dihydroxy-4-keto- $\beta$ -carotin und 3. Hydroxyechinenon, das von Krinsky und Goldsmith<sup>2</sup> aus *Euglena gracilis* isoliert und als 3-Hydroxy-4-keto- $\beta$ -carotin identifiziert wurde. Nach der Verseifung werden diese Farbstoffe als Dehydroverbindungen erhalten, Dehydroadonirubin—3,4,4'-Triketo- $\beta$ -carotin, Dehydroadonixanthin—3,4-Diketo-3'-hydroxy- $\beta$ -carotin und Euglenanon—3,4-Diketo- $\beta$ -carotin, das ebenfalls in *Euglena* vorkommt.

**English Abstract**—The main xanthophyll of the red flowers of *Adonis annua* L. has been found to be astaxanthin<sup>1</sup>. The isolation of the three minor red compounds is described in this investigation. One has been found to be identical with hydroxyechinenon, recently isolated by Krinsky and Goldsmith from *Euglena gracilis* and identified as 3-hydroxy-4-keto- $\beta$ -carotene.<sup>2</sup> The two others are hitherto unknown carotenoid: named adonirubin (4,4'-diketo-3-hydroxy- $\beta$ -carotene) and adonixanthin (3,3'-hydroxy-4-keto- $\beta$ -carotenes). During the saponification procedure the pigments are converted to the corresponding dehydrocompounds) hydroxyechinenon to euglenanon (3,4-diketo- $\beta$ -carotene); and the other two to dehydroadonirubin (3,4,4'-triketo- $\beta$ -carotene), and dehydroadonixanthin (3,4-diketo-3'-hydroxy- $\beta$ -carotene).

Die Blumenblätter des kleinen Adonisröschens sind tiefrot gefärbt. Rote Blumenfärbung ist meist auf Anthocyane zurückzuführen, sei es, dass Pelargonidinderivate die Vakuolen rot färben, sei es, dass orangegelbe Carotinoide in den Chromoplasten zusammen mit weinroten oder violetten Cyanidinderivaten in den Vakuolen das Blumenblatt dem Auge einheitlich rot erscheinen lassen. Die tiefe Farbe des Adonisröschens hingegen ist, wie Seybold nachgewiesen hat, rein plasmochrom.<sup>1</sup> Sie wird durch ätherlösliches, in den Chromoplasten lokalisiertes Pigment hervorgerufen. Das nach der Verseifung gereinigte Hauptpigment stimmte in der Analyse mit Astacin überein, so dass ursprünglich in der Pflanze Astaxanthin-ester anzunehmen sind. Dies wurde in Nachuntersuchungen von Falk<sup>3</sup> und von Seybold und Goodwin<sup>4</sup> bestätigt, wenngleich Falk darauf hinweist, dass eine völlige Deckung der Spektren mit authentischen Messungen nicht zu erzielen war. Sollten schwer abtrennbare Begleitpigmente die Ursache für diese geringen Abweichungen sein?

Drei dem Astacin nahestehende Ketocarotinoide konnten nun tatsächlich neben dem Hauptpigment nachgewiesen werden. Die Komponenten des ursprünglichen Estergemisches lassen sich sehr gut trennen, während sich die Verseifungsprodukte sehr viel ähnlicher sind und zum Teil nur als Gemisch erhalten werden. Erst nach Abschluss dieser Untersuchungen haben wir gefunden, dass sich die Trennung von Astacin und Dehydroadonixanthin, also der Tetra- und Triketoverbindung, auf Polyamidschichten erreichen lässt.<sup>5</sup> Die Spektren der

<sup>1</sup> A. SEYBOLD, *Sber. heidelb. Akad. Wiss. Math.-nat. Kl. Jahrg. 1953/54*, 2. Abh.

<sup>2</sup> N. I. KRINSKY und T. H. GOLDSMITH, *Arch. Biochim. Biophys.* **91**, 271 (1960).

<sup>3</sup> H. FALK, Dissertation Heidelberg (1957).

<sup>4</sup> A. SEYBOLD und T. W. GOODWIN, *Nature* **184**, 1714 (1959).

<sup>5</sup> K. EGGER und H. VOIGT, *Z. Pflanzenphysiol. im Druck* (1965).

Ketocarotinoide sind leider arm an Feinstruktur und gleichen sich weitgehend; aus ihnen allein auf die Struktur zu schliessen ist nicht möglich. Die chromatographischen Daten sind bei diesen Verbindungen für die Analyse wertvoller. Schauer und Burlisch<sup>6</sup> haben gezeigt, dass es in günstigen Fällen bei der Verteilungschromatographie von Homologen möglich ist, die Struktur unbekannter Glieder exakt zu berechnen. Auch bei gleicher C-Zahl, aber wechselnden Substituenten sind gesetzmässige Beziehungen erfüllt, die präzise Rückschlüsse auf die Struktur unbekannter, den Testsubstanzen aber nahestehender Verbindungen gestatten. Die Zusammenhänge zwischen den Adonispigmenten lassen sich aufklären, wenn in vier Systemen entwickelt wird:

1. Mit Petroläther:Aceton 5:1, Kieselgelschicht, Adsorptive Trennung der ursprünglichen Ester.
2. Mit Petroläther:Tetrachlorkohlenstoff 3:2, Zellosoeschicht, Adsorptive Trennung der verseiften Pigmente.
3. Mit Methanol:Aceton 5:1, Papierschicht mit Triglycerid imprägniert, Verteilungstrennung der verseiften Farbstoffe.
4. Äthanol 93-prozentig oder 98-prozentig, Papierschicht mit Paraffinöl imprägniert, Verteilungstrennung der Ester.

Dazu werden noch die Vergleichswerte von Echinenon, Canthaxanthin, Rhodoxanthin, Kryptoxanthin, Zeaxanthin und ihrer Ester herangezogen. Polyamidschichten mit dem Fließmittel Petroläther:Methyläthylketon:Methanol 8:1:1 können zur Ergänzung dienen.

#### A. CHROMATOGRAPHISCHE BEFUNDE

##### 1. Adsorptive Trennung der Ester

Alle Phytoxanthine liegen zunächst im Extrakt als Ester vor. Elf rote Zonen erscheinen auf der Kieselgel-Dünnschicht. Ihre relative Stärke ist in Abb. 1 angedeutet. Die Farbtöne

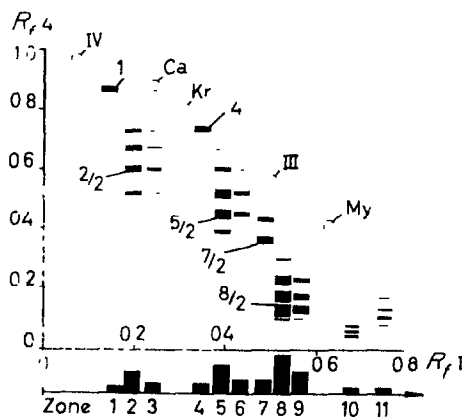


ABB. 1. FARBWACHSE DER *Adonis*-BLUMENBLÄTTER, SCHEMATISCH ALS ZWEIDIMENSIONALES CHROMATOGRAMM DARGESTELLT.

Abszisse: adsorptive Auftrennung in 11 Zonen mit Petroläther:Aceton 5:1 auf Kieselgel (System 1). Ordinate: Verhalten der 11 Zonen aus System 1 bei Rechromatographie mit Äthanol auf Paraffinöl-imprägnierter Zellosoeschicht, Verteilungschromatographie, System 4. Die Farbstoffzonen werden nach steigenden  $R_f$ -Werten abgezählt, also  $8/2 = 2$ . Zone im System 4 der Zone 8 aus System 1. Vergleichssubstanzen, die nicht im Extrakt vorhanden sind, durch weisse Kreise (○) dargestellt: Ca—Canthaxanthin, My—Echinenon, Kr—Kryptoxanthin, III—Euglenanon, IV—Dehydroadonixanthin, durch Verseifung der Zonen 11 und 10 erhalten

<sup>6</sup> H. K. SCHAUER und R. BURLISCH, *Z. Naturforsch.* 13b, 327 (1958).

der einzelnen Banden spielen von weinrot (1,2,4,5,7,8) über blutrot (3,6,9) bis orangerot (10,11). Diese elf Zonen werden nun getrennt eluiert und für die folgenden Analysen verwendet. Sie erweisen sich als einheitlich im chromatographischen System 1 und lassen sich auf Kieselgel oder Magnesiumcarbonat auch mit anderen Laufmitteln nicht weiter auftrennen.

## 2. Adsorptive und 3. Verteilungstrennung der Verseifungsprodukte

Die durch die Verseifung freigesetzten Phytoxanthine sind polarer als die Ester, so dass Papier zur adsorptiven Trennung ausreicht (System 2), für die Verteilung aber das Paraffinöl durch die polareren Triglyceride (System 3, Egger<sup>7</sup>) ersetzt werden muss, um niedrige  $R_f$ -Werte zu erzielen. Jede der elf Esterzonen ergibt nach Alkalieinwirkung nur ein freies Phytoxanthin, und zwar lassen sich alle Zonen auf vier verschiedene Verbindungen zurückführen, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist.

TABELLE 1. FARBWACHSELUATE UND IHRE VERSEIFUNGSPRODUKTE

Zone	$100 \times R_f$ *	$\lambda_{\max}(\text{nm})^\dagger$	Verseifgspr.‡	$\lambda_{\max}(\text{nm})$
1	14	465	I	467
2	20	465	I	467
3	24	460	(I)	466
4	35	465	II	466
5	40	465	II	466
6	44	459	(II)	465
7	48	465	I	467
8	52	465	I	467
9	56	459	(I)	465
10	69	454	IV	455
11	73	454	III	455

\*  $R_f$  1 Kieselgelschicht/Petroläther:Aceton 5:1.

†  $\lambda_{\max}$ : gemessen in *n*-Hexan.

‡ I = Astacin, II–IV = Begleitpigmente.

Bei der Verseifung wird die Farbe leicht vertieft. Der flache, undifferenzierte Verlauf der Spektren im Bereich des einzigen Maximums bedingt eine Unsicherheit von  $\pm 1$  nm für die Angabe von  $\lambda_{\max}$ . Die chromatographischen Daten lassen sich in der zweidimensionalen Skizze Abb. 2 rasch überblicken, die genauen Messwerte, die Mittelwerte aus 5 verschiedenen Bestimmungen darstellen, sind in Tabelle 2 den Werten von Testsubstanzen gegenübergestellt. Zur Sicherung der vermuteten Strukturen können die Reduktionsprodukte dienen, die durch Einwirken von  $\text{NaBH}_4$  in äthanolischer Lösung entstehen. Dabei wird die Ketogruppe in eine sekundäre Alkoholgruppe verwandelt.

## 4. Verteilungstrennung der Ester

Die adsorptiv einheitlich erscheinenden elf Esterzonen, auf paraffinölimprägnierten Papierschichten entwickelt, spalten in eine Reihe von Komponenten auf. Alle diese Komponenten sind schon im Originalextrakt vorhanden (Abb. 3), so dass es sich nicht um Artefakte, entstanden durch die Einwirkung des Kieselgels, handeln kann. Die  $R_f$ -Differenzen benachbarter Flecke sind sehr ähnlich, nach niedrigen  $R_f$ -Werten hin werden sie kleiner: die Grösse  $\Delta R_M$  bleibt annähernd konstant! Damit werden homologe Reihen

<sup>7</sup> K. EGGER, *Chromatographie*, Symposium II, Brüssel p. 75 (1962).

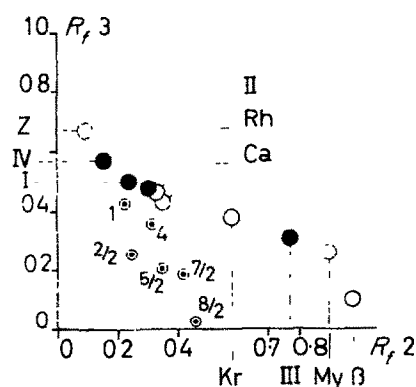


ABB. 2. CHROMATOGRAPHISCHE EIGENSCHAFTEN DER VERSEIFUNGSPRODUKTE AUS ADONISARBE-WACHSEN MIT VERGLEICHSSUBSTANZEN.

Abszisse.  $R_f$  Werte auf Zelloleschicht mit dem Fliessmittel Petroläther: Tetrachlorkohlenstoff 3:2 (Adsorption, System 2). Ordinate: Verhalten auf Triglyceridimprägnierter Schicht mit MeOH: Aceton = 5:1 (Verteilung, System 3). Vergleichssubstanzen: Z—Zeaxanthin, Rh—Rhodoxanthin,  $\beta$ — $\beta$ -Carotin, I—Astacin, II—Dehydroadonirubin, weitere wie in Abb. 1. Beziffert: Hauptesterkomponenten wie in Abb. 1, aber hier mit niedrigeren  $R_f$ -Werten.

angezeigt. Da der Carotinoidteil in jedem Eluat gleichbleibt, kann die Homologie nur die Substituenten betreffen, also die Länge der Fettsäureketten. Unterschiede von weigen  $-\text{CH}_2-$  Gruppen wirken sich für die Adsorption aber noch nicht aus. Somit wird verständlich, dass die Zonen auf Kieselgelschichten einheitlich erscheinen. In Verteilungssystemen jedoch führt bei umgekehrten Phasen jede Kettenverlängerung um eine  $-\text{CH}_2-$  zu einer

TABELE 2. EIGENSCHAFTEN DER VERSEIFTEN PIGMENTE (DEHYDROVERBINDUNGEN), IHRE REDUKTIONSPRODUKTE MIT  $\text{NaBH}_4$  UND EINIGER TESTSUBSTANZEN

Verbindung	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})^*$	$R_f 2$	100 <sup>†</sup>	$R_f 3$	100 <sup>†</sup>
I: Astacin	467	24		46	
II: Dehydroadonirubin	466	30		44	
Canthaxanthin	465	35		42	
III: Euglenanon	455	63		27	
IV: Dehydroadonixanthin	455	16		55	
Echinenon <sup>9</sup>	454	90		25	
I, reduz.	451, 478	0		95	
II, reduz.	451, 478	5		79	
Isozeaxanthin	451, 478	10		65	
III, reduz.	451, 487	13		58	
IV, reduz.	451, 478	5		79	
Zeaxanthin	451, 478	10		66	
Kryptoxanthin	451, 478	58		36	
Rhodoxanthin	486	33		43	
Escholtzanthin (aus Rhod.)	475, 505	9		67	

\*  $\lambda_{\text{max}}$ : 1–6 in *n* Hexan, 7–15 in Athanol.

†  $R_f 2$ : System Papier/Petroläther und  $\text{CCl}_4$ ;  $R_f 3$ : System Papier und Triglycerid/Methanol und Aceton 5:1

<sup>8</sup> P. ZELLER und andere, *Helv. chim. Acta* **42**, 841 (1959).

<sup>9</sup> T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **63**, 481 (1956).

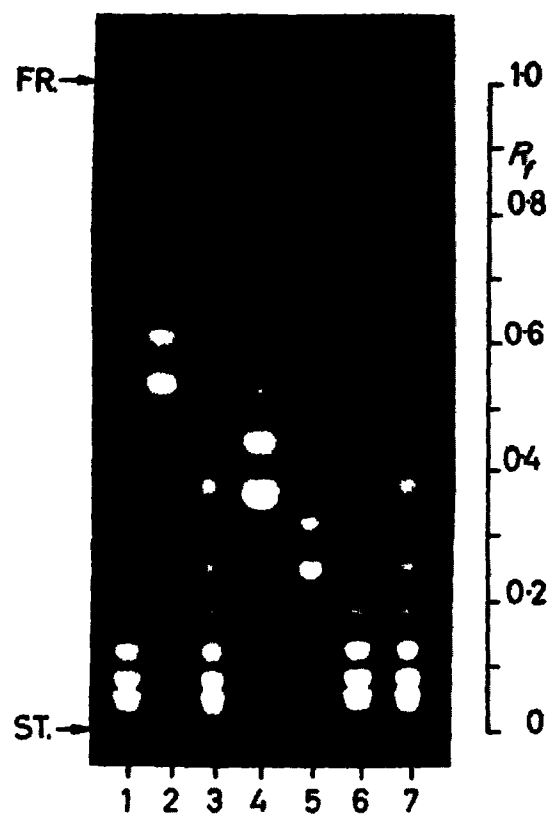


ABB. 3. CHROMATOGRAMM DER ADONISFARBWACHSE IM SYSTEM 4, JEDOCH 93% IGES ÄTHANOL ALS FLIESSMITTEL, ZELLULOSESCHICHT MIT PARAFFINÖL IMPRÄGNIERT.

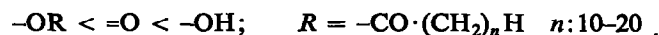
Startpunkte 3 und 7: Gesamtextrakt, 2: Kieselgelzonen 1 und 2, 4: Zonen 4' und 5, 5: Zone 7, 6: Zone 8. Die Pigmente der Kieselgelzone 10 sind nur als Spuren über den Startpunkten 3 und 7 zu erkennen.

Erniedrigung des  $R_f$ -Wertes, wie sich an Testsubstanzen gezeigt hat.<sup>10</sup> In jeder der elf Esterzonen sind nun vier bis fünf Homologe vereinigt; nur die Zonen 1 und 4 bilden eine Ausnahme: sie bleiben einheitlich auch im Paraffinöl-Chromatogramm. Eine genauere Deutung des Esteraufbaus wird am Schluss versucht.

## B. IDENTIFIZIERUNG DER NEU GEFUNDENEN CAROTINOIDE

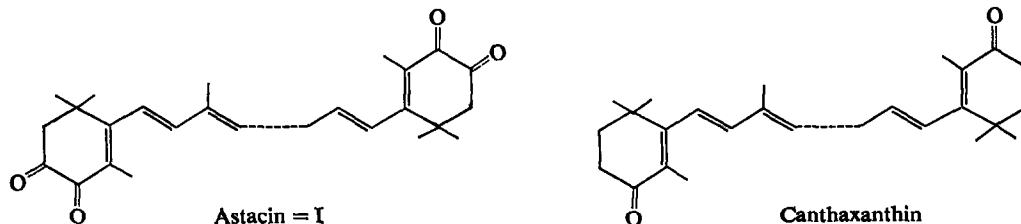
Wie Substituenten die Lage von  $C_{40}$ -Carotinoiden im Chromatogramm verändern, ergab sich aus dem Vergleich definierter Testsubstanzen<sup>6,11</sup>. Dabei ist für die Adonispigmente der Einfluss von Hydroxyl-, Keto- und Estergruppen entscheidend. Es gilt:

1. Solange nur ein Substituent in jeden Jononring eintritt, verhalten sich die Einflüsse additiv bezüglich des  $R_M$ -Wertes, im Bereich von 0,3  $R_f$  0,7 auch annähernd additiv bezüglich des  $R_f$ -Wertes.
2. In Adsorption wirken polare Substituenten  $R_f$ -senkend, in der Reihenfolge zunehmender Wirksamkeit:



Quantitativ gilt etwa: 1 ( $-\text{OH}$ )  $\cong$  1,5 ( $=\text{O}$ )  $\cong$  4 bis 5 ( $-\text{OR}$ ).

3. Bei Verteilung in umgekehrten Phasen wirken polare Substituenten  $R_f$ -erhöhend, der Alkylrest einer Estergruppe hingegen mit zunehmender Länge  $R_f$ -senkend. Quantitativ findet man: 1 ( $-\text{OH}$ )  $\cong$  1,5 ( $=\text{O}$ )  $\cong$  2 ( $-\text{OR}$ ), wenn  $R = -\text{COC}_{15}\text{H}_{31}$  und der Einfluss der Estergruppe ( $-\text{OR}$ ) negativ gerechnet wird.
4. Tritt ein zweiter Substituent in einen bereits veränderten Jononring, so gelten diese Regeln für die hinzukommende Gruppe nicht mehr. Da sich das Verseifungsprodukt von I als identisch mit Astacin erwiesen hat,<sup>1</sup> kann der Effekt eines Zweitsubstituenten durch Vergleich von I mit Canthaxanthin gefunden werden:



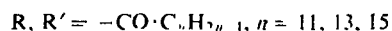
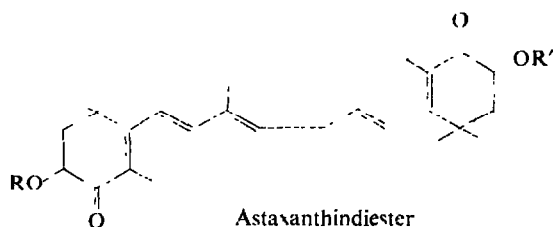
Adsorption: Läge Additivität vor, so müssten vier Ketogruppen etwa dem Einfluss von 2,5  $\text{OH}$ -Gruppen entsprechen. Astacin wandert aber höher (Tab. 2) als Zeaxanthin, das nur 2  $\text{OH}$ -Gruppen trägt. Ist die Wirkung der ersten Ketogruppe etwa 70% derjenigen des Hydroxyls, so erreicht die zweite nur noch um 15%, beide zusammen erreichen nicht die Wirkung einer einzelnen  $\text{OH}$ -Gruppe.

Verteilung: Hier folgt ganz entsprechend aus dem Vergleich Echinenon: Canthaxanthin: Astacin, dass die zweite Ketogruppe einen geringen Zuwachs an Polarität bringt, und höchstens 15% der einem Hydroxyl entsprechenden  $R_f$ -erhöhenden Wirksamkeit entfaltet.

<sup>10</sup> K. EGGER, *Ber. deut. Bot. Ges.* 77, 145 (1965).

<sup>11</sup> K. EGGER, *Planta* 58, 664 (1962).

Eintritt einer Estergruppe neben C=O. Werden in das Molekül des Canthaxanthins in *o*-Stellung zu den Ketogruppen Estergruppen eingefügt, entstehen formal Astaxanthindiester:

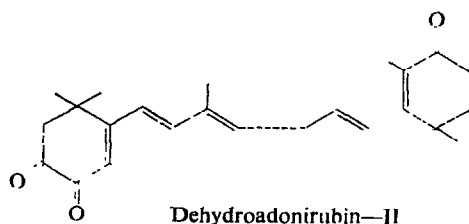


und es wäre zu erwarten, dass diese auf Kieselgelschichten bei adsorptiver Trennung niedrigere  $R_f$ -Werte aufweisen als das Canthaxanthin. Das Gegenteil aber wird beobachtet: Die Astaxanthindiester aus Adonis wandern höher als dieses! Man findet  $\Delta R_f = +0.10$ , für nur eine Estergruppe ist also die Hälfte zu rechnen. Diese Anomalie muss im folgenden beachtet werden.

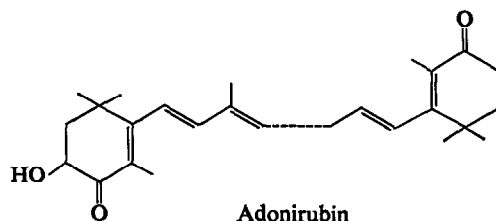
5. Charakterisierung auf Polyamid-Dünnschichten mit dem Fließmittel Petroläther: Methyläthylketon: Methanol 8:1:1 hat sich neuerdings für die Dehydroverbindungen bewährt, die in den anderen Systemen sehr ähnliche  $R_f$ -Werte haben. Hier erhält man für Astacin  $R_f$  0.32, Canthaxanthin  $R_f$  0.58. Der Eintritt zweiter Ketogruppen in den bereits substituierten Jononring wirkt sich in diesem System also etwas stärker aus. Die Trennung kommt durch eine Überlagerung von Verteilungsvorgängen mit gequollenem Perlon als stationärer Phase und der für Polyamid charakteristischen Adsorption durch Wasserstoffbrücken zur Amidgruppe zustande.

*Substanz I.* Sie stellt das Hauptprodukt der Verseifung dar. An ihrer Identität mit Astacin sind im Laufe dieser Untersuchung keine Zweifel aufgetreten.

*Substanz II.* Diese Verbindung ist Astacin sehr ähnlich, ihr Absorptionsmaximum liegt etwa 1 nm nach kürzeren Wellenlängen verschoben und damit gerade zwischen dem von Astacin und Canthaxanthin. In den Trennsystemen 2 und 3 wandert II genau zwischen diesen beiden Verbindungen und dies gilt auch für das eben zitierte Polyamid,  $R_f$  II = 0.45! Das führt zu der Vermutung, dass auch die Struktur dazwischen liegt, also:



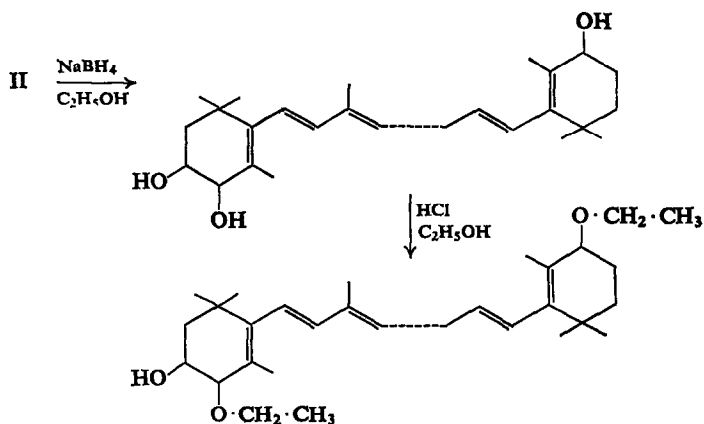
Dies wäre die oxydierte Form eines bisher nicht bekannten, in der Pflanze veresterten Pigmentes, das als Adonirubin bezeichnet werden möge:



Ist diese Annahme zu bestätigen? Adonirubin könnte im Gegensatz zu Astacin nur Monoester bilden, denen im System 4 höhere  $R_f$ -Werte zukämen als den Astaxanthindiestern. Zone 5 erfüllt diese Bedingung. In Adsorption müssten diese Ester der oben dargestellten Anomalie unterliegen: Höhere  $R_f$  als Canthaxanthin, aber niedrigere als Astaxanthindiester, da diese zwei Estergruppen tragen. Auch diese Forderung wird durch Zone 5 erfüllt (Abb. 1 und Abb. 3 Spur 4). Schliesslich müsste sich II zu einer Verbindung mit dem chromophoren System des  $\beta$ -Carotins reduzieren lassen. Durch Einwirkung von  $\text{NaBH}_4$  in äthanolisches Lösung bei  $30^\circ$  entsteht ein gelbes Pigment mit dem Spektrum des Isozeaxanthins, das sich chromatographisch zwischen Isozeaxanthin und dem Reduktionsprodukt des Astacins einordnet (Tab. 2). In  $\text{HCl}$ -haltigem Äthanol (0.01 M) entsteht ein weniger polares Produkt, dessen Eigenschaften wiederum zwischen denen der entsprechenden Äther des Isozeaxanthins und des reduzierten Astacins liegen;  $hR_f$ -Werte ( $\times 100$ ) im Triglyceridsystem 3:

Isozeaxanthindiaethyläther	33
3-Hydroxy-isozeaxanthindiaethyläther	59
= Produkt aus II	
3,3'-Dihydroxyisozeaxanthindiaethyläther	70
= Produkt aus Astacin	

Damit kann die Reduktion und Ätherbildung<sup>12</sup> interpretiert werden:



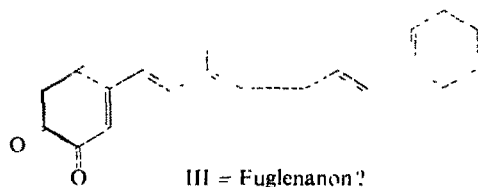
Die für Adonirubin angenommene Struktur ist damit gesichert.

*Substanz III.* Das Spektrum dieser Substanz ist dem des Echinenons sehr ähnlich, das Maximum liegt bei 455 gegenüber Echinenon mit 454 nm. In der Pflanze liegen Ester vor, deren  $\lambda_{\text{max}}$  mit 454 nm geringfügig kürzerwellig liegt. III kann neben einer Ketogruppe kein

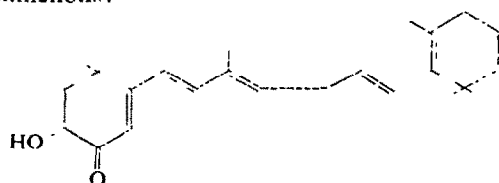
<sup>12</sup> E. C. GROB und R. P. PFLUGSHAUP, *Helv. chim. Acta* **45**, 1592 (1962).



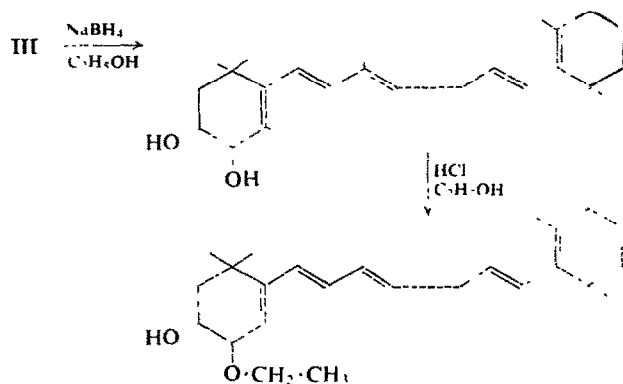
isoliertes Hydroxyl mehr tragen, da der  $R_f$ -Wert im System 3 niedriger als der des Kryptoxanthins ist, für eine polarere Verbindung aber im Verteilungschromatogramm ein höherer Wert zu fordern wäre. Damit kommt nur noch eine o-Diketostruktur in Frage, wie sie von Krinsky und Goldsmith<sup>2</sup> in Euglenanon nachgewiesen wurde:



Nach den oben dargelegten Regeln wäre diese Verbindung etwas weniger polar als Kryptoxanthin. Sie wäre das Dehydroprodukt des ebenfalls von Krinsky und Goldsmith in *Euglena* gefundenen Hydroxyechinenons:



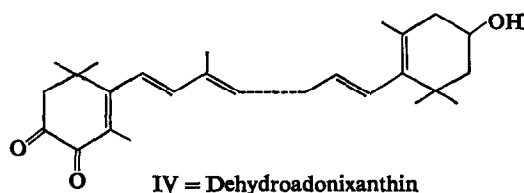
das in Adonis in veresterter Form vorläge. Diese Ester müssten wieder die Anomalie zeigen: geringere Adsorption als Echinenon. Tatsächlich ist das im System 1.-Kieselgel — der Fall. Das Reduktionsprodukt mit  $\text{NaBH}_4$  schliesslich beweist das chromophore System des  $\beta$ -Carotins, der  $R_f$ -Wert im System 3 (Tab. 2) entspricht etwa 2 Hydroxylgruppen. Mit HCl-haltigem Äthanol entsteht ein weniger polares Produkt mit  $R_f(3) = 0.42$ , wie für einen Monoäthyläther zu erwarten.



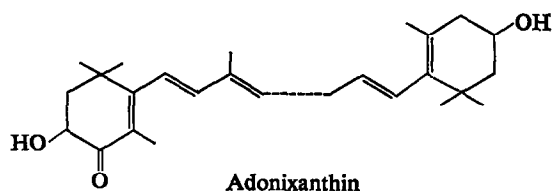
Damit kann die Identität von III mit Euglenanon als gesichert angesehen werden.

**Substanz IV.** Das Spektrum von Substanz IV ist dem der Verbindung III gleich. IV muss also dem Euglenanon besonders nahe stehen. Allerdings ist es wesentlich polarer; im Triglyceridssystem 3 findet man für  $R_{Af}(IV) - R_{Af}(III)$   $0.519 \pm 0.02$ . Im gleichen System ergibt  $R_{Af}(\text{Zeaxanthin}) - R_{Af}(\text{Kryptoxanthin})$   $0.538 \pm 0.02$ , also etwa denselben Polaritätsunterschied. IV kann also eine Hydroxylgruppe besitzen, die aber von der Ketogruppe isoliert sein muss. In HCl-haltigem Äthanol erleidet IV keinerlei Veränderung, das Hydroxyl

kann also nicht allylständig sein. Das Reduktionsprodukt mit  $\text{NaBH}_4$  hat dieselben chromatographischen Eigenschaften wie das 3-Hydroxyisoeaxanthin, ergibt aber mit HCl-haltigem Äthanol einen Äther, der polarer ist als Zeaxanthin. Dieses Verhalten wäre für ein 3'-Hydroxyeuglenanon zu erwarten:



In der Pflanze selbst lägen die Ester der reduzierten Form

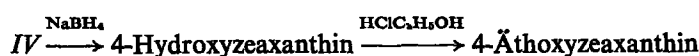


vor. Es müsste Diester bilden können, wobei die im unsubstituierten Jononring eingetretene Estergruppe nun aber im System 1  $R_f$ -senkend wirken müsste. Im System 4 müsste sie gleichsinnig, also ebenfalls  $R_f$ -erniedrigend wirken. Beides wird beobachtet (Abb. 1, Zonen 10 und 11). Ja, genauer noch: zwischen den Hauptkomponenten dieser beiden Zonen im System 4, Abb. 1 findet man fast den selben  $R_M$ -Unterschied wie mit einem weniger polaren Fließmittel (Aceton: Methanol 3:1 und 1%  $\text{H}_2\text{O}$ ) für Physalien ( $R_f$  0.08) und Kryptoxanthinpalmitat ( $R_f$  0.20):

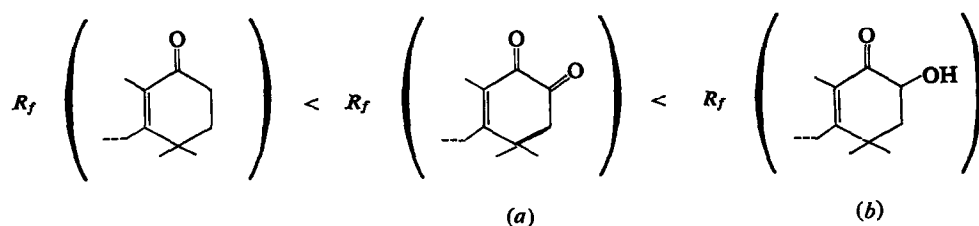
$$\Delta R_M(\text{Adonis}) = 0.455 \pm 0.03$$

$$\Delta R_M(\text{Phys/Kry.}) = 0.471 \pm 0.03$$

Womit die Formulierung für Adonixanthin begründet erscheint. Reduktion und Ätherbildung lassen sich damit darstellen:



Welcher Zusammenhang besteht nun zwischen den Esterfraktionen? Die tiefstwandernden Ester des Astaxanthins (Abb. 3, Spur 6) dürfen als Diester angesehen werden, wobei die Fettsäuren vermutlich Stearin, Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure sind. Welche Zone mag nun Halbesther des Astaxanthins enthalten? Die Ester des Adonirubins, Zone 5, müssten im System 4 tiefer wandern als die gesuchte Gruppe, gleichgültig, ob hier Diketo- oder Ketohydroxy-Struktur vorliegt:



Also kann nur Zone 2 die gesuchte Halbesterschar sein, wobei der beachtliche  $R_f$ -Unterschied zu den Adonirubinestern der Struktur (b) höhere Wahrscheinlichkeit gibt. Nicht einzuordnen sind zunächst die Zonen 1, 4 und 7. Die Zonen 1 und 4 spalten nicht weiter auf, liegen aber trotzdem als Ester vor, denn ihr  $R_f$ -Wert im System 4 (Verteilung) erhöht sich nach Alkalieinwirkung, wobei Astacin bzw. II entstehen. Die Fettsäure kann aber keine gesättigte sein, da sie eine sprunghafte Änderung des adsorptiven Verhaltens bewirkt. Vielleicht liegt eine mehrfach ungesättigte, oder eine Epoxy- oder Hydroxyfettsäure vor. Nach anderen Beobachtungen müsste sich diese Fettsäure auch am Aufbau der Diester beteiligen. Die Zone 7 zeigt genau die Eigenschaften, die für eine solche Gruppe zu erwarten wären. Jede Komponente würde eine normale gesättigte und die gesuchte abweichende Fettsäure enthalten (Abb. 3, Spur 5). Bleiben noch die Gruppen 3, 6 und 9! Sie unterscheiden sich von 2, 5 und 8 durch Farbe und adsorptives Verhalten. Werden sie vor der Rechromatographie belichtet, so wandeln sie sich teilweise in die Hauptgruppen um (2 3, 5 6, 8 9). Nach der Verseifung nähert sich das Spektrum ebenfalls stark dem der Verbindungen I und II (Tab. I). Vermutlich liegt hier reversible *cis-trans*-Isomerie vor.

Über die zur Zeit laufenden Untersuchungen der Fettsäuren wird später berichtet. Einzelheiten der experimentellen Bedingungen sind ausführlich bei Egger<sup>7, 10, 11</sup> dargestellt.

#### DISKUSSION

Die Chromoplasten des roten Adonisröschens zeigen chemische Züge, die eine grosse Zahl von Blüten und Früchten charakterisieren: alle vorhandenen Xanthophylle werden mit einer Anzahl homologer Fettsäuren frei kombiniert, wobei es zur Bildung von Mono- und Diestern kommt. Sie unterscheiden sich damit von den Chromoplasten des Herbstlaubes, in denen nur wenige, z.T. ungesättigte Fettsäuren (Palmitinsäure und Linolensäure) an der Veresterung teilnehmen.<sup>10, 13</sup> Eine auffallende Besonderheit jedoch ist die Synthese des bei höheren Pflanzen sonst fehlenden Astaxanthins, das seine Hauptverbreitung ja im Tierreich besitzt. Nur in niederen Algen wurde es gefunden: *Euglena*; *Haematococcus pluvialis*<sup>14</sup> und in *Chlorella*-Arten.<sup>15</sup> Dabei zeigt es hier ähnliche physiologische Eigenschaften wie die Sekundäracarotinoidbildung bei höheren Pflanzen, die ja mit einer Abwanderung von P und N verbunden sein kann (Herbstlaub!). Auch bei den Algen kommt es dabei zu der in photosynthetisch aktiven Chloroplasten praktisch fehlenden Veresterung der Phytoxanthine mit höheren Fettsäuren. Wie bei Adonis findet man auch dort neben dem Hauptpigment Astaxanthin noch weitere, zum Teil noch unbekannte Ketocarotinoide. Die Adonispigmente könnten daher zum Schlüssel für die Aufklärung dieser Nebensubstanzen wie auch der Ester der Grünalgen werden. Die Übereinstimmung eines Nebenzpigmentes von Adonis mit dem in *Euglena* gefundenen Hydroxyechinenon unterstreicht diese Vermutung. Canthaxanthin, das in Adonis fehlt, konnte von Czygan<sup>16</sup> in Mangelkulturen verschiedener Grünalgen nachgewiesen werden.

*Anerkennung* – Herrn Professor Dr. A. Seybold danke ich für anregende Diskussionen. Reines Canthaxanthin und Isozeaxanthin wurde mir dankenswerterweise von der F. Hoffmann-La Roche A.G. zur Verfügung gestellt. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Untersuchungen durch Sachmittel gefördert.

<sup>13</sup> W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Helv. chim. Acta* **46**, 2411 (1963).

<sup>14</sup> J. Z. TISCHER, *Z. physiol. Chem.* **250**, 147 (1937).

<sup>15</sup> G. DERSCH, *Flora (Jena)* **149**, 566 (1960).

<sup>16</sup> F. C. CZYGAN, *Experientia* **20**, 573 (1964).