

## ZUR STRUKTUR VON SIPHONAXANTHIN UND SIPHONEIN, DEN HAUPTCAROTINOIDEN SIPHONALER GRÜNALGEN

HANS KLEINIG\* und KURT EGGER

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Germany

(Received 12 April 1967)

**Zusammenfassung**—Siphonaxanthin und Siphonein werden aus *Caulerpa prolifera* isoliert. Durch Darstellung zahlreicher Derivate werden die funktionellen Gruppen ermittelt. Siphonaxanthin besitzt acht konjugierte Kohlenstoffdoppelbindungen, eine konjugierte Ketogruppe, eine primäre, eine sekundäre allylständige und eine sekundäre nicht allylständige Hydroxylgruppe. Alle ermittelten Eigenschaften des Siphonaxanthins stehen im Einklang mit der vorgeschlagenen Strukturformel eines 3,3',16-Trihydroxy-7,8-dihydro-8-oxo- $\alpha$ -carotins. Siphonein leitet sich vom Siphonaxanthin durch Veresterung des primären Hydroxyls am C<sub>16</sub> mit Laurinsäure ab.

**Abstract**—The two main carotenoid pigments of the Siphonales, siphonaxanthin and siphonein, have been isolated from *Caulerpa prolifera*. Several derivatives have been prepared in order to find out the functional groups. Siphonaxanthin contains eight conjugated carbon double bonds, one conjugated oxo group, one primary, one allylic secondary and one non allylic secondary hydroxyl group. All properties hitherto known are in good agreement with our proposed structural formula, siphonaxanthin = 3,3',16-trihydroxy-7,8-dihydro-8-oxo- $\alpha$ -carotene. Siphonein is derived from siphonaxanthin by esterification of the primary hydroxyl group with lauric acid.

IN SIPHONALEN Grünalgen sind neben den aus den höheren Pflanzen bekannten Carotinoiden ( $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Luteinepoxid, Antheraxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin) zwei Pigmente gefunden worden, die als Siphonaxanthin und Siphonein bezeichnet wurden.<sup>1,2</sup> Von beiden Farbstoffen sind die Absorptionsmaxima bekannt: Siphonaxanthin 455 nm in Äthanol, 452, 480 nm in Petroläther; Siphonein 460 nm in Äthanol, 452, 480 nm in Petroläther. Ferner wurde Siphonein als ein Ester von Siphonaxanthin angesehen und auf die Ähnlichkeit dieser Pigmente mit Fucoxanthin hingewiesen.

Bei eigenen Untersuchungen siphonaler Chlorophyteen haben wir ebenfalls Siphonaxanthin und Siphonein gefunden. Die beiden Pigmente fehlten jedoch einer Reihe von Siphonalen, z.B. der Gattung *Acetabularia*, über deren Carotinoide wir an anderer Stelle berichtet haben.<sup>3,4</sup> Als besonders ergiebige Quelle für Siphonaxanthin und Siphonein erwies sich *Caulerpa prolifera*. Diese Alge diente als Ausgangsmaterial für unsere Strukturanalysen der beiden Pigmente.

### A. Zur Isolierung der Farbstoffe

Das frische Algenmaterial wurde mit Aceton extrahiert und anschließend in Petroläther überführt. Der Extrakt wurde auf einer Polyamid-Säule vorfraktioniert, die einzelnen

<sup>1</sup> H. H. STRAIN, *Photosynthesis in Plants*, Iowa State College Press (1949).

<sup>2</sup> H. H. STRAIN, *Manual of Phycology*, p. 243. Waltham, Mass. (1951).

<sup>3</sup> H. KLEINIG, *Ber. Deut. Botan. Ges.* 79, 126 (1967).

<sup>4</sup> H. KLEINIG und K. EGGER, *Phytochem.* 6, 903 (1967).

\* Anschrift: Botanisches Institut der Universität Freiburg, Germany.

Fractionen auf einer Kieselgel-Säule weiter gereinigt. Die schwierige Trennung von Siphonaxanthin und Neoxanthin gelingt besonders gut, wenn über Zucker nach der von Seybold und Egle<sup>5</sup> angegebenen Vorschrift (Petroläther mit spurenweisem Zusatz von Alkoholen als Elutionsmittel) chromatographiert wird. Es sei hier bemerkt, daß dieses Verfahren später von Strain<sup>6</sup> erneut vorgeschlagen wurde, wobei man den Hinweis auf die ursprünglichen Autoren vermißt.

Zur Charakterisierung der beiden Farbstoffe und ihrer künstlichen Folgeprodukte wurden Adsorptionschromatographie auf Kieselgeldünnschicht und Verteilungschromatographie auf mit ungesättigten Triglyceriden imprägnierter Zellulosedünnschicht<sup>7</sup> und Polyamid-dünnschicht<sup>8</sup> angewandt.

#### B. Analyse der isolierten Verbindungen Siphonaxanthin und Siphonein

Siphonaxanthin und Siphonein sind polare Pigmente, deren Farbe an die des  $\gamma$ -Carotins erinnert. Im Triglycerid-Chromatogramm liegt Siphonein knapp unter Lutein (Abb. 1 Spur 3 und 4), Siphonaxanthin knapp über Neoxanthin (Abb. 1 Spur 7 und 8). Die Spektren der beiden Farbstoffe unterscheiden sich nicht nur in Äthanol, sondern auch in Petroläther (Abb. 2 und Tabelle 1).

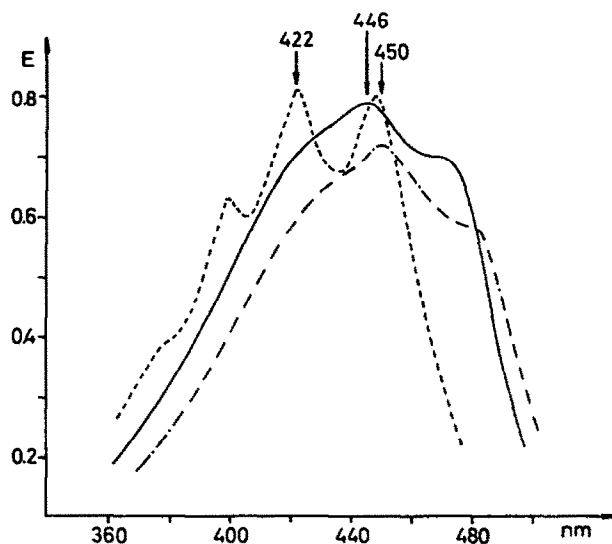


ABB. 2. ABSORPTIONSSPEKTRUM GEMESSEN IN PETROLÄTHER.  
Durchgehende Linie: Siphonaxanthin; Strich-Punkt-Linie: Siphonein und Siphonaxanthinacetat;  
Unterbrochene Linie: red. Siphonaxanthin und red. Siphonein.

**Hydroxylgruppen.** Für beide Pigmente sind auf Grund ihrer Polarität Hydroxylgruppen zu erwarten. Dies wird durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin bestätigt. Bei milder Acetylierung entstehen aus Siphonein ein Monoacetat und ein Diacetat (Abb. 1 Spur 5 und Abb. 3 Spur 3); die  $R_f$ -Änderungen entsprechen den an Testsubstanzen mit einer bzw.

<sup>5</sup> A. SEYBOLD und K. EGLE, *Planta* **29**, 114 (1938).

<sup>6</sup> H. H. STRAIN, *Ann. Priestly Lectures* **32** (1958).

<sup>7</sup> K. EGGER, *Planta* **58**, 664 (1962).

<sup>8</sup> K. EGGER und H. VOIGT, *Z. Pflanzenphysiol.* **53**, 64 (1965).

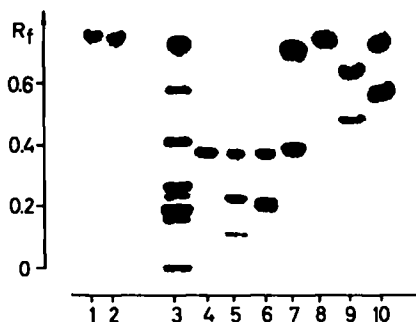


ABB. 1. SIPHONAXANTHIN, SIPHONIN, DERIVATE, VERGLEICHSSUBSTANZEN.  
Verteilungschromatogramm auf mit ungesättigten Triglyceriden imprägnierter Zellulosedünnschicht.<sup>7</sup> Laufmittel: Methanol:Aceton:Wasser = 30:10:3. Spur 1: Siphonin verseift; Spur 2: Siphonaxanthin; Spur 3: Syringa-Extrakt (von oben nach unten) Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Chlorophylle,  $\beta$ -Carotin; Spur 4: Siphonin; Spur 5: Siphonin Acetylierung; Spur 6: Siphonin Verätherung; Spur 7: Neoxanthin und Neoxanthindiacetat; Spur 8: Siphonaxanthin; Spur 9: Siphonaxanthin Acetylierung; Spur 10: Siphonaxanthin Verätherung.

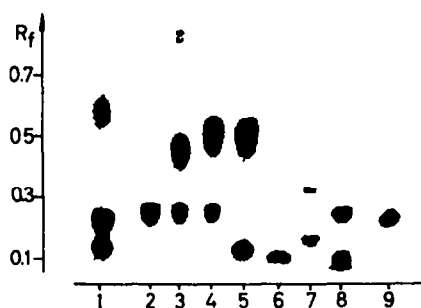


ABB. 3. SIPHONAXANTHIN, SIPHONIN, DERIVATE, VERGLEICHSSUBSTANZEN.  
Verteilungschromatogramm auf Polyamiddünnschicht.<sup>8</sup> Laufmittel: Petroläther: Methanol: Methyläthylketon = 40:5:5. Spur 1: (von oben nach unten) Kryptoxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin; Spur 2: Siphonin; Spur 3: Siphonin Acetylierung; Spur 4: Siphonin Verätherung; Spur 5: Neoxanthin und Neoxanthindiacetat; Spur 6: Siphonaxanthin; Spur 7: Siphonaxanthin Acetylierung; Spur 8: Siphonaxanthin Verätherung; Spur 9: Fucoxanthin.

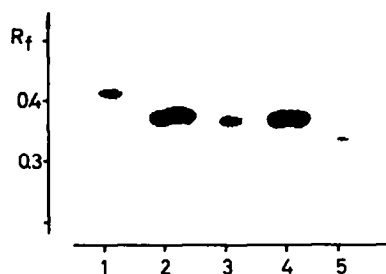


ABB. 4. SIPHONIN.  
Verteilungschromatogramm auf mit ungesättigten Triglyceriden imprägnierter Zellulosedünnschicht.<sup>7</sup> Laufmittel: Methanol:Aceton:Wasser = 30:10:3. Spur 1: Siphonaxanthinmonocaprinat; Spur 2 und Spur 4: Siphonin; Spur 3: Siphonaxanthinmonolaurat; Spur 5: Siphonaxanthinmonomyristat.

zwei Hydroxylgruppen ermittelten Werten. Dies beweist nicht-tertiäre Hydroxyle. Ein tertiäres Hydroxyl ist nicht vorhanden, da das Diacetat nicht weiter siliert werden kann. Das Siphonaxanthin läßt sich dreifach acetylieren (Abb. 1 Spur 9), besitzt also drei primäre oder sekundäre Hydroxylgruppen, wie Siphonein aber ebenfalls keine tertiären. Auffällig ist die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxyle von Siphonaxanthin bei der Veresterung: eines von diesen wird besonders schnell angegriffen, so daß ein definiertes Monoacetat erhalten werden kann. Das läßt eine primäre Hydroxylgruppe vermuten. Bei beiden Pigmenten ist ein Hydroxyl allylständig, wie Verätherungsansätze mit 0,01 N Äthanol-

TABELLE 1.  $R_f$ -WERTE UND ABSORPTIONSMAXIMA DES SIPHONEIN, SIPHONAXANTHIN UND VON VERGLEICHSSUBSTANZEN

Name	$R_f$ -werte			Absorption maxima (nm)*					
	I	II	III	IV		V		VI	
Siphonaxanthin	0,72	0,10	0,09	446	468 S	400	422	448	448
Siphonaxanthinmonoäther	0,55	0,26		446	468 S	400	422	448	448
Siphonaxanthinmonoacetat	0,61	0,16	0,14	450	473 S	400	422	448	455
Siphonaxanthindiaceat	0,47	0,34	0,35	450	473 S	400	422	448	455
Siphonaxanthintriaceat	0,31	0,63	0,73	450	473 S	400	422	448	455
Siphonaxanthinmonolaurat	0,36	0,27	0,18	450	473 S	400	422	448	455
Siphonein	0,36	0,27	0,18	450	473 S	400	422	448	455
Siphoneinmonoäther	0,21	0,55		450	473 S	400	422	448	455
Siphoneinmonoacetat	0,23	0,48	0,53	450	473 S	400	422	448	455
Siphoneindiaceat	0,12	0,89	0,90	450	473 S	400	422	448	455
Fucoxanthin	0,62	0,24	0,15	425 S	446 473	399	421	449	448
Lutein	0,39	0,26	0,22	421 S	445 472				
Neoxanthin	0,68	0,13	0,11	417	440 467				

\* S = Schulter.

- I.  $R_f$ -Werte, Verteilungschromatographie auf mit unges. Triglyceriden imprägn. Zellulosedünnschichten. Laufmittel: Methanol: Aceton: Wasser = 30:10:3.
- II.  $R_f$ -Werte, Polyamidchromatographie. Laufmittel: Petroläther: Methanol: Methyläthylketon = 40:5:5.
- III.  $R_f$ -Werte, Adsorptionschromatographie auf Kieselgel. Laufmittel: Benzol: Methanol = 50:2,5.
- IV. Absorptionsmaxima in Petroläther.
- V. Absorptionsmaxima der mit  $\text{NaBH}_4$  reduzierten Pigmente in Petroläther.
- VI. Absorptionsmaxima in Äthanol.

ischer Salzsäure (nach Grob und Pflugshaupt) zeigen. Es entsteht jeweils ein weniger polares Folgeprodukt (Abb. 1 Spur 6 und Abb. 3 Spur 4 bzw. Abb. 1 Spur 10 und Abb. 3 Spur 8). Die  $R_f$ -Änderung entspricht der Verätherung einer Hydroxylgruppe.

**Estergruppen.** Siphonaxanthin wird durch Alkali-Einwirkung nicht verändert, besitzt also keine spaltbaren Estergruppen. Dagegen wird, wie bereits von Strain<sup>1,2</sup> angegeben, Siphonein angegriffen, wobei Siphonaxanthin entsteht. Eine Hydroxylgruppe des polaren Siphonaxanthins ist im weniger polaren Siphonein mit einer Fettsäure verestert. Da ein Hydroxyl des Siphonaxanthins abweichende Eigenschaften (höhere Reaktionsgeschwindigkeit beim Verestern) besitzt, die den Hydroxylen des Siphoneins fehlen, muß es gerade diese Hydroxylgruppe sein, die die Fettsäure trägt.

**Epoxidgruppen.** Epoxidgruppen konnten nicht gefunden werden; die Pigmente reagieren auf dem Dünnschichtchromatogramm nicht mit Methanol/HCl mit der für Epoxide charakteristischen Blau- bzw. Grünfärbung, sondern behalten ihre ursprüngliche Farbe bei. Ebenso fehlen spektrale Änderungen.

**Carbonylgruppen.** Die Farbe der beiden Carotinoide und vor allem die wenig differenzierten Absorptionsspektren (Abb. 2) lassen Ketogruppen in Konjugation zum Doppelbindungssystem vermuten. Das Siphonein absorbiert—mit dem Auge schon deutlich sichtbar—längerwellig als das Siphonaxanthin. Beide Verbindungen können mit Natriumborhydrid in Äthanol reduziert werden und zeigen nun im Gegensatz zu den Spektren der nativen Pigmente übereinstimmende Absorptionskurven mit wesentlich mehr Feinstruktur (Abb. 2). Dieses einheitliche Reduktionsspektrum ist um 24 bzw. 28 nm gegenüber den nicht reduzierten Farbstoffen nach Blau verschoben. Das spricht in Analogie zum Fucoxanthin (Maximum 446 nm) und dessen Reduktionsprodukt (Hauptmaximum 421 nm) für das Vorhandensein von einer Ketogruppe in Konjugation. Nach kurzzeitiger Reduktion kann kein Zwischenprodukt gefunden werden, das auf zwei Carbonylfunktionen deuten würde.

**Kohlenstoff-Grundskelett.** Kettenverkürzung, wie sie z.B. bei Carotinalen vorliegt, wirkt sich gegenüber einer  $C_{40}$ -Verbindung mit gleichen funktionellen Gruppen durch starke Erhöhung des  $R_f$ -Wertes in der Verteilungschromatographie und geringer Erniedrigung des  $R_f$ -Wertes in der Adsorptionsschromatographie aus. Siphonaxanthin zeigt gegenüber Neoxanthin nur geringe  $R_f$ -Erhöhung im Triglyceridsystem und geringe  $R_f$ -Erniedrigung im Kieselgelsystem, wie für die Anwesenheit einer Ketogruppe an Stelle eines Epoxids zu erwarten ist. Zusätzliche Effekte treten nicht auf, so daß eine Kettenverkürzung nicht anzunehmen ist.

Ringöffnungen und Retrostrukturen können sicher ausgeschlossen werden, da diese im Polyamidsystem durch drastische  $R_f$ -Depressionen zu erkennen sind.<sup>8</sup> Siphonaxanthin jedoch läuft auf der Polyamid-Dünnschicht nur wenig unter Neoxanthin, wie für ein normales bizyklisches System zu fordern ist.

**Chromophores System.** Die Zahl der konjugierten Doppelbindungen läßt sich aus dem Reduktionsspektrum ableiten. Dieses hat sein Hauptmaximum in Petroläther bei 422 nm, was acht konjugierten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen entspricht (Flavoxanthin = furanoid umgelagertes Luteinepoxid und furanoid umgelagertes Neoxanthin mit acht Doppelbindungen in der Kette haben ihr Hauptmaximum ebenfalls um 422 nm). Das chromophore System besteht folglich bei Siphonaxanthin und Siphonein aus acht konjugierten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen und einer konjugierten Carbonylgruppe.

Da nur eine Carbonylfunktion in den Molekülen enthalten ist, die Reduktion die Spektren jedoch um 24 bzw. 28 nm nach Blau verschiebt, ist wiederum eine Analogie mit Fucoxanthin gegeben (Verschiebung um 27 nm). Bei Ketocarotinoiden, deren konjugierte Ketogruppen in den Ringen liegen wie bei Echinenon, Canthaxanthin, Astaxanthin etc., wird das Hauptmaximum nach Reduktion höchstens um 20 nm verschoben. Bei Fucoxanthin liegt die Ketogruppe nicht in den Ringen, sondern in der Kette, so daß auch bei Siphonaxanthin und Siphonein die Ketogruppe in der Kette lokalisiert scheint. Ähnliche Werte werden auch für Capsanthin/Capsanthol gefunden.<sup>10</sup> Da konjugierte Doppelbindungen in der Kette vorliegen, kann die Carbonylgruppe nur an  $C_7$  oder  $C_8$  lokalisiert werden.  $C_7$  würde eine Retrostruktur bedingen, die vor dem zweiten Ringenden müßte, so daß C- als  $CH_2$ -Gruppe vorläge.

<sup>9</sup> E. C. GROB und R. P. PELUGHAUPT, *Helv. Chim. Acta* **45**, 1592 (1962).

<sup>10</sup> A. L. CURL, *Agr. Food Chem.* **10**, 504 (1962).

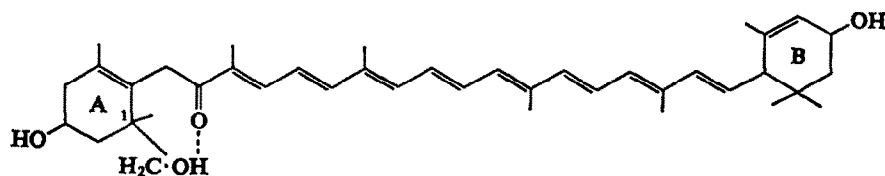
Diese Struktur ist äußerst unwahrscheinlich und auch durch die chromatographischen Daten widerlegt. Wir geben daher der Oxogruppe an  $C_8$  den Vorzug.

**Differenz der Spektren der nativen Pigmente.** Siphonaxanthin und Siphonein besitzen das gleiche chromophore System. Es gilt nun noch eine Erklärung für die geringen Unterschiede beider Spektren von 4 nm zu finden. Beide Verbindungen unterscheiden sich dadurch, daß die besonders reaktionsfähige, wohl primäre, Hydroxylgruppe im Siphonaxanthin frei, im Siphonein verestert vorliegt. Siphonaxanthin absorbiert in kürzeren Wellenlängen als Siphonein. Das weist auf eine innermolekulare Wasserstoffbrücken-Bildung zwischen diesem Hydroxyl und der konjugierten Ketogruppe, die den hypsochromen Effekt bewirkt. Im Siphonein und dem durch partielle Acetylierung zugängliche Siphonaxanthinmonoacetat (s.o.) ist die Hydroxylgruppe durch die Esterbindung blockiert, eine Wasserstoffbrücke kann sich nicht mehr ausbilden. Beide Verbindungen absorbieren längerwellig (Tabelle 1 und Abb. 2). Die vollständige Acetylierung des Siphonaxanthins übt keinen weiteren Effekt auf das Spektrum aus, wie zu erwarten. Auch durch Reduktion der Ketogruppe kann die Wasserstoffbrücke aufgehoben werden, reduziertes Siphonaxanthin und reduziertes Siphonein zeigen das gleiche Spektrum (Tabelle 1 und Abb. 2).

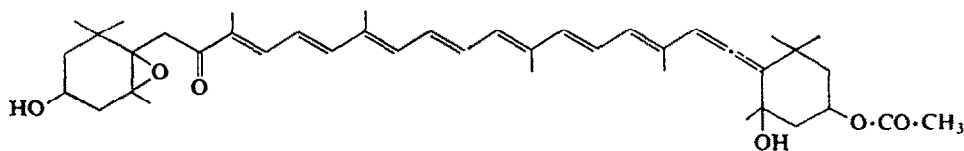
**Lage der aktiven Hydroxylgruppe.** Eine  $\alpha$ -Stellung der aktiven Hydroxylgruppe zur Ketogruppe (an  $C_7$ ) kann ausgeschlossen werden, da ein solches Hydroxyl bei der Verseifung zu einer zweiten Ketogruppe oxydiert wird, wie aus Astaxanthin und ähnlichen Verbindungen bekannt ist. Außerdem hat Siphonaxanthin keine sauren Eigenschaften, wie für diese Struktur zu erwarten wäre. Dies weist wiederum darauf hin, daß sich die Carbonylgruppe nicht in einem Ring, sondern in der Kette befindet. Platz für die Hydroxylgruppe bei der Voraussetzung einer bizyklischen Grundstruktur, die durch die chromatografischen Befunde nahegelegt wird, bleibt nur an einer der Methylgruppen an  $C_1$ ,  $C_5$  oder  $C_9$ , die sich alle in die entsprechende Lage zur Carbonylgruppe bringen lassen. Hydroxymethylgruppen an  $C_5$  oder  $C_9$  wären allerdings allylständig; Siphonaxanthin müßte in diesen Fällen mit 0,01 N äthanolischer HCl einen Diäther ergeben. Dies ist aber eindeutig nicht der Fall. Damit gewinnt die Hydroxylierung einer der nicht unterscheidbaren Methylgruppen an  $C_1$  an Wahrscheinlichkeit, wenn sich auch ein Hydroxymethyl an  $C_9$  nicht vollständig ausschließen läßt.

**Isolierte Doppelbindungen, Stellung der sekundären Hydroxyle.** In Analogie zu den übrigen Primärxanthophyllen nehmen wir an, daß die beiden sekundären Hydroxylgruppen sich an  $C_3$  und  $C_3'$  befinden. Da eine dieser Gruppen allylständig ist, muß in einem Ring eine Doppelbindung zwischen  $C_4$  und  $C_5$ , wie in  $\alpha$ -Carotin, vorliegen. Dafür kommt nur Ring B in Frage, da sonst die Zahl der konjugierten Doppelbindungen zu groß würde und ein völlig hydriertes Ringsystem ohne Sauerstofffunktion an  $C_5$  oder  $C_6$  bisher nicht beobachtet wurde. In Ring A ist aus entsprechenden Gründen eine Doppelbindung zwischen  $C_5$  und  $C_6$  zu erwarten, die allerdings ohne Auswirkung auf das chromophore System bleibt.

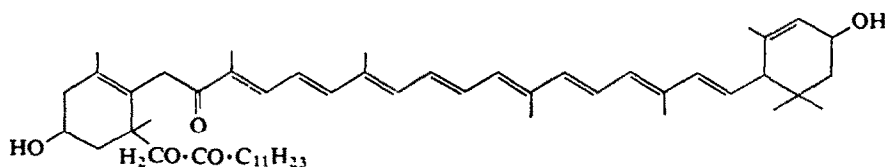
**Strukturvorschlag.** Wir schlagen als Arbeitshypothese für den weiteren Strukturbeweis des Siphonaxanthins die folgende, mit den bisher ermittelten Eigenschaften in Einklang stehende Formel vor, die eine gewisse Verwandtschaft zu Fucoxanthin<sup>11</sup> erkennen läßt:



(I) Siphonaxanthin (Vorschlag)

(II) Fucoxanthin<sup>11</sup>

*Die Säurekomponente des Siphoneins.* Zur Klärung der Säurekomponente des Siphoneins wurde Siphonaxanthin mit Carbonsäurechloriden behandelt. Dabei wird die primäre, im Siphonein veresterte Hydrogruppe—wie schon erwähnt—bevorzugt, so daß definierte Siphonaxanthinmonoester erhalten werden können. In Abb. 4 ist das Ergebnis dargestellt. Das Siphonaxanthinlaurat läuft im Verteilungschromatogramm mit Siphonein gleich, während der  $R_f$ -Wert des Caprinats zu hoch, der des Myristats zu tief ist. Eine ungesättigte oder oxydierte (Hydroxy-, Epoxysäure) Fettsäure ist auszuschließen, da eine Depression des  $R_f$ -Werts im Adsorptionsschromatogramm auf Kieselgel, die eine solche Säure zur Folge hätte, fehlt. Damit ist Siphonein gleich Siphonaxanthinlaurat (III).



(III) Siphonein=Siphonaxanthinlaurat (Vorschlag)

Auf die Verbreitung des Siphonaxanthins und Siphoneins und auf ihre chemotaxonomische Bedeutung wird an anderer Stelle eingegangen.<sup>12</sup>

*Anerkennung.*—Das Kultusministerium von Baden-Württemberg stellte uns dankenswerterweise einen Arbeitsplatz an der Zoologischen Station in Neapel zur Verfügung. Der Leitung der Zoologischen Station Neapel und Herrn Dr. K. Beth danken wir für großzügige Unterstützung. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Untersuchungen durch Sachmittel gefördert.

<sup>11</sup> R. BONNET, A. A. SPARK, I. L. TEE und B. C. L. WEEDON, *Proc. Chem. Soc.* 419 (1964).

<sup>12</sup> H. KLEINIG, in Vorbereitung.