

SHORT COMMUNICATION

DIE KETOCAROTINOIDE IN *ADONIS ANNUA* L.—II. ZUR STRUKTUR DER ESTER

KURT EGGER und HANS KLEINIG

Botanisches Institut der Universität Heidelberg

(Received 26 July 1966)

Zusammenfassung—Die Fettsäurekomponenten der Ketocarotinoideester in *Adonis annua* L. (Ester des Astaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3,3'-Dihydroxyechineon und 3-Hydroxycanthaxanthin) werden untersucht. Myristinsäure ist Hauptkomponente bei den vier Pigmenten, daneben treten noch Ester der Palmitin-, Laurin-, Caprinsäure und einer ungesättigten Säure auf.

Abstract—The fatty acid compounds of the ketocarotenoid esters of *Adonis annua* L. (esters from astaxanthin, 3-hydroxyechinenone, 3,3'-dihydroxyechinenone and 3-hydroxycanthaxanthin) have been investigated. Myristic acid is the main compound, but the esters contain also plamitic, lauric, capric acid and an unsaturated fatty acid in minor concentration.

Die tiefrote Farbe der Blütenblätter von *Adonis annua* wird durch Ketocarotinoide hervorgerufen.^{1,2} Es handelt sich um die vier Hydroxyketopigmente 3,3'-Dihydroxycanthaxanthin=Astaxanthin, 3-Hydroxyechinenon,³ 3,3'-Dihydroxyechinenon=Adonixanthin und 3-Hydroxycanthaxanthin=Adonirubin, zwei zuvor im Pflanzenreich unbekannte Farbstoffe. Diese Pigmente liegen in *Adonis* als Fettsäureester vor und können auf Kieselgel sehr gut fraktioniert werden. Die einzelnen Fraktionen lassen sich auf Zellulose-Dünnenschichten, die mit Paraffinöl imprägniert sind, rechromatographieren;⁴ dabei spalten die auf Kieselgel einheitlichen Banden in mehrere Komponenten auf. Dies lässt sich als zweidimensionales Chromatogramm schematisch darstellen (Abb. 1).

Die Kieselgel-Fraktionen ergeben bei der Verseifung jeweils nur ein einziges rotes Ketopigment, und zwar die oxydierten Formen (Astacin, Euglenanon,³ Dehydroadonixanthin und Dehydroadonirubin).¹ Die Aufspaltung im Verteilungschromatogramm (Paraffinöl-imprägnierte Zellulose) beruht nach unseren Analysen an anderen Objekten auf Variationen in den Fettsäureketten, deren Untersuchung im folgenden beschrieben werden soll.

Eine direkte Analyse der Fettsäuren nach Verseifung ist nicht möglich, da ein stets vorhandener hoher Überschuss an farblosen Lipiden das Ergebnis verfälschen kann. Indirekte Methoden müssen daher herangezogen werden. Die Synthese bestimmter Ester aus den freien Carotinoiden und definierten Carbonsäurechloriden, die bei der Aufklärung von Luteinestern in *Tagetes* und *Tropaeolum*⁵ oder der gesamten Carotinoidester in *Tussilago*

¹ K. EGGER, *Phytochem.* **4**, 609 (1965).

² A. SEYBOLD, *Sitzber. Heidelberg Akad. Wiss., Math. Naturw. Kl. Abhandl.* **2** (1953/54).

³ N. I. KRINSKY und T. H. GOLDSMITH, *Arch. Biochim. Biophys.* **91**, 271 (1960).

⁴ K. EGGER, *Planta* **58**, 664 (1962).

⁵ K. EGGER, *Ber. Deut. Bot. Ges.* **77**, (145) (1964).

und *Forsythia*⁶ zum Ziel führte, kann hier nicht angewendet werden. Freies Astaxanthin oder Adonirubin sind kaum zugänglich, da bei der Verseifung der nativen Ester Tetra- bzw. Triketoverbindungen, das Astacin und Dehydroadonirubin entstehen. Um trotzdem zu einem Vergleich mit synthetischen Estern zu kommen, haben wir einen anderen Weg gewählt. Man kann die Ester (Astaxanthindiester, Abb. 1 Zone 8) mit NaBH_4 in Äthanol reduzieren, ohne daß die Fettsäuren dabei abgespalten werden. Die Verbindungen werden dadurch polarer, die R_f -Werte im Verteilungschromatogramm wesentlich erhöht (Abb. 2 Spur 2). Die Reduktionsprodukte enthalten nun zwei allylständige Hydroxylgruppen, die mit 0,01 N äthanolischer HCl nach *Grob* und *Pflugshaupt*⁷ in Äthyläther überführt werden können.

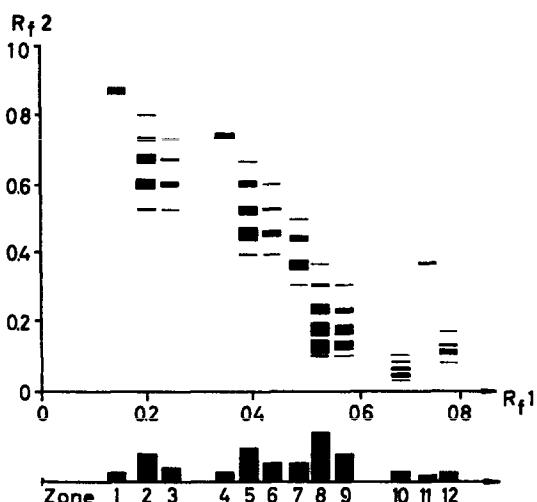


ABB. 1. KETOCAROTINOID-ESTER DER *Adonis*-BLÜTENBLÄTTER, SCHEMATISCH ALS ZWEIDIMENSIONALES CHROMATOGRAMM DARGESTELLT. ABSZISSE: ADSORPTIVE TRENNUNG IN 12 ZONEN AUF KIESELGEL-DÜNNSCHICHT MIT PETROLÄTHER: ACETON = 5:1 (R_f 1). ORDIINATE: VERTEILUNGSCROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER 12 ZONEN NACH RECHROMATOGRAPHIE AUF PARAFFINÖL-IMPRÄGNIERTER ZELLULOSE-DÜNNSCHICHT MIT ACETON: METHANOL: WASSER = 15:5:1 (R_f 2).

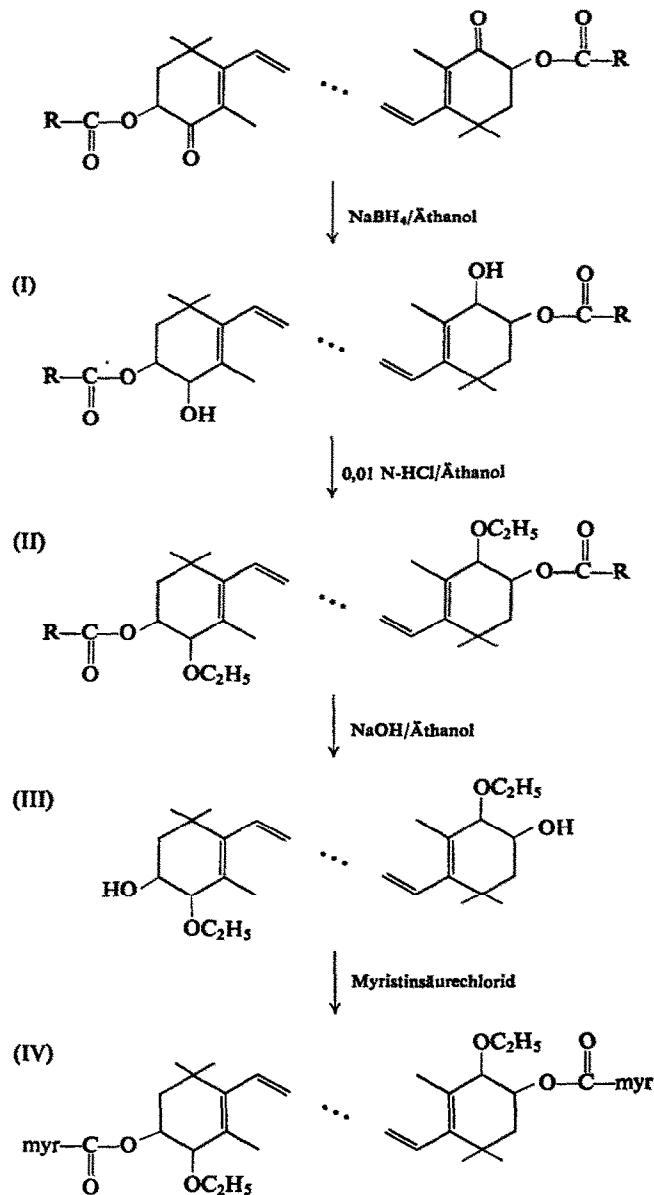
Zone 1: solitärer Astaxanthinmonoester; Zone 2: Astaxanthinmonoester trans; Zone 3: Astaxanthinmonoester cis; Zone 4: solitärer Adonirubinester; Zone 5: Adonirubinester trans; Zone 6: Adonirubinester cis; Zone 7: Astaxanthindiester mit gemischten Fettsäuren; Zone 8: Astaxanthindiester trans; Zone 9: Astaxanthindiester cis; Zone 10: Adonixanthindiester; Zone 11: solitärer Hydroxy-Echinonenester; Zone 12: Hydroxy-Echinonenester.

Ein Teil des Äthers (II) wird aufbewahrt, der Hauptteil wird jedoch mit äthanolischem Alkali verseift, wobei die Fettsäuren abgespalten werden, die Ätherbindungen aber erhalten bleiben. Das Verseifungsprodukt (III) kann nun mit definierten Carbonsäurechloriden verestert werden. Man erhält einen bestimmten Diester (in diesem Fall das Dimyristat), dessen beide allylständigen OH-Gruppen veräthert sind. Dieser kann nun mit den Diestern (II) verglichen werden, deren beide allylständigen OH-Gruppen ebenfalls veräthert sind. II spaltet wie das Ausgangsmaterial aus *Adonis* auf dem Verteilungschromatogramm in eine Reihe von Komponenten auf, wobei der ΔRM -Wert zweier Flecke dem Wert entspricht, der für eine Änderung der C-Zahl in einer der beiden Fettsäuren um 2 gilt. Das synthetische Dimyristat (IV) deckt sich mit dem stärksten Fleck von II, der dem stärksten Fleck der nativen

⁶ H. KLEINIG, unveröffentlichte Ergebnisse.

⁷ E. C. GROB und R. PFLUGSHAUPT, *Helv. Chim. Acta* **45**, 1592 (1962).

Astaxanthindiester (Abb. 1 Zone 8; Abb. 2 Spur 1 mit einem Pfeil gekennzeichnet) entspricht. Der schwache Fleck darunter wäre damit der gemischte Myristat-Palmitat-Ester, der Fleck darüber der gemischte Laurat-Myristat-Ester. Danach folgen das Dilaurat, das Laurat-



Caprinat und das Dicaprinat. Somit ist wahrscheinlich gemacht, daß die Adonisester eine Reihe gesättigter homologer Fettsäuren enthalten. In Abb. 2 Spur 3 bildet das Adonirubin-Myristat die stärkste Komponente. Von Adonirubin gibt es nur Monoester, da nur eine Hydroxylgruppe zur Verfügung steht. Der Fleck unter dem Myristat ist folglich das Palmitat,

der ΔRM -Wert gilt wieder für einen Unterschied von 2 CH₂-Einheiten in der Fettsäure. Die Flecke über dem Myristat sind das Laurat und Caprinat.

Neben Astaxanthindiestern befinden sich auch Astaxanthinmonoester im *Adonis*-Extrakt. Es gilt hier nun zu klären, ob diese Monoester in einer Triketo- oder in einer Diketo-monohydroxy-Form vorliegen. Durch einen Acetylierungsansatz mit Essigsäureanhydrid in Pyridin konnte gezeigt werden, daß der Monoester Triketostruktur besitzt. Auf dem Chromatogramm wurde im Vergleich zum nativen Monoester kein Acetatsprung erhalten, der eine ursprünglich freie OH-Gruppe angezeigt hätte.

Somit können die in Abb. 1 dargestellten Hauptfraktionen 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12 des *Adonis*-Extraktes in ihrer Fettsäurezusammensetzung als geklärt betrachtet werden. Die Zonen 1, 4, 7, 11 sind jedoch ebenfalls Ester von Astaxanthin, Adonirubin, Astaxanthin und Hydroxyechinenon, wie Verseifungen zeigen. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß es sich hierbei evtl. um die Ester einer ungesättigten Fettsäure handelt.¹ Spur 1, 4, 11 sind Monoester dieser Fettsäure mit Astaxanthin, Adonirubin und Hydroxyechinenon, während Zone 7 Astaxanthindiester zeigt, deren eine OH-Gruppe mit dieser Fettsäure, die andere mit den homologen gesättigten Säuren verestert sind. In der Verseifung des Gesamtextraktes läßt sich tatsächlich eine ungesättigte Fettsäure mit einem Rf-Wert ähnlich der Linolensäure nachweisen. Es wurde aber oben schon darauf hingewiesen, daß eine Fettsäurebestimmung aus dem Gesamtextrakt keine sicheren Ergebnisse liefert.

Aus statistischen Gründen sind noch ein Astaxanthindiester und ein Adonixanthindiester, deren beide OH-Gruppen mit der hypothetischen Fettsäure besetzt sind, und Adonixanthinmonoester als Komponenten des Farbstoffgemisches zu erwarten. Diese konnten jedoch nicht als reine Fraktionen erhalten werden, da sie sich chromatographisch vermutlich wie die Astaxanthindiester verhalten und durch diese ihrer geringeren Konzentration wegen verdeckt werden.

Wie bei vielen Carotinoidestern aus Chromoplasten, z.B. in *Physalis*,⁸ *Tagetes* und *Tropaeolum*,⁵ *Brachychilus*,⁹ *Tussilago* und *Forsythia*⁶ liegen auch bei *Adonis* geradzahlige gesättigte Fettsäuren vor. Myristinsäure bildet wie bei *Tussilago* und *Forsythia* die Hauptkomponente, es wurden weiter Palmitin-, Laurin- und Caprinsäure gefunden. Außerdem wird in *Adonis* noch eine ungesättigte Säure vermutet. Eine solche Verbindung—die dreifach ungesättigte Linolensäure—is häufig Bestandteil in Herbstlaub-Estern (*Acer*^{10, 11} *Aesculus*,¹² *Ginkgo* und viele andere).

⁸ P. KARRER und E. LEUMANN, *Helv. Chim. Acta* **34**, 445 (1951).

⁹ K. EGGER und H. KLEINIG, *Z. Pflanzenphysiol.* **55**, 224 (1966).

¹⁰ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Helv. Chim. Acta* **46**, 2411 (1963).

¹¹ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Helv. Chim. Acta* **48**, 1194 (1965).

¹² K. EGGER und U. SCHWENKER, *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 407 (1966).