

## KETOCAROTINOIDESTER IN *ACETABULARIA MEDITERRANEA* LAM.

HANS KLEINIG und KURT EGGER

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Deutschland

(Eingegangen 26 Juli 1966)

**Zusammenfassung**—Die Siphonale *Acetabularia mediterranea* Lam. enthält zwei Gruppen von Carotinoiden: 1. die aus den Blättern der höheren Pflanzen bekannten Farbstoffe ( $\beta$ -Carotin, Lutein, Luteinepoxid, Violaxanthin, Neoxanthin), 2. die Ketohydroxycarotinoide Astaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3,3'-Dihydroxyechinenon, 3-Hydroxycanthaxanthin und ein noch unbekanntes gelbes Ketopigment. Diese Ketopigmente liegen in der Alge nur in mit höheren Fettsäuren veresterter Form vor im Gegensatz zu den Xanthophyllen, die nur unverestert zu finden sind.

**Abstract**—The carotenoids of the marine alga *Acetabularia mediterranea* Lam. have been investigated. There are two groups of pigments: 1. the carotenoids  $\beta$ -carotene, lutein, luteinepoxid, violaxanthin, neoxanthin known from the leaves of higher plants, 2. the ketohydroxycarotenoids astaxanthin, 3-hydroxyechinenone, 3,3'-dihydroxyechinenone, 3-hydroxycanthaxanthin and an unknown yellow pigment. The former group is unesterified whereas the latter group has been found only in an esterified form with fatty acids.

Die siphonale Grünalge *Acetabularia mediterranea* Lam. ist wegen ihrer einkernigen Riesenzelle ein beliebtes Versuchsstoffobjekt in der Pflanzenphysiologie (Hämmerling und seine Schule). Richter,<sup>1</sup> der das Verhalten der Plastidenpigmente in kernlosen Zellen von *Acetabularia* untersuchte, erwähnt neben der normalen Carotinoidausstattung ( $\beta$ -Carotin, Lutein, Luteinepoxid, Violaxanthin, Neoxanthin) ein Astaxanthinderivat.

Bei unseren Untersuchungen der Carotinoide in *Acetabularia* zeigte es sich nun, daß außer Astaxanthin noch andere Ketocarotinoide in der Alge enthalten sind. Verbindungen dieser Art sind eine ganze Reihe bekannt, die zum Vergleich herangezogen werden können: die hydroxylfreien Echinenon<sup>2, 3</sup> und Canthaxanthin,<sup>4</sup> die in Mangelkulturen verschiedener Grünalgen als Sekundärkarotinoide nachgewiesen wurden; die hydroxylhaltigen 3-Hydroxyechinenon,<sup>5, 6</sup> 3,3'-Dihydroxyechinenon = Adonixanthin<sup>6</sup> und 3-Hydroxycanthaxanthin.<sup>6</sup> Astaxanthin ist das entsprechende 3,3'-Dihydroxycanthaxanthin. Diese vier hydroxylhaltigen Ketopigmente kommen in den Blüten von *Adonis annua* zusammen vor.<sup>6</sup> Die Verbindungen sind in der Pflanze zunächst verestert. Nach Verseifung liegen sie in der Ketoform vor. Alle hier genannten Ketocarotinoide leiten sich vom  $\beta$ -Carotin her, d.h. sie besitzen nach Reduktion der Ketogruppen durch NaBH<sub>4</sub> zu Hydroxylgruppen das gleiche chromophore System wie  $\beta$ -Carotin.

### KIESELGEL-FRAKTIONIERUNG DES NATIVEN FARBSTOFFGEMISCHS

Die Ester der Ketocarinoide lassen sich bereits aus dem Petroläther-Gesamtextrakt durch fraktionierte Chromatographie an Kieselgelsäule gewinnen. Man erhält folgende Fraktionen Tabelle 1.

<sup>1</sup> G. RICHTER, *Planta* **52**, 259 (1958).

<sup>2</sup> G. DERSCH, *Flora* **149**, 566 (1960).

<sup>3</sup> F. C. CZYGAN, *Z. Naturforsch* **21b**, 197 (1966).

<sup>4</sup> F. C. CZYGAN, *Experientia* **20**, 573 (1964).

<sup>5</sup> N. I. KRINSKY und T. H. GOLDSMITH, *Arch. Biochim. Biophys.* **91**, 271 (1960).

<sup>6</sup> K. EGGER, *Phytochem.* **4**, 609 (1965).

TABELLE 1. *Acetabularia* KETOCAROTINOIDESTER, FRAKTIONIERUNG AUF KIESELGEL

Fraktion Nr.	Identifiziert als	Relative Konzentration der Ketocarotinoide in %
0	$\beta$ -Carotin	
1	Hydroxyechinenonester	2
2	Adonixanthinester	2
3	gelbes Ketocarotinoid	5
4	Astaxanthinester ( <i>cis</i> )	12
5	Astaxanthinester ( <i>trans</i> )	34
6	Adonirubinester ( <i>cis</i> )	5
7	Adonirubinester ( <i>trans</i> )	14
8	Astaxanthinmonoester ( <i>cis</i> )	6
9	Astaxanthinmonoester ( <i>trans</i> )	20
10	Chlorophylle und freie Xanthophylle	

## IDENTIFIZIERUNG DER FARBSTOFFE IN DEN FRAKTIONEN 1 BIS 9

*Fraktion 1*

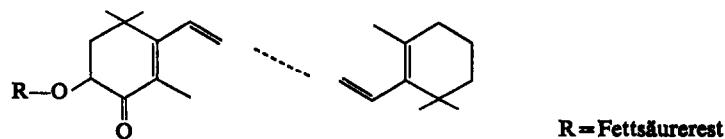
Der Farbstoff zeigt in Lösung orangerote Farbe, beim Trocknen auf Zellulose/Paraffinöl-Chromatogrammen tritt eine plötzliche Farbvertiefung ein. Diese Farbänderung und das undifferenzierte eingipflige Spektrum sind für Ketocarotinoide, deren Ketogruppen in Konjugation stehen, charakteristisch. Nach Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  zeigt das Absorptionspektrum mehr Feinstruktur und ist mit dem des Zeaxanthin oder  $\beta$ -Carotin  $\pm$  identisch. (Tabelle 2). Durch Natriumalkoholat-Einwirkung entsteht ein polares Verseifungsprodukt (Tabelle 2), das ebenfalls reduzierbar ist und das gleiche Spektrum ergibt wie der Ester.

TABELLE 2. EIGENSCHAFTEN DER KETOCAROTINOIDE AUS *Acetabularia* UND *Adonis*; VERGLEICHSSUBSTANZEN

	I	II	III	IV	V	VI
Euglenanonester	0,90	0,20 (0,22)	466	450,474	0,70	0,25
Adonixanthinester	0,78	0,07 (0,08)	465	450,476	0,27	0,49
Astaxanthinester <i>cis</i>	0,40	0,23 (0,26)	471	444,471	0,30	0,45
Astaxanthinester <i>trans</i>	0,34	0,23 (0,26)	478	450,478	0,30	0,45
Adonirubinester	0,23	0,49 (0,52)	477	450,477	0,56	0,43
Astaxanthinmonoester <i>cis</i>	0,13	0,59 (0,62)	471	444,470	0,30	0,45
Astaxanthinmonoester <i>trans</i>	0,08	0,59 (0,62)	478	450,477	0,30	0,45
gelbes Ketopigment ( <i>Acetab.</i> )	0,75	0,20	421	400	0,15	0,68
Echinonon	—	—	466	450,474	0,98	0,23
Canthaxanthin	—	—	477	450,475	0,65	0,38
Zeaxanthin	—	—	450,478	—	0,29	0,53

- I.  $R_f$ -Werte der Ester auf Kieselgel-Dünnsschicht. Laufmittel Petroläther (100–140): Aceton = 50:1,5.
- II.  $R_f$ -Werte der Ester auf Zellulose-Dünnsschichten, die mit Paraffinöl imprägniert wurden. Laufmittel Aceton: Methanol = 2:1 1% Wasser. Es ist jeweils der  $R_f$ -Wert der Hauptkomponente der *Acetabularia*-Ester angegeben. In Klammern steht der Wert der *Adonis*-Ester (Myristat).
- III. Absorptionsmaxima in nm, Lösungsmittel Äthanol.
- IV. Absorptionsmaxima der reduzierten Pigmente in nm, Lösungsmittel Äthanol.
- V.  $R_f$ -Werte der verseiften freien Pigmente auf Polyamid-Dünnsschicht. Laufmittel Petroläther (100–140): Methanol: Methyläthylketon = 8:1:1.
- VI.  $R_f$ -Werte der verseiften freien Pigmente auf Zellulose-Dünnsschicht, die mit flüssigen Triglyceriden imprägniert wurde. Laufmittel Aceton: Methanol: Wasser = 15:5:2.

Die  $R_f$ -Werte bringen Fraktion 1 in enge Verbindung zu den Hydroxyechinenonestern aus *Adonis*. Im Paraffinöl/Zellulose-Chromatogramm deckt sich der Hauptester aus *Acetabularia* jedoch nicht genau mit einem Adonisester, er liegt vielmehr eine Fleckbreite unter der Hauptkomponente aus *Adonis*. Das Verseifungsprodukt von Fraktion 1 ist chromatographisch und spektral mit Euglenanon, dem Verseifungsprodukt der Hydroxyechinenonester aus *Adonis*, identisch. Die Differenz der Ester in Paraffinöl/Zellulose-Chromatogramm wird durch die Fettsäurekomponenten hervorgerufen (siehe unten: Zur Struktur der Ester). Auch die freien Reduktionsprodukte aus beiden Pflanzen stimmen überein, also gilt: *Fraktion 1 enthält Hydroxyechinenonester*.



#### *Fraktion 2*

Die auf Kieselgel einheitliche Fraktion liefert ein Verseifungsprodukt, das wesentlich polarer ist als das aus Fraktion 1. Umgekehrt sind die ursprünglichen Ester unpolarer als die aus Fraktion 1. Dieses Verhalten erinnert an die Adonixanthindiester aus *Adonis*. Auch die durch Verseifung und Reduktion zugänglichen Verbindungen erweisen sich mit Dehydroadonixanthin und dessen Reduktionsprodukt chromatographisch und spektral als identisch. Die Ester decken sich wiederum nicht genau mit den Adonisestern im Paraffinöl/Zellulose-System. Somit *enthält Fraktion 2 Adonixanthindiester*.



#### *Fraktion 3*

Fraktion 3 ist gelb gefärbt im Gegensatz zu allen anderen Fraktionen. Alkalieinwirkung führt zu einer polareren Substanz, deren  $R_f$ -Wert erstaunlich hoch liegt (Tabelle 2). Es liegen also auch hier Ester vor. Und zwar handelt es sich um Diester, da bei milder Hydrolyse Monoester und der freie Farbstoff entstehen. Beim Trocknen der Chromatogramme ist wieder eine Farbvertiefung von gelb nach leicht orange zu beobachten. Auch ist der Farbstoff reduzierbar, das Spektrum zeigt nach Reduktion mehr Feinstruktur, so daß der Verdacht, daß hier ein gelbes Ketopigment gefunden wurde, bestätigt wird (Abb. 1, Tabelle 2). Die Struktur des Farbstoffs konnte noch nicht geklärt werden, gelbe Ketocarotinoide mit konjugierter Ketogruppe sind in der Natur bisher nicht aufgefunden worden.

*Fraktion 3 enthält ein unbekanntes gelbes Ketocarotinoid.*

#### *Fraktion 4 (siehe unten)*

#### *Fraktion 5*

Diese tiefrote Fraktion enthält die Hauptmenge der Ketopigmente. Das Spektrum der auf dem Kieselgelchromatogramm einheitlichen Fraktion ist mit dem der Astaxanthindiester

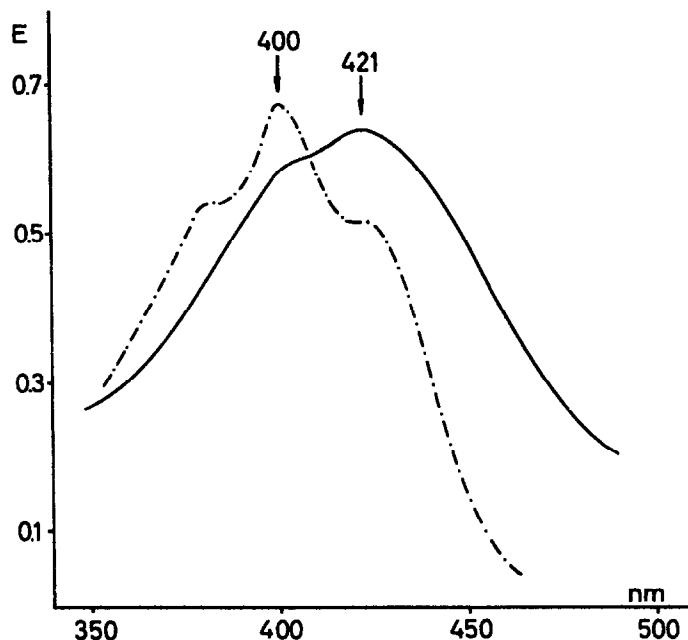
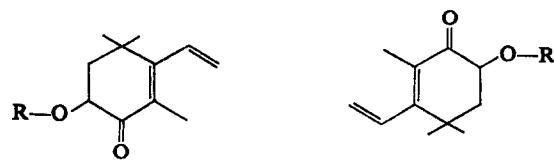


ABB. 1. ABSORPTIONSSPEKTREN DES GELBEN KETOCAROTINOIDS AUS *Acetabularia* (FRAKTION 3) IN ÄTHANOL. DURCHGEHENDE LINIE: NATIVES PIGMENT, UNTERBROCHENE LINIE: REDUZIERTES PIGMENT.

aus *Adonis* und *Chlorella* (Mangelkultur) identisch; ebenso stimmen die  $R_f$ -Werte im Kieselgeldünnschichtchromatogramm überein. Auf der Zellulose/Paraffinöl-Schicht spaltet die Fraktion 5 in eine Haupt- und 3 bis 4 Nebenkomponenten auf, die alle identische Spektren haben. Auch das Verseifungsprodukt besitzt die gleichen chromatographischen und spektralen Eigenschaften wie die verseiften Astaxanthindiester = Astacin aus *Adonis* (Tabelle 2). Einen weiteren Identitätsbeweis liefert das Reduktionsprodukt, das Absorptionsspektrum gleicht dem des Zeaxanthin. Auf der Zellulose/Paraffinöl-Schicht fällt wieder das Zurückbleiben der Ester aus *Acetabularia* gegenüber den Estern aus *Adonis* um etwa eine Fleckbreite auf (Abb. 2). Aus den genannten Befunden folgt: *Fraktion 5 enthält Astaxanthindiester*.



*Fraktion 6* (siehe unten)

*Fraktion 7*

Dieser Farbstoff besitzt das gleiche chromophore System wie Astaxanthin. Bei Verseifung allerdings entsteht ein weniger polares Produkt, das im Polyamidchromatogramm (Tabelle 2) einen wesentlich höheren  $R_f$ -Wert erreicht als Astacin; es liegt zwischen Astacin und Canthaxanthin. Diese Daten weisen auf das erstmals in *Adonis* gefundene Adonirubin. Die Identität beider wird durch folgende Befunde bestätigt: Das Verseifungsprodukt aus

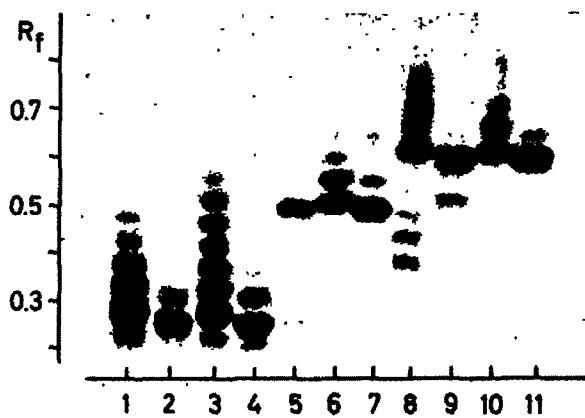
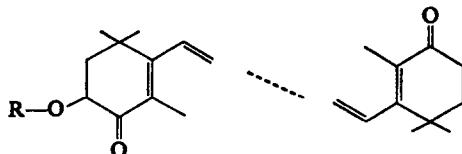


ABB. 2. VERTEILUNGSCROMATOGRAMM AUF PARAFFINÖL-IMPRÄGNIERTER ZELLULOSE-DÜNNSCHEIHT,  
LAUFMITTEL ACETON: METHANOL: WASSER = 15:5:1.

Spur 1: Adonis Astaxanthindiester *cis*, Spur 2: Acetabularia Astaxanthindiester *cis*, Spur 3: Adonis Astaxanthindiester *trans*, Spur 4: Acetabularia Astaxanthindiester *trans*, Spur 5: Acetabularia Adonirubinester *cis*, Spur 6: Adonis Adonirubinester *trans*, Spur 7: Acetabularia Adonirubinester *trans*, Spur 8: Adonis Astaxanthinmonoester *cis*, Spur 9: Acetabularia Astaxanthinmonoester *cis*, Spur 10: Adonis Astaxanthinmonoester *trans*, Spur 11: Acetabularia Astaxanthinmonoester *trans*. In jeder Spur erscheinen mehrere Flecke, die Estern verschiedener Fettsäuren entsprechen (Adonis: Hauptfettsäuren Myristinsäure und Laurinsäure, Acetabularia: unbekannte Fettsäuren).

Fraktion 7 und Dehydroadonirubin aus *Adonis* besitzen gleiche  $R_f$ -Werte auf Zellulose/Triglycerid-Schichten; die Reduktionsprodukte beider laufen gleich auf Polyamid und liegen zwischen Zeaxanthin und dem reduzierten Astacin, wie für ein 3,3',4-Trihydroxy- $\beta$ -Carotin zu erwarten ist. Daraus folgt: *Fraktion 7 enthält Adonirubinester*.



**Fraktion 8 (siehe unten)**

**Fraktion 9**

In Farbe und Spektrum stimmt diese Fraktion mit Fraktion 5 völlig überein, ebenso sind die Verseifungsprodukte und die durch Reduktion daraus zugänglichen Hydroxylverbindungen gleich. Die  $R_f$ -Werte gleichen denen der Astaxanthinmonoester aus *Adonis*. Folglich enthält *Fraktion 9 Astaxanthinmonoester*.

Diese Monoester besitzen wie die Monoester von *Adonis* eine Triketostruktur.<sup>7</sup> Sie lassen sich mit Essigsäureanhydrid in Pyridin nicht zum Diester verestern.



**Fraktionen 4, 6, 8**

Diese Fraktionen stehen in engem Zusammenhang mit den Fraktionen 5, 7, 9. Ihre Farbe ist jeweils—besonders auf dem Chromatogramm augenfällig—etwas heller (ca. 7 nm nach kürzeren Wellenlängen verschoben, Abb. 3 und 4). Sie gleichen den auch bei *Adonis* gefundenen Pigmenten, die auch dort jeweils vor den Astaxanthindiestern, Adonirubinestern und Astaxanthinmonoestern zu eluieren waren. Im Verteilungschromatogramm sind die Fraktionen 4, 6, 8 von den Fraktionen 5, 7, 9 nach  $R_f$ -Werten nicht zu unterscheiden. Das gleiche gilt für die Verseifungsderivate. Die Beziehung dieser "Begleitgruppen" zu den "Hauptgruppen" (ihre Menge beträgt etwa ein Drittel der Hauptgruppen) wird aus folgendem Versuch deutlich:

Belichtet man die Fraktionen 4, 6, 8, die im Dunkeln unverändert bleiben, kräftig ( $\frac{1}{2}$  h Sonnenlicht), so erhält man aus den reinen Lösungen wieder ungefähr das ursprüngliche Gemisch. Dieses Gemisch kann wieder durch Adsorptionschromatographie getrennt werden, nicht aber durch Verteilungschromatographie. Dies zeigt *cis-trans*-Isomerie<sup>8</sup> an. Aus den Spektren ist zu ersehen, daß die dunkelroten Hauptgruppen all-*trans*-Formen sind, während die helleren Nebengruppen *cis*-Isomere sein müssen. Das wird durch die folgenden Befunde erklärt. 1. Das Spektrum der Zonen 4 und 8 (Astaxanthinester *cis*) besitzt bei 380 nm eine Schulter, die dem Spektrum der Zonen 5 und 9 (Astaxanthinester *trans*) fehlt (Abb. 3 und 4). Das gleiche gilt entsprechend für die Adonirubinester. 2. Die mit  $\text{NaBH}_4$  reduzierten Ester der Zonen 4, 6, 8 haben alle einen ausgeprägten *cis*-Gipfel bei 337 nm, der den

<sup>7</sup> K. EGGER und H. KLEINIG, *Phytochem.* 6, 437 (1967).

<sup>8</sup> L. ZECHMEISTER, *Chem. Rev.* 34, 267 (1944).

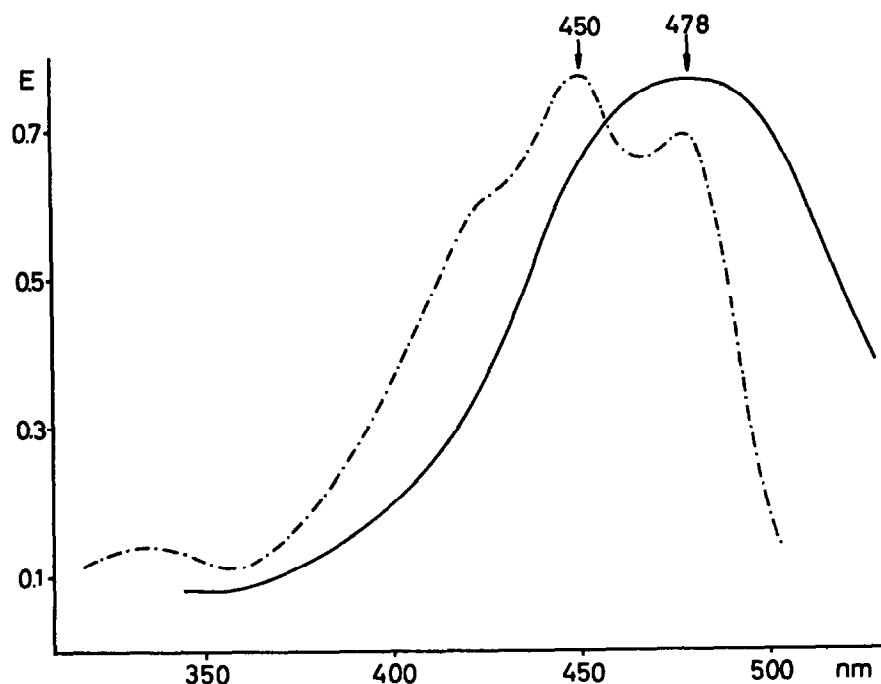


ABB. 3. ABSORPTIONSSPEKTREN DER ASTAXANTHINESTER TRANS IN ÄTHANOL. DURCHGEHENDE LINIE: NATIVES PIGMENT, UNTERBROCHENE LINIE: REDUZIERTES PIGMENT.

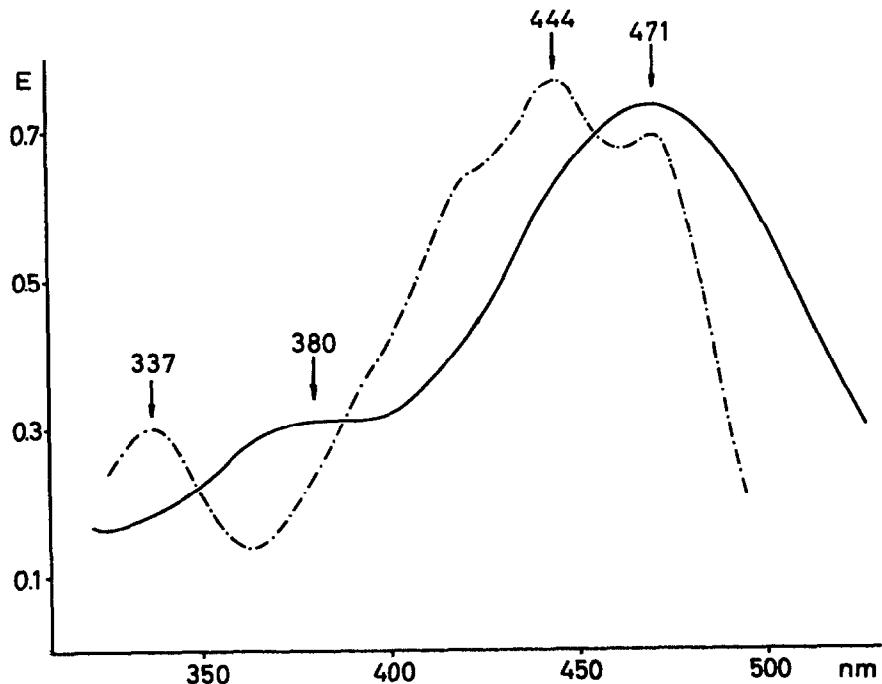


ABB. 4. ABSORPTIONSSPEKTREN DER ASTAXANTHINESTER CIS IN ÄTHANOL. DURCHGEHENDE LINIE: NATIVES PIGMENT, UNTERBROCHENE LINIE: REDUZIERTES PIGMENT.

Reduktionsprodukten der Zonen 5, 7, 9 fehlt (Abb. 3 und 4). 3. Die Hauptmaxima der reduzierten Ester der Zonen 4, 6, 8 liegen gegenüber all-*trans*-Zeaxanthin um 6 nm nach Blau verschoben (Abb. 3 und 4).

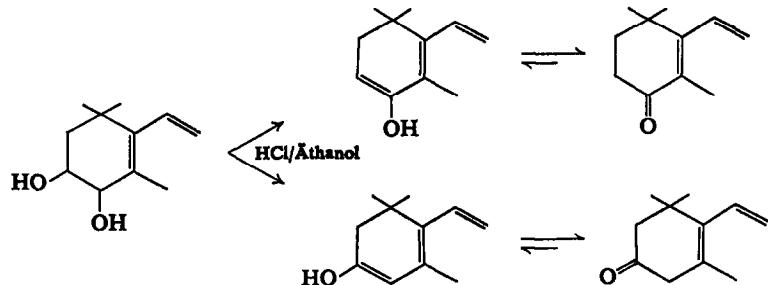
Der hypsochrome Effekt durch *cis*-Isomerisierung scheint bei Ketocarotinoiden besonders hoch zu sein. Die nativen Pigmente differieren um ca. 7 nm, die reduzierten um 6 nm, während für Hydroxycarotinoide 3–4 nm angegeben werden.<sup>9</sup>

#### ZUR STRUKTUR DER ESTER

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß bei der Verseifung von hydroxylhaltigen Ketocarotinoiden, bei denen Hydroxylgruppe und Ketogruppe benachbart sind, Ketoformen ohne freie Hydroxylgruppen erhalten werden. Die Herstellung synthetischer Ketocarotinoidester mit definierten Carbonsäurechloriden ist somit nicht möglich. Wir konnten jedoch auf einem Umweg die Fettsäurekomponenten der Adonisester bestimmen,<sup>7</sup> so daß nunmehr Vergleichssubstanzen vorliegen. Bei der Analyse wurden die nativen Ester zunächst reduziert, anschließend veräthert, verseift und mit Carbonsäurechloriden verestert. Auf diese Weise wurde gezeigt, daß bei *Adonis* Myristinsäure die Hauptkomponente ist. In Abb. 2 ist nun ein Zellulose/Paraffinöl-Chromatogramm gezeigt, auf dem die sich jeweils entsprechenden Estergruppen aus *Acetabularia* und *Adonis* nebeneinander chromatographiert sind. Zunächst wird deutlich, daß *Adonis* wesentlich mehr Ester der einzelnen Pigmente besitzt als *Acetabularia*. Sodann liegen die Ester aus *Acetabularia* gegenüber denen aus *Adonis* auf Lücke. Der stärkste Fleck auf den *Adonis*-Spuren stellt bei den Diestern das Dimyristat, bei den Monestern das Monomyristat dar.<sup>7</sup> Der wesentlich schwächere Fleck darunter ist bei den Diestern das Myristat-Palmitat, bei den Monoestern das Palmitat. Die Flecke darüber sind das Myristat-Laurat und Dilaurat bzw. das Laurat und Caprinat. Es handelt sich also bei *Adonis* um geradzahlige gesättigte Fettsäuren. Daher kann für *Acetabularia* gefolgert werden, daß hier andere Fettsäuren an der Veresterung beteiligt sind. Entweder liegen ungeradzahlige gesättigte Säuren oder aber ungesättigte Säuren vor, die noch gesonderter Analyse bedürfen.

#### ÄTHERBILDUNG

Zur Strukturaufklärung der Ketocarotinoide ist die Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  und anschließender Ätherbildung mit Äthanol/HCl wertvoll. Sie bringt einen Hinweis auf die Anzahl der allylständigen OH-Gruppen. Während diese Reaktion mit isolierten allylständigen OH-Gruppen glatt verläuft, werden *o*-Dihydroxygruppen, wie sie im reduzierten Astacin vorliegen, nur langsam und mit sehr geringer Ausbeute angegriffen. Es überwiegen störende Nebenreaktionen, wobei vor allem an Wasserabspaltungen zu denken ist.



Tatsächlich kann man in solchen Verätherungsansätzen rote Folgeprodukte finden.

<sup>9</sup> J. TISCHER, Z. Physiol. Chem. 311, 140 (1958).

Hohe Ausbeuten an Allyläthern werden jedoch erreichbar, wenn gleich die nativen Ester reduziert und veräthert werden. Hier verhält sich die allylständige OH-Gruppe wie eine isolierte, da die benachbarte OH-Gruppe mit einer Fettsäure verestert ist. Anschließende Verseifung führt zu dem sonst nur in Spuren zugänglichen Hydroxyäther. Über die Eigenschaften der aus den verschiedenen Ketocarotinoiden zu erhaltenden Äther wird an anderer Stelle berichtet.

#### DISKUSSION

Die siphonale Grünalge *Acetabularia mediterranea* Lam. besitzt zwei sehr verschiedene Gruppen von Carotinoiden. Die eine Gruppe enthält  $\beta$ -Carotin und die Xanthophylle, die aus den Blättern der höheren Pflanzen bekannt sind (Lutein, Luteinopoxid, Violaxanthin, Neoxanthin). Wie bei den Blättern der höheren Pflanzen sind diese Pigmente unverestert. Die zweite Gruppe—in kaum geringerer Konzentration als die erste vorhanden—besteht nur aus Ketohydroxycarotinoiden. Bis auf ein noch unbekanntes gelbes Ketopigment sind diese Farbstoffe mit den in den roten Blütenblättern von *Adonis annua* gefundenen<sup>6</sup> identisch. Es handelt sich um die beiden besonders aus dem Tierreich bekannten, aber auch in Mangelkulturen verschiedener Grünalgen gefundenen 3-Hydroxyechinenon und Astaxanthin<sup>2, 5, 9</sup> und um 3,3'-Dihydroxyechinenon=Adonixanthin und 3-Hydroxycanthaxanthin=Adonirubin, die bisher nur aus *Adonis* bekannt waren.<sup>6</sup> Diese Pigmente sind in *Acetabularia* quantitativ mit Fettsäuren verestert, in freier Form wurden sie nicht gefunden. Auch in *Adonis* und in den Mangelkulturen einiger Grünalgen liegen diese Ketopigmente verestert vor. Die so auffällige Parallelität zwischen *Adonis* und *Acetabularia* ist nun allerdings in den Fettsäurekomponenten der Farbwachse nicht mehr gegeben. In *Adonis* konnten die Fettsäuren aufgeklärt werden,<sup>7</sup> es handelt sich hier um Palmitin-, Myristin-, Laurin-, Caprinsäure und eine ungesättigte Säure, wobei die Myristinsäure Hauptkomponente ist. Die *Acetabularia*-Ester liegen im Verteilungschromatogramm zu den bekannten *Adonis*-Estern auf Lücke, so daß bei *Acetabularia* andere Fettsäuren an der Veresterung beteiligt sein müssen, die noch der Klärung bedürfen.

Die bei Carotinoiden verbreiteten *cis-trans*-Isomeren treten auch bei Ketocarotinoiden auf. Astaxanthinester und Adonirubinester bilden bei *Acetabularia* die gleichen all-*trans*-Formen und *cis*-Formen wie bei *Adonis*. *Cis*-Isomere von Carotinoiden absorbieren in etwas kürzweiligerem Bereich als die stabileren *trans*-Formen (3–4 nm).<sup>8</sup> Bei Astaxanthin und Adonirubin beträgt diese Differenz jedoch etwa 7 nm, der Farbunterschied ist also schon recht groß.

Die Gattung *Acetabularia* scheint zumindest innerhalb der siphonalen Grünalgen in ihrer Carotinoid-Ausstattung eine Ausnahme zu bilden.<sup>10</sup> Andere Gattungen der *Siphonales* besitzen zwar die gleichen freien Xanthophylle wie *Acetabularia* (z.B. *Caulerpa*, *Codium*, *Bryopsis* u.a.), Sekundärcarotinoide konnten bei ihnen jedoch nicht gefunden werden.

#### MATERIAL UND METHODEN

Die Algen wurden in der Stazione Zoologica Neapel aufgearbeitet. Es wurden sowohl Wildpflanzen als auch Kulturpflanzen, die nicht mit Kalk inkrustiert waren, untersucht.

*Reduktion:* Die Ketocarotinoide wurden in äthanolischer Lösung mit  $\text{NaBH}_4$  bei 50° reduziert bis zum Verschwinden der roten Farbe. *Verätherung:* Allylständige Hydroxylgruppen wurden veräthert zum Äthyläther in 0,01 N äthanolischer Salzsäure.<sup>11</sup>

<sup>10</sup> H. KLEINIG, *Ber. Deut. Botan. Ges.* (im Druck).

<sup>11</sup> E. C. GROB und R. P. PFLUGSHAUPT, *Helv. Chim. Acta* 45, 1592 (1962).

*Verseifung*: Carotinoidester wurden verseift in Natriumalkoholat (10%ig), nach 10 min wurde Petroläther dazugegeben und mit Wasser ausgeschüttelt. Dabei muß mit Essigsäure angesäuert werden, um Salzbildungen der Ketofarbstoffe an der Phasengrenze zu vermeiden.

*Säulenschromatographie*: Der Gesamtextrakt wurde über eine Kieselgelsäule mit Petroläther-Äther-Gemischen fraktioniert.

*Dünnenschichtchromatographie*: Für Carotinoidester Adsorptionschromatographie auf Kieselgelschicht und Verteilungschromatographie auf Zelluloseschicht, die mit Paraffinöl imprägniert wurde.<sup>14</sup> Sind an der Veresterung von Carotinoiden mehrere Fettsäuren beteiligt, so können die einzelnen Komponenten in diesem System getrennt werden. Für verseifte Carotinoide wurden Polyamidschichten<sup>13</sup> und Zelluloseschichten, die mit flüssigen Triglyceriden imprägniert waren,<sup>12</sup> verwendet.

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

<sup>12</sup> K. EGGER, *Planta* **58**, 664 (1962).

<sup>13</sup> K. EGGER und H. VOIGT, *Z. Pflanzenphysiol.* **53**, 64 (1965).

<sup>14</sup> K. EGGER, *Chromatographie-Symposium II* p. 75, Brüssel (1962).