

CAROTINOIDESTER-MUSTER IN GELBEN BLÜTENBLÄTTERN

HANS KLEINIG* und HELFRIED NIETSCHE

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Deutschland

(Received 29 November 1967)

Abstract—The fatty acid esters of carotenoids of the petals of four different species: *Forsythia intermedia*, *Taraxacum officinale*, *Tussilago farfara*, *Impatiens noli-tangere*, were investigated. All hydroxyl-containing pigments present (cryptoxanthin, cryptoxanthin-epoxide, zeaxanthin, lutein, antheraxanthin, lutein epoxide, violaxanthin, neoxanthin) are combined with long-chain saturated fatty acids (myristic acid is the main component; lauric, palmitic and stearic acid are also present) in form of mono- and diesters. The pattern of esterification in the four plants is similar, and seems to be of widespread occurrence.

DIE MEISTEN gelben und gelbroten — und auch einige rote — Petalen enthalten Carotinoid-ester (Sekundärcarotinoide). Näher analysiert sind bisher die Lutein-Diester aus *Tagetes erecta* und *Tropaeolum majus*¹ und die gesamten Carotinoidester aus *Adonis annua*.² Die Pigmente der genannten Pflanzen sind mit mehreren gesättigten, geradzahligen homologen Fettsäuren verestert. In *Adonis* konnten auch Ester einer ungesättigten Säure nachgewiesen werden. Außerdem wurde aus *Taraxacum* ein Taraxanthin-Diester und ein Taraxanthin-Monoester beschrieben.³

In der vorliegenden Arbeit werden die Carotinoidester der Petalen von vier Pflanzen (*Forsythia intermedia*, *Tussilago farfara*, *Taraxacum officinale*, *Impatiens noli-tangere*) aus drei verschiedenen Familien untersucht.

ERGEBNISSE

In Abb. 1 sind die nach den im methodischen Teil angegebenen Verfahren erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Die verschieden starken Flecke geben in etwa die Mengenverhältnisse wieder. Die Bilder zeigen schematische zweidimensionale Chromatogramme der gesamten Carotinoidester der genannten Blüten. Die Abszisse gibt die Abfolge der Estergruppen wieder, in der sie aus einer Kieselgelsäule eluiert werden oder auf einer Kieselgeldünnschicht nach fallendem R_f -Wert angeordnet sind. Auf der Ordinate sind rel. ΔR_M -Werte der einzelnen Ester zueinander nach ihrer Anordnung im Verteilungschromatogramm aufgetragen. Die ΔR_M -Werte sind aus den R_f -Werten berechnet und für eine Übersichtsdarstellung besser geeignet.

Folgende Carotinoide können in den Petalen je nach Objekt als Ester vorhanden sein: Kryptoxanthin, Kryptoxanthinepoxid, Zeaxanthin, Lutein, Antheraxanthin, Luteinepoxid, Violaxanthin, Neoxanthin. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, spaltet jede auf Kieselgel einheitliche

*Adresse: Botanisches Institut der Universität Freiburg i.Br., Lehrstuhl für Zellbiologie.

¹ K. EGGER, *Ber. Deut. Botan. Ges.* 77, 145 (1964).

² K. EGGER und H. KLEINIG, *Phytochem.* 6, 437 (1967).

³ V. H. BOOTH, *Phytochem.* 3, 229 (1964).

Fraktion auf dem Verteilungsschromatogramm in mehrere Ester ein und desselben Xanthophylls auf. Der Übersichtlichkeit wegen sind *cis*-Isomere nicht in die Schemata eingezeichnet. Es können bis zu drei *cis*-Estergruppen pro Xanthophyll auftreten, die sich auf dem Verteilungsschromatogramm wie die *trans*-Formen verhalten, jedoch aus der Kieselgelsäule vor den *trans*-Formen isoliert werden. Auf diese Isomere wird an anderer Stelle eingegangen.

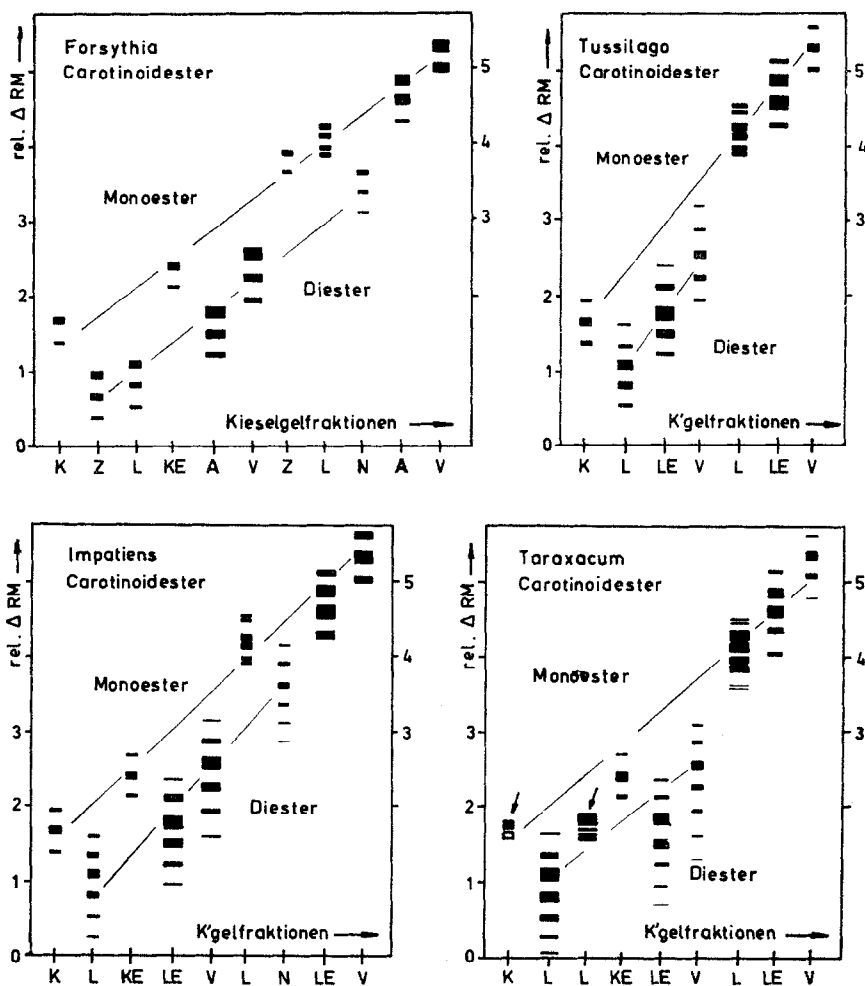


ABB. 1. SCHEMATISCH ZWEIDIMENSIONALE CHROMATOGRAMME DER CAROTINOIDESTER IN GELBEN BLÜTEN.

ABSZISSE: ABFOLGE DER FRAKTIONEN IN ADSORPTIONSCHROMATOGRAPHIE (KIESELGEL). ORDINATE: REL. ΔRM -WERTE (BERECHNET AUS R_F -WERTEN) IN VERTEILUNGSSCHROMATOGRAPHIE (MIT PARAFINÖL IMPRÄGNIERTE ZELLULOSE).

K = Kryptoxanthin-Ester; Z = Zeaxanthin-Ester; L = Lutein-Ester; KE = Kryptoxanthinepoxid-Ester; A = Antheraxanthin-Ester; LE = Luteinepoxid-Ester; V = Violaxanthin-Ester; N = Neoxanthin-Ester.

Die Diester

Hauptkomponenten sind bei allen Diestern der vier Objekte die Dimyristate. Nach unten in den Schemata schließen sich ebenfalls bei allen Objekten die gemischten Myristat-

Palmitate und die Dipalmitate, bei *Impatiens* und *Taraxum* sind auch noch Palmitat-Stearate und Distearate in geringer Konzentration zu finden. Außer bei *Forsythia* schließen sich nach oben die Myristat-Laurate und die Dilaurate an. Aus statistischen Gründen sollte man auch die gemischten Laurat-Palmitate, Laurat-Stearate und Myristat-Stearate erwarten. Da die Summe der CH_2 -Einheiten beider Fettsäuren eines Diesters seinen Wanderungswert auf dem "Paraffin"-Chromatogramm bestimmt, werden die genannten Mischester überdeckt: Laurat-Palmitat (Summe 26 CH_2 -Einheiten) durch Dimyristat (Summe 26 CH_2 -Einheiten), Laurat-Stearat (Summe 28 CH_2 -Einheiten) durch Myristat-Palmitat (Summe 28 CH_2 -Einheiten) und Myristat-Stearat (Summe 30 CH_2 -Einheiten) durch Dipalmitat (Summe 30 CH_2 -Einheiten). Diese Ester lassen sich indirekt durch partielle Verseifung der aus der Dünnschicht isolierten Flecke und durch Analyse der so entstandenen Monoester nachweisen.

Die Monoester

Es treten zwei Gruppen von Monoestern auf: Ester solcher Carotinoide, die nur eine Hydroxylgruppe enthalten wie Kryptoxanthin und Kryptoxanthinepoxid, und Ester von Carotinoiden mit zwei Hydroxylgruppen, von denen nur eine verestert ist. Die Monoester des Kryptoxanthins und des Kryptoxanthinepoxids und der in Bezug auf ihre Jononringe symmetrischen Verbindungen Zeaxanthin und Violaxanthin entsprechen der Anzahl und der relativen Menge der vorhandenen Fettsäuren. Das scheint zunächst nicht der Fall zu sein bei den Monoestern von Lutein, Luteinepoxid und Antheraxanthin, die in Bezug auf ihre Jononringe unsymmetrisch sind (Abb. 1). Bei den Luteinmonoestern treten Doppelflecke auf, wobei bei dem jeweils oberen Fleck die Hydroxylgruppe am 3'C-Atom d.h. die allylständige Hydroxylgruppe verestert ist, während bei dem jeweils unteren Fleck die nicht allylständige Hydroxylgruppe die Fettsäure trägt.⁴

Wieder anders sehen die Monoesterguppen von Antheraxanthin und Luteinepoxid aus. Bei diesen Carotinoiden besitzt ein Jononring eine Epoxidgruppe, die die Eigenschaften des Hydroxyls am gleichen Ring beeinflussen kann. Die Deutung der Monoesterguppen des Luteinepoxids zeigt Abb. 2. Isoliertes Luteinepoxid-Dimyristat (Spur 3 unten) spaltet nach der partiellen Verseifung in zwei Monoester auf (Spur 3 oben), wobei der obere Ester durch 0.01 N äthanolische HCl veräthert werden kann (Spur 4 oben und Mitte, der Doppelfleck in Spur 4 Mitte stellt den Allyläther und das immer parallel entstehende Dehydratisierungsprodukt dar). D.h. bei dem oberen Monomyristat ist die mit der Epoxidgruppe am gleichen Ring stehende (nicht allylständige) OH-Gruppe verestert, die am anderen Ring stehende freie allylständige OH-Gruppe kann veräthert werden. Bei dem unteren Monoester dagegen trägt die allylständige OH-Gruppe die Fettsäure, es kann folglich kein Allyläther gebildet werden. Dieses untere Monomyristat hat aber den gleichen R_f -Wert wie das obere Monopalmitat. Ganz analog hat das untere Monolaurat den gleichen R_f -Wert wie das obere Monomyristat, etc. Ein gemischter Diester wie z.B. das Myristat-Palmitat sollte also nach der partiellen Verseifung drei Monoester-Flecke ergeben. Das ist in Abb. 2 Spur 6 gezeigt. Auf diese Weise kommt die zunächst unerklärlich erscheinende Monoesterguppe des Luteinepoxids zustande.

Bei den Antheraxanthin-Monoestern (*Forsythia*) kann dieser Versuch nicht durchgeführt werden, da Antheraxanthin kein allylständiges d.h. als solches nachweisbares Hydroxyl besitzt. Doch scheinen sich die Monoester ebenso zu verteilen wie bei den Luteinepoxid-Monoestern, da sie im Chromatogramm ein ähnliches Bild ergeben wie diese.

⁴ K. EGGER und W. SCHWENKER, *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 407 (1966).

Aus den Befunden läßt sich nun ableiten, daß in den Monoestern die gleiche Fettsäureverteilung vorliegt wie bei den Diestern und daß bei den Dihydroxyxanthophyllen jeweils beide Monoester nebeneinander vorkommen. Nur vom Neoxanthin konnten bisher keine Monoester nachgewiesen werden. Das mag an der verhältnismäßig geringen Konzentration des Pigments und der zu erwartenden ungünstigen Lage im Chromatogramm liegen. Die tertiäre Hydroxylgruppe des Neoxanthins erscheint jedoch nie verestert. Es existiert hier also kein Carotinoid-Triester.

Die in Abb. 1 bei *Taraxacum* mit einem Pfeil gekennzeichneten Ester sind nur im Pollen enthalten, während alle anderen Ester ausschließlich in den Petalen vorkommen. Die Fettsäurekomponenten der Ester aus den Pollen konnte bisher nicht ermittelt werden. Es handelt sich weder um geradzahlig gesättigte Säuren noch um Öl- oder Linolensäure. Der nicht schwarz ausgefüllte Fleck zeigt zum Vergleich die Lage eines synthetischen Kryptoxanthin-Myristats.

DISKUSSION

In Carotinoidester führenden Chromoplasten sind die vorhandenen hydroxylhaltigen Carotinoide mit den vorhandenen Fettsäuren frei kombiniert. Es treten alle theoretisch möglichen Ester auf, bevorzugte Synthesen lassen sich nicht nachweisen. Dies gilt für die Chromoplasten von Blütenblättern, Früchten, Herbstlaub und für die Grünalgen, die unter bestimmten Bedingungen Sekundärcarotinoide bilden können.^{5,6}

In den untersuchten Petalen liegen Ester mehrerer gelber Xanthophylle mit mehreren Fettsäuren vor. Die Muster der Carotinoidester in den Blütenblättern der vier Pflanzen sind dabei recht ähnlich. Stets findet man Ester gesättigter homologer Fettsäuren mit Myristinsäure als Hauptkomponente. Nebenkomponten können Laurin-, Palmitin- und Stearinsäure sein. Ungesättigte Säuren wie etwa in den Estern des Herbstlaubs^{7,8,4} treten nicht auf. Die Carotinoide selbst sind die gleichen wie in den grünen Pflanzenteilen (Kryptoxanthin, Kryptoxanthinepoxide, Zeaxanthin, Lutein, Antheraxanthin, Luteinepoxid, Violaxanthin, Neoxanthin), z.T. in erheblich höherer Konzentration (Kryptoxanthin, Kryptoxanthinepoxid, Luteinepoxid), z.T. fehlen auch einige Pigmente (*Tussilago*). Meist sind mehrere Isomere eines jeden Xanthophylls vorhanden, die durch Adsorptionschromatographie (besonders basische Schichten⁹) gut getrennt werden können. (In den hier gezeigten Abbildungen sind diese Isomeren nicht berücksichtigt.) Ähnliche Muster sind auch in den gelben Petalen anderer Pflanzen zu finden (z.B. *Ranunculus repens*, *Tagetes erecta*, *Tropaeolum majus* u.a.) und scheinen weit verbreitet zu sein. Es können jedoch durch ein größeres Fettsäurespektrum auch kompliziertere Muster auftreten. In *Helianthus annuus* sind zusätzlich noch Carotinoid-Acetate enthalten¹⁰ und auch *Viola* besitzt eine außerordentliche Vielzahl von Estern.¹¹

Die Befunde von Booth,³ daß in *Taraxacum* nur ein Diester und ein Monoester des Taraxanthins enthalten ist, können nicht bestätigt werden. Auch in *Taraxacum* ist eine große Zahl von Estern zu finden (Abb. 1). Taraxanthin ist mit Luteinepoxid identisch und als Synonym aufzufassen. Das zeigte sich während dieser Untersuchungen eindeutig für die

⁵ H. KLEINIG und K. EGGER, *Phytochem.* **6**, 611 (1967).

⁶ H. KLEINIG, *Z.Naturforsch.* **22b**, 977 (1967).

⁷ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Helv. Chim. Acta* **45**, 1556 (1962).

⁸ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Helv. Chim. Acta* **46**, 2411 (1963).

⁹ K. EGGER, *Planta* (im Druck).

¹⁰ K. EGGER, *Phytochem.* (in Preparation).

¹¹ H. NIETSCHÉ (unveröffentlicht).

aus *Taraxacum* beschriebenen Taraxanthinester³ und für das aus *Impatiens* beschriebene Taraxanthin.¹² Vermutlich wurde hier eines der Luteinepoxid-Isomeren als Taraxanthin angesprochen. Diese Frage wird an anderer Stelle eingehend behandelt.⁹

METHODIK

Chromatographische Systeme: A. Adsorptionschromatographie auf Kieselgeldünnschichten, Laufmittel für Carotinoidester Petroläther:Aceton=10:1, Laufmittel für freie Carotinoide Benzol:Methanol=50:2,5. B. Verteilungschromatographie auf mit ungesättigten Triglyceriden imprägnierte Zelluloseschicht für freie Carotinoide, Laufmittel Methanol:Aceton:Wasser=30:10:3. C. Verteilungschromatographie auf mit Paraffinöl imprägnierter Zellulosedünnschicht für Carotinoidester, Laufmittel Aceton:Methanol:Wasser=30:10:1.

Identifizierung der Carotinoide Die Farbestere werden aus den Petalen mit Aceton extrahiert und in tiefsiedenden Petroläther überführt. Der Gesamtextrakt wird auf einer Kieselgelsäule in die einzelnen Estergruppen getrennt, jede Fraktion in 20%igem Natriumalkoholat verseift. Die einzelnen Carotinoide werden spektralphotometrisch und chromatographisch charakterisiert, die funktionellen Gruppen nach den in der Carotinoidchemie üblichen Methoden bestimmt.

Identifizierung der Ester Die einzelnen Esterfraktionen (mit nun bekannten Xanthophyllen) werden in verschiedenen chromatographischen Systemen mit synthetischen Estern der gleichen Xanthophylle cochromatographiert, wodurch die Fettsäurekomponenten der unbekannten Ester eindeutig bestimmt werden können, sofern sie mit den Fettsäurekomponenten der synthetischen Ester übereinstimmen.

Definierte Carotinoidester werden mit freien Xanthophyllen und Carbonsäurechloriden in Petroläther mit wenigen Tropfen Pyridin hergestellt.

Monoester von Dihydroxycarotinoiden werden durch partielle (kurzzeitige) Verseifung bekannter Diester bestimmt.

Herrn Dr. K. Egger danken wir für anregende Diskussionen. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Untersuchungen durch Sachmittel gefördert.

¹² C. H. EUGSTER und P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* **40**, 69 (1957).