

- [6] K. Narasaka, E. Hidai, Y. Hayashi, J.-L. Gras, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 102–103.
- [7] T. Rein, N. Kann, R. Kreuder, B. Gangloff, O. Reiser, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 597–599; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 556–558.
- [8] HWE-Reaktionen mit Aminoaldehyden: M. T. Reetz, D. Röhrig, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1732–1734; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1706–1709.
- [9] Während der Revision dieses Beitrags wurde die klassische kinetische Enantio-merentrennung von 2-Dibenzylaminopropionaldehyd durch Umsetzung mit **2a** mit bis zu 60% de beschrieben: T. Furuta, M. Iwamura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2167–2168.
- [10] C. Bubert, J. Voigt, S. Biassetton, O. Reiser, *Synlett* **1994**, 675–677.
- [11] Der *N*-Tosyl-geschützte Aldehyd **rac-1a** reagierte mit deutlich besserer Selektivität als die entsprechenden *N*-Boc- oder *N*-Methyl-geschützten Derivate.
- [12] Alle neuen Verbindungen wurden vollständig charakterisiert (¹H- und ¹³C-NMR, IR, MS) und gaben befriedigende Elementaranalysen.
- [13] Synthese von (*S*)-**1c**: S. G. Pyne, M. J. Hensel, P. L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5719–5728.
- [14] D. Romo, S. D. Meyer, D. D. Johnson, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7906–7907.
- [15] P. Baeckström, K. Stridh, L. Li, T. Norin, *Acta Chem. Scand. Ser. B* **1987**, *41*, 442–447.

Strukturbestimmung von Vitamin-A-acetat-Isomeren mit HPLC-¹H-NMR-Kopplung**

Klaus Albert*, Götz Schlotterbeck, Ulrich Braumann, Heidrun Händel, Manfred Spraul und Gerhard Krack

Vitamin A (Retinol) ist als Wachstumsfaktor und Schutzstoff sowie nach Oxidation zum entsprechenden Aldehyd (Retinal) als aktive Komponente des Sehpurpurs für den menschlichen Organismus von essentieller Bedeutung. Beim Sehvorgang ist die Isomerisierung von 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal eine der wichtigen biochemischen Reaktionen im Rhodopsincylus. Natürliches Vitamin A (all-*trans*-Retinol) tritt, ebenso wie synthetisches Vitamin-A-acetat, oftmals zusammen mit seinen *cis-trans*-Isomeren (Abb. 1) auf^[1, 2]. Die schnelle und eindeutige Strukturbestimmung von unterschiedlichen Vitamin-A-acetat-Isomeren in verschiedenen Zubereitungsformen ist wegen der vielfältigen Anwendungsbereiche dieser Vitamine von zunehmendem Interesse. Retinol und seine Derivate werden im medizinischen Bereich wegen ihrer antioxidativen Eigenschaften^[3] und aufgrund ihrer cytostatischen Wirkung zur Tumortherapie eingesetzt^[4], darüber hinaus finden diese Verbindungen Anwendungen in der Lebensmitteltechnologie und in der Kosmetik. Die Trennung der *cis-trans*-Isomere von Carotinoiden, und speziell von Vitamin-A-acetat, gelingt mit Hochleistungsflüssig-chromatographie (HPLC) an Cyanpropyl- oder *n*-Alkyl-modifizierten Kieselgelen als stationärer Trennphase^[5–7]. Die Struktur der getrennten Isomeren kann bei der routinemäßig durchgeföhrten Verfolgung der Chromatographie mit UV-Spektroskopie

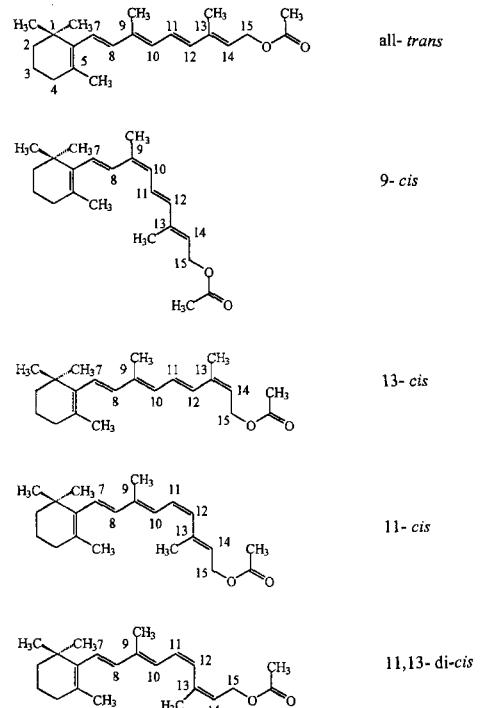


Abb. 1. Hauptisomere von Vitamin-A-acetat.

nur andeutungsweise bestimmt werden. Ebenso sind die aus dem chromatographischen Trennlauf erhaltenen Kapazitätsfaktoren zur Strukturzuordnung nur bedingt geeignet^[8]. Allenfalls über Vergleichsmessungen, verbunden mit großem experimentellen und zeitlichen Aufwand, ist eine Strukturermittlung möglich. Eine Anwendung der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie auf die untersuchte Problemstellung scheidet ebenfalls aus, da sich die *cis-trans*-Isomere von Vitamin-A-acetat nicht in ihrem Fragmentierungsmuster unterscheiden. Aus diesem Grunde haben wir untersucht, ob die Strukturzuordnung der Isomeren über direkte Kopplung von HPLC und ¹H-NMR-Spektroskopie^[9–15] möglich ist.

Als Testsubstanzen dienten Vitamin-A-acetat-Isomere, die durch kurzzeitiges Erhitzen von all-*trans*-Vitamin-A-acetat auf 160 °C hergestellt wurden. Das ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) dieses Isomerengemisches ist in Abbildung 2 gezeigt. Eine

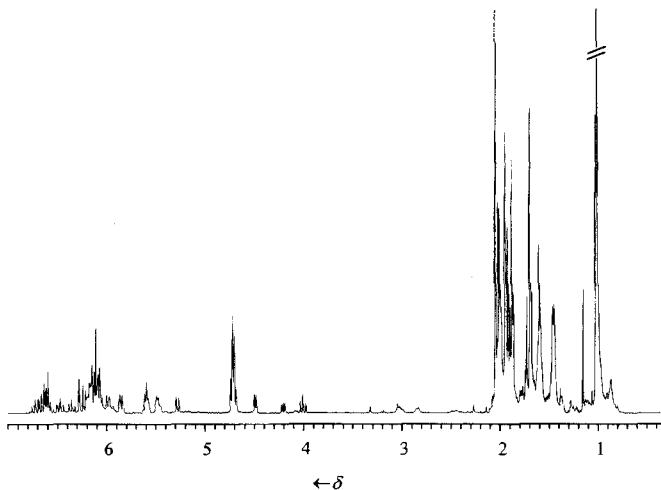


Abb. 2. ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) eines Vitamin-A-acetat-Isomerengemisches.

* Priv.-Doz. Dr. K. Albert, Dipl.-Chem. G. Schlotterbeck, Dipl.-Chem. U. Braumann, Dr. H. Händel
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. +7071/29-5246

Dr. M. Spraul
Bruker Analytische Meßtechnik, Silberstreifen, Rheinstetten
Dr. G. Krack
BASF AG, Physikalische Analytik, ZAX/PS, E 210, Ludwigshafen

** Diese Arbeit wurde von den Firmen Bruker, Karlsruhe, und BASF AG, Ludwigshafen, gefördert. Wir danken Frau Brigitte Kloster für ihre Mitarbeit bei der Aufnahme und Interpretation der Spektren. – In diesem Beitrag wird durchgehend der eingeführte Name Vitamin-A-acetat statt des IUPAC-konformen Namens Retinylacetat verwendet.

Strukturbestimmung einzelner Komponenten ist aus den überlagerten Signalen nicht möglich. Wird das Isomerengemisch an einer Cyanpropyl-modifizierten Kieselgelphase mit *n*-Heptan als Laufmittel aufgetrennt, so sind im UV-Chromatogramm fünf Hauptkomponenten (Abb. 3) zu erkennen. Unter den gewählten Bedingungen (siehe *Experimentelles*) sind Peak 1 und Peak 2 nur teilweise getrennt.

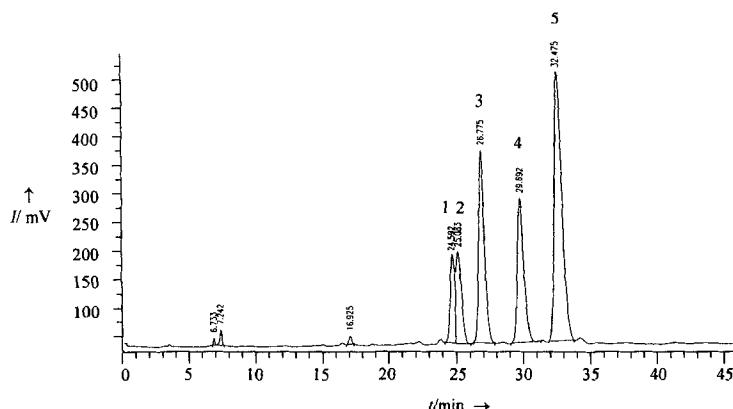


Abb. 3. UV-Chromatogramm einer Vitamin-A-acetat-Isomerentrennung (1: 11,13-di-cis-, 2: 11-cis-, 3: 13-cis-, 4: 9-cis-, 5: all-trans-Vitamin-A-acetat).

Obwohl durch die Verwendung von *n*-Heptan als Fließmittel die ^1H -NMR-Signale der aliphatischen Einheiten zur Strukturzuordnung nicht zur Verfügung stehen, sind in der Konturdarstellung (Abb. 4) der On-line-HPLC- ^1H -NMR-Trennung interessan-

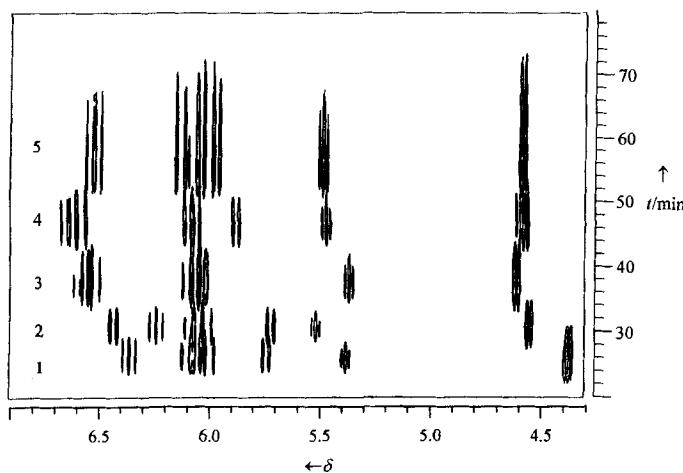


Abb. 4. Konturdarstellung der On-line-HPLC-NMR-Trennung des Vitamin-A-acetat-Isomerengemisches (Parameter siehe *Experimentelles*) (1: 11,13-di-cis-, 2: 11-cis-, 3: 13-cis-, 4: 9-cis-, 5: all-trans-Vitamin-A-acetat).

te Einzelheiten zu erkennen. In dieser Konturdarstellung sind die ^1H -NMR-Signale der olefinischen Einheiten der getrennten Komponenten (x -Achse = ^1H -chemische Verschiebung) gegen die Retentionszeiten (y -Achse) aufgetragen. Ohne auf die Strukturzuordnung im einzelnen eingehen zu müssen, können die im UV-Spektrum nur teilweise getrennt erscheinenden Isomere (Peak 1 und 2) bereits anhand ihrer unterschiedlichen ^1H -NMR-Spektren identifiziert werden.

Eine Signalzuordnung der einzelnen Isomere ist nun unter Betrachtung der aus den Durchfluß-NMR-Spektren erhaltenen Kopplungskonstanten, chemischen Verschiebungen und Integrationsverhältnisse möglich. Abbildung 5 zeigt den olefinischen Be-

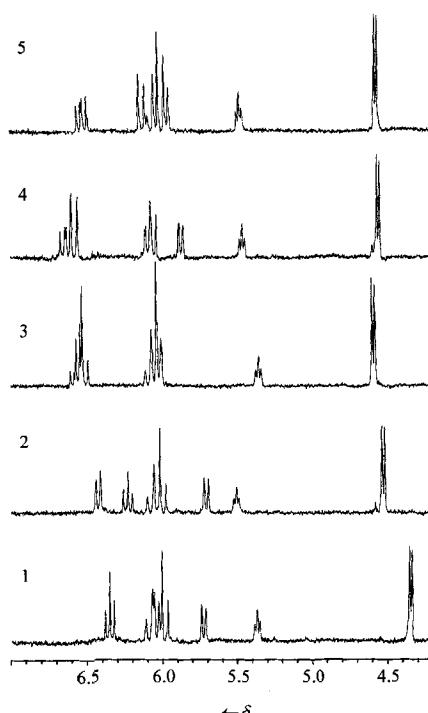


Abb. 5. Durchfluß- ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) der getrennten Vitamin-A-acetat-Isomere (1: 11,13-di-cis-, 2: 11-cis-, 3: 13-cis-, 4: 9-cis-, 5: all-trans-Vitamin-A-acetat).

reich der am jeweiligen Peakmaximum aufgenommenen Durchfluß- ^1H -NMR-Spektren der getrennten Isomere. Routine- und Durchfluß-Spektren zeigen die gleiche Auflösung. Nach Analyse der chemischen Verschiebungen, der Kopplungskonstanten sowie der aus Platzgründen nicht dargestellten Integrale lässt sich die in Tabelle 1 wiedergegebene Zuordnung treffen.

Tabelle 1. ^1H -NMR-spektroskopische Daten der Vitamin-A-acetat-Isomere in *n*-Heptan.

Isomer	Peak 7	chemische Verschiebung δ der olefinischen Protonen					Kopplungskonstanten J [Hz]			
		8	10	11	12	14	3J	3J	3J	
11,13-di-cis	1	6.10	6.00	6.05	6.36	5.74	5.38	16.0	12.3	11.3
11-cis	2	6.08	6.00	6.43	6.24	5.71	5.51	15.8	11.7	11.7
13-cis	3	6.09	6.03	6.03 [a]	6.57 [a]	6.52 [a]	5.36	15.0	11.0 [a]	14.1 [a]
9-cis	4	6.09	6.58	5.88	6.64	6.06	5.47	16.1	11.7	14.1
all-trans	5	6.07	6.01	5.97	6.53	6.13	5.48	16.1	11.4	15.1

[a] ABX-System, $^4J(10,12) < 0.3$ Hz.

Die chemischen Verschiebungen weichen von bekannten Werten^[16, 17] ab, was sich durch die Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln, in unserem Falle *n*-Heptan, erklärt. Während die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten aus den Spektren der 11,13-di-cis- und 9-cis-Isomere problemlos zu ermitteln sind, ergeben die all-trans-, 11-cis- und 13-cis-Isomere Spektren höherer Ordnung. So liegen in diesen drei Isomeren H7 und H8 als AB-System, im 13-cis-Isomer zusätzlich H10, H11 und H12 als ABX-System vor. Die Zuordnung der olefinischen Protonen konnte durch die Aufnahme von homonuclear korrelierten Spektren (H,H-COSY) im Stopped-flow-Meßverfahren bestätigt werden. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten des ABX-Systems wurden mit dem Simulationsprogramm WIN-DAISY^[18] ermittelt.

An Vitamin-A-acetat-Isomeren konnte gezeigt werden, daß selbst unter chromatographisch ungünstigen Bedingungen wie hohe Konzentration^[19] und langsame Fließgeschwindigkeit sich innerhalb kurzer Zeit selbst coeluierende Substanzen eindeutig charakterisieren lassen. Hiermit wird der große Vorteil der direkten HPLC-NMR-Kopplung erkennbar: Durch die Einführung einer zweiten Dimension, der ¹H-NMR-Frequenzen (Verschiebungen und Kopplungen), ist auch bei überlappenden HPLC-Peaks der herkömmlichen UV-Registrierung eine sichere und eindeutige Strukturzuordnung möglich.

Experimentelles

Zur Trennung der Vitamin-A-acetat-Isomere wurden zwei analytische Nucleosil-5-CN-Säulen in Serie geschaltet. Die ursprüngliche Trennung [20] erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹. Aus Sicht der NMR-Spektroskopie ist jedoch eine niedrigere Fließgeschwindigkeit vorteilhafter: Durch die Erniedrigung der Fließgeschwindigkeit können entweder mehr Transienten bei gegebenem Probenvolumen akkumuliert werden, was zu einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses (S/N) führt, oder es können bei gleichem S/N und bei gleichbleibender Zahl von Transienten mehr Spektren pro Peak-Elutionsvolumen aufgenommen werden. Solche erniedrigten Fließgeschwindigkeiten liegen jedoch unter den Werten, die nach der van-Decmter-Gleichung optimal wären. Daher wurde als praktikabler Kompromiß die normale Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹ zunächst beibehalten und erst kurz vor Erscheinen der Peaks im UV-Detektor die für die NMR-Detektion günstigere Fließrate von 0.2 mL min⁻¹ gewählt, die wiederum zu einer Verlängerung der Retentionszeiten führte.

Für länger dauernde NMR-Messungen (wie Stopped-flow-Experimente zur Aufnahme von homonuklear oder invers korrelierten Spektren) wird zur Feldfrequenzstabilisierung ein Deuteriumsignal empfohlen, welches normalerweise vom deuterierten Lösungsmittel stammt. Aus Kostengründen ist es aber nicht möglich, den Eluenten in seiner deuterierten Form zuzumischen, um ein ausreichend intensives Deuteriumsignal zu erhalten. Es wurde daher [D₆]Benzol zugesetzt, da es einerseits die herrschenden Chromatographiebedingungen nur unwesentlich verändert, bei einer detektierten Wellenlänge von 325 nm die Absorption des olefinischen Systems nicht beeinträchtigt und andererseits auch bei Konzentrationen von nur 1% ein ausreichendes Locksignal liefert.

Chromatographie-Parameter:

Pumpe: Bruker LC 22; zwei Säulen: Macherey-Nagel; 250 × 4,6 mm, Nucleosil 5 CN, 5 µm, Laufmittel: n-Heptan (getrocknet über Molsieb 0,3 nm); Fließgeschwindigkeit: 20 min lang 1,0 mL min⁻¹ (130 bar), dann 0,2 mL min⁻¹ (30 bar); UV-Detektor: Hewlett Packard 1050, Meßwellenlänge 325 nm. Zur Trennung wurden 5 mg Vitamin-A-acetat-Isomerengemisch, gelöst in 50 µL n-Heptan (zehnproz. Lösung) chromatographiert.

NMR-Parameter:

Bruker-ARX-400-Spektrometer, 120-µL-Durchflußprobenkopf mit HF-Spulenanordnung für Inverse-¹³C/¹H-Spektroskopie; 48 Transienten pro FID; 8-K-Datenpunkte (TD2) mit Spektralbreite (SW2) = 5618 Hz, Akquisitionszeit (AQ) = 0,73 s pro Transient, Pulswinkel 90° und Lösungsmittelsättigung für 0,5 s (abwechselnde Einstrahlung auf den Heptansignalen bei δ = 0,82 und 1,22 für jeweils 5 ms); 128 FIDs (TD1) mit einer Aufnahmezeit pro FID von 60 s wurden während der Trennung aufgenommen.

Die Daten wurden wie eine 2D-NMR-Matrix (*t*₁-Richtung = Retentionszeit) behandelt und mit der UXNMR-Software [21] verarbeitet; eine phasenempfindliche Fourier-Transformation wurde nur in der *t*₂-Richtung durchgeführt: Zero-filling in *t*₂ auf 32-K-Datenpunkte; Multiplikation mit einer Sinusquadrat-Apodisierungsfunktion.

Eingegangen am 6. Dezember 1994 [Z 7525]

Stichworte: Chromatographie · HPLC-¹H-NMR-Kopplung · NMR-Spektroskopie · Vitamin A

- [1] B. Stancher, F. Zonta, *J. Chromatogr.* **1982**, *238*, 217–225.
- [2] M. E. Cullum, M. H. Zile, *Anal. Biochem.* **1986**, *153*, 23–32.
- [3] M. Hiramatsu, L. Packer, *Methods Enzymol.* **1990**, *190*, 273–280.
- [4] R. Lotan, D. Lotan, P. G. Sacks, *Methods Enzymol.* **1990**, *190*, 100–110.
- [5] B. Stancher, F. Zonta, *J. Chromatogr.* **1982**, *234*, 244–248.
- [6] J. Deli, Z. Matus, P. Molnár, G. Tóth, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 952.
- [7] L. C. Sander, K. E. Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1667–1674.
- [8] F. Derguini, K. Nakanishi, J. Buck, U. Hämerling, F. Grün, *Angew. Chem. 1994*, *106*, 1954–1956; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1837–1839.
- [9] H. C. Dorn, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 747A–758A.
- [10] D. A. Laude, Jr., C. L. Wilkins, *TrAC Trends Anal. Chem. (Pers. Ed.)* **1986**, *5*, 230–235.

- [11] K. Albert, E. Bayer, *TrAC Trends Anal. Chem. (Pers. Ed.)* **1988**, *7*, 288–293.
- [12] K. Albert, *Habilitationsschrift, Universität Tübingen*, **1988**.
- [13] K. Albert, E. Bayer in *HPLC Detection Newer Methods* (Hrsg.: G. Patonay), VCH, New York, **1992**, S. 197.
- [14] M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvortsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 327–330.
- [15] J. K. Roberts, R. J. Smith, *J. Chromatogr. A* **1994**, *667*, 385–389.
- [16] W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi, U. Schwietel in *Carotenoids* (Hrsg.: O. Isler), Birkhäuser, Basel, **1971**, S. 218–225.
- [17] R. W. Curley, W. Fowble, *Magn. Res. Chem.* **1989**, *27*, 707–709.
- [18] WIN-DAISY, Bruker Analytische Meßtechnik GmbH.
- [19] Eine Trennung und Strukturzuordnung gelingt selbst bei Konzentrationen, bei denen keine Detektion durch UV-Spektroskopie mehr möglich ist. Eine Bestimmung des Detektionslimits im Stopped-flow-Meßverfahren, durchgeführt am all-trans-Vitamin-A-acetal, ergibt für das Dublett von H15 bei δ = 4,8 bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 4:1 eine detektierbare Substanzkonzentration von 1,2 µg Substanz im Probenkopf. Es wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen direkt in die Durchflußzelle eingebracht und jeweils 512 Transienten akkumuliert. Zur Unterdrückung der Heptansignale wurde die zuvor beschriebene Vorsättigungssequenz gewählt. Die Spektren wurden ohne Filterfunktion prozessiert.
- [20] H. Steuerle, *J. Chromatogr.* **1981**, *206*, 319–326.
- [21] UXNMR, Bruker Analytische Meßtechnik GmbH.

Synthese eines RGD-Sialyl-Lewis^x-Glykonjugats: ein neuer, hochwirksamer Ligand für P-Selektin

Ulrich Sprengard, Gerhard Kretzschmar*, Eckart Bartnik, Christoph Hüls und Horst Kunz*

Professor Richard R. Schmidt zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Zirkulation von Blutzellen wie den Leukozyten, Neutrophilen, Granulozyten und Monozyten ist auf molekularer Ebene ein vielstufiger, komplexer Prozeß, der nur in Teilschritten bekannt ist^[1]. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, daß die in der Immunüberwachung entscheidende Zirkulation der Lymphozyten sowie die Lokalisation der Neutrophilen und Monozyten an Entzündungsherden nach sehr ähnlichen molekularen Mechanismen ablaufen. So kommt es bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen zur Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen und zur Auswanderung in den Entzündungsherd oder in die sekundären lymphatischen Organe.

An diesen Vorgängen sind zahlreiche, spezifische Signalmoleküle wie Interleukine, Leukotriene, der Tumornekrosefaktor (TNF-α) und insbesondere gewebespezifische Zelladhäsionsmoleküle beteiligt, die von Rezeptoren erkannt werden. Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen neben Integrinen und Glycoproteinen der Immunglobulin-Superfamilie gehören die Selektine (E-, P- und L-Selektin)^[2], die in den Anfangsphasen der Leukozytenadhäsion eine entscheidende Rolle spielen. Es ist heute allgemein anerkannt, daß das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x^[3], das als Teilstruktur von Glycosphingolipiden und Glycoproteinen auf Zellmembranen vorkommt, in Zellkultur-Assays als schwach affiner Ligand aller drei Selektine fungieren kann^[4].

- [*] Dr. G. Kretzschmar, Dipl.-Chem. U. Sprengard
Zentralforschung der Hoechst AG
D-65926 Frankfurt am Main
Telefax: Int. + 69/313120
- [*] Prof. Dr. H. Kunz, Dipl.-Chem. U. Sprengard
Institut für Organische Chemie der Universität
D-55099 Mainz
Telefax: Int. + 6131/39-4786
- [Dr. E. Bartnik, Dr. C. Hüls
Werk Kalle-Albert der Hoechst AG