

117. ^1H -NMR., ^{13}C -NMR., UV.- und CD.-Daten von synthetischem (3*S*, 3'*S*)-Astaxanthin, seinem 15-*cis*-Isomeren und einigen analogen Verbindungen

von Gerhard Englert, Frank Kienzle und Klaus Noack

Zentrale Forschungseinheiten und Pharmazeutische Forschungsabteilung
der *F. Hoffmann-La Roche & Co., AG.*, CH-4002 Basel

Herrn Professor Dr. *Walter Boguth* zum 60. Geburtstag gewidmet

(10. III. 77)

**^1H -NMR., ^{13}C -NMR., UV. and CD. spectral data
of synthetic (3*S*, 3'*S*)-astaxanthin, its 15-*cis* isomer, and some related compounds**

Summary

^1H -NMR., ^{13}C -NMR., UV. and CD. spectra are reported for synthetic (3*S*, 3'*S*)-astaxanthin (**1**), its 15-*cis* isomer (**2**), its diacetate (**3**), and the 15, 15'-didehydro compound (**5**). These data prove the identity of the synthetic and the naturally occurring compound **1**. A full interpretation of the ^1H - and ^{13}C -NMR. spectra is given and confirms the configuration of all the double bonds. The conformation of the cyclohexene end group of all the compounds is shown to be identical. The signs of the different CD. maxima of 15-*cis*-astaxanthin are found to be opposite to those of the all-*trans* compound.

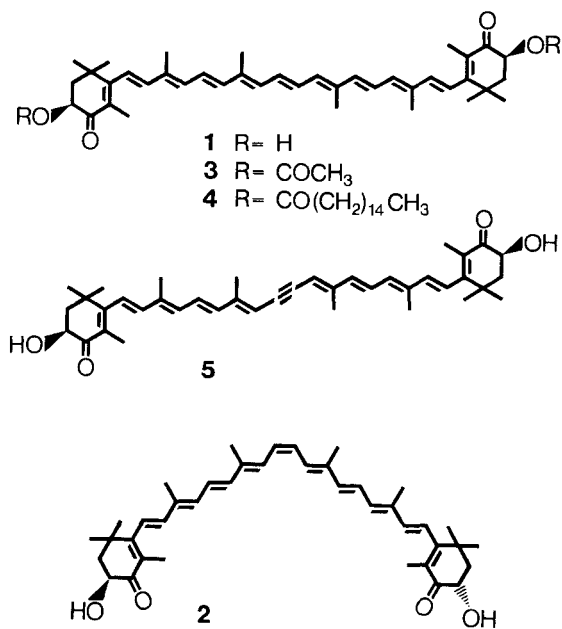
Einleitung. – Das am besten bekannte tierische Carotinoid ist zweifellos Astaxanthin (**1**). Es ist das gewöhnliche Pigment in Crustaceen wie Hummer [1] und vielen anderen marinen Invertebraten [2]. Es findet sich ebenfalls im Gefieder von Vögeln wie Flamingo [1–3] und Fasan [4]. Auch in Insekten, aber vor allem in Fischen ist es weit verbreitet. Am bekanntesten davon ist sein Vorkommen im Goldfisch [5], Lachs [6] und in der Forelle [1] [4].

Die generelle Struktur von Astaxanthin (**1**) wurde schon 1938 von *Kuhn & Sørensen* [7] erkannt, aber erst 1974 konnten *Andrewes et al.* [8] aufgrund von Vergleichen von CD.-Spektren sowie durch Konformationsanalysen die (3*S*, 3'*S*)-Konfiguration vorschlagen.

Obwohl das Vorkommen von Astaxanthin sehr oft in der Literatur erwähnt wird, geschieht dessen Nachweis meist nur durch UV.- und Massen-Spektroskopie. Da häufig freies Astaxanthin und dessen Mono- und Di-ester nebeneinander anzutreffen sind, erfolgt deren gemeinsamer Nachweis in vielen Fällen spektroskopisch sogar erst nach einer Hydridreduktion zu β , β -Carotin-3,4,3',4'-tetrol (Crustaxanthin) [9]. Da weiterhin diese Verbindungen fast immer nur in sehr geringen Mengen vorliegen und zudem noch stark oxydationsempfindlich sind, bestehen hinsichtlich einiger physikalischer Daten in der Literatur ziemliche Diskrepanzen.

Es ist uns nun gelungen, ausgehend von (4*R*,6*R*)-4-Hydroxy-2,2,6-trimethyl-cyclohexanon mit gesicherter absoluter Konfiguration [10] (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin (β , β -Carotin-3,3'-diol-4,4'-dion, **1**) herzustellen [11], das in allen seinen Eigenschaften (DC., MS., NMR., UV., CD.) mit natürlichem Material übereinstimmt [8] [12]. Damit war nicht nur der endgültige Beweis für dessen absolute Konfiguration erbracht, sondern es stand auch genügend reine Substanz zur Verfügung, um einige physikalische Eigenschaften dieser Verbindung sowie einiger Derivate zu bestimmen. Diese sind insbesondere auch deswegen von Interesse, weil kürzlich festgestellt worden war, dass das aus natürlichen Quellen isolierte Astaxanthin keineswegs immer (3*S*,3'*S*)-Konfiguration aufweist. So isolierten *Andrewes & Starr* [13] aus der Hefe *Phaffia rhodozyma* ein Astaxanthin, dem eindeutig die (3*R*,3'*R*)-Konfiguration zugeordnet werden muss.

Schema



Im folgenden beschreiben wir die UV.-, NMR.- und CD.-Spektren der von uns synthetisierten Verbindungen (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin (**1**), dessen Diacetat (**3**) und Dipalmitat (**4**) sowie von (3*S*,3'*S*)-15-*cis*-Astaxanthin (**2**) und (3*S*,3'*S*)-15,15'-Didehydroastaxanthin (**5**). Ebenfalls erwähnt werden die Daten der entsprechenden racemischen Verbindungen von **1** (**1a**), **3** (**3a**) und **4** (**4a**) [14]. Über die Herstellung dieser Verbindungen soll demnächst ausführlich berichtet werden [11].

UV.-Spektren. – Die Absorptionsmaxima mit den dazugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 1 angegeben. Eine eingehende Untersuchung über die optischen Eigenschaften von natürlichem Astaxanthin ist schon bekannt [15]. Von den entsprechenden Estern gibt es in der Literatur zwar qualitative, aber keine

Tabelle 1. UV.-Daten: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten

Verbin- dung	λ_{\max} [nm]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻²]	Lite- ratur ^{c)}	Ver- bin- dung	λ_{\max} [nm]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻²]	Lite- ratur ^{c)}
1	488	125000 ^{a)}	489 [15]	4	488	97500 ^{a)}	
	324	14500 ^{b)}			320	17000 ^{b)}	
	298	15000 ^{b)}			297	18400 ^{b)}	
	~285 Sch ^{d)}	~14000 ^{b)}			~286 Sch	~17000 ^{b)}	
	251	14500 ^{b)}			248	22000 ^{b)}	
	~225	~15000 ^{b)}					
2	478	60900 ^{a)}		5	454	42500 ^{a)}	
	375	40300 ^{a)}			~370 ^{e)}		
	305 Sch	13000 ^{b)}			~296 Sch	20000 ^{b)}	
	286	12000 ^{b)}			282	23000 ^{b)}	
	255	14500 ^{b)}			257 Sch	18000 ^{b)}	
3	487	127000 ^{b)}	485 [8]	1a	489	124500 ^{a)}	485 [14]
	320	17600 ^{b)}		3a	488	126500 ^{a)}	478 [14]
	297	18700 ^{b)}					482 [14]
	~284 Sch	~18000 ^{b)}		4a	488	99500 ^{a)}	
	249	20000 ^{b)}					

a) In CHCl₃.

b) In CH₂Cl₂.

c) Extinktionswerte nicht angegeben.

d) Sch = Schulter.

e) Bande stark asymmetrisch.

quantitativen Angaben. Interessant ist hier das UV.-Spektrum der von uns zum erstenmal hergestellten 15-*cis*-Verbindung **2**. Es zeigt neben der hypsochrom verschobenen Hauptabsorption bei 478 nm ($\epsilon = 60900$) den erwarteten *cis*-Pik bei 375 nm ($\epsilon = 40300$).

NMR.-Spektren. – Die im folgenden diskutierten ¹H- und ¹³C-NMR.-Spektren beweisen eindeutig, dass die Verbindungen **1**, **3** und **5** die all-*trans*, die Verbindung **2** die 15-*cis*-Konfiguration besitzen, wie dies aufgrund der Synthesen zu erwarten war.

Die 270-MHz-¹H-NMR.-Spektren der racemischen und der optisch einheitlichen 3*S*,3'*S*-Formen von **1** bzw. von **3** waren erwartungsgemäss in allen Einzelheiten identisch, da sich die beim Racemat möglichen Diastereomerenpaare wegen der grossen Entfernung der beiden Zentren NMR.-spektroskopisch nicht mehr unterscheiden.

¹H-NMR.-Daten. – Wie wir bereits früher zeigten, lassen sich die ¹H-NMR.-Spektren von Carotinoiden im allgemeinen vollständig analysieren, wenn die Aufnahme bei hinreichend grosser Messfrequenz bzw. Magnetfeldstärke erfolgt, wie sie heute bei Spektrometern mit supraleitenden Magneten verfügbar ist [16]. Erfahrungsgemäss erscheinen dann oft auch die Signale der olefinischen Protonen soweit getrennt, dass sich die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten mit hinreichender Genauigkeit durch einfache Analyse 1. Ordnung aus den Spektren entnehmen lassen. Hinzu kommt, dass sich unter derartigen experimentellen Bedingungen die Zuordnung der verschiedenen Protonen auch durch FT-Doppelresonanzexperimente bestätigen lässt, wenn die miteinander gekoppelten Protonen einen Verschie-

bungsunterschied von mindestens 0,1 ppm aufweisen. So liessen sich die 270-MHz- ^1H -NMR.-Spektren der Verbindungen **1**, **2**, **3** und **5** vollständig analysieren, wobei wir die bereits früher mitgeteilten Daten einiger verwandter Carotinoide, vor allem all-*trans* und 15-*cis*- β,β -Carotin sowie Canthaxanthin zugrunde legen konnten [16]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. ^1H -NMR.-Daten (chemische Verschiebungen in ppm, 270 MHz; CDCl_3) von *Astaxanthin* (**1**), 15-*cis*-*Astaxanthin* (**2**), *Astaxanthindiacetat* (**3**) und 15,15'-*Didehydroastaxanthin* (**5**)

Verbindung	Olefinische Protonen an						
	C(7,7')	C(8,8')	C(10,10')	C(11,11')	C(12,12')	C(14,14')	C(15,15')
1	6,21	6,43	6,30	6,66	6,45	~6,30	~6,68
2	6,22	6,44	6,30	6,70	6,51	~6,72	~6,45
3	6,21	6,42	6,30	6,67	6,46	~6,32	~6,68
5	6,24	6,41	6,27	6,72	6,45	5,79	–

Verbindung	Methylgruppen an			
	C(1,1')	C(5,5')	C(9,9')	C(13,13')
1	1,32	1,21	1,95	1,99
2	1,33	1,21	1,95	1,99
3	1,35	1,23	1,91	1,99
5	1,32	1,21	1,94	2,13

Verbindung	Sonstige				Kopplungen in Hz			
	H-C(2,2') ax.		H-C(3,3')	OH/OAc	$ J_{\text{gem}} $	$J_{2e,3a}$	$J_{2a,3a}$	J_{OH}
1	1,82	2,16	4,32	3,70	12,7	5,7	14	1,8
2	1,82	2,16	4,33	3,07	12,7	5,7	14	1,7
3	2,06	2,01	5,53	2,19	~13	6,5	13	–
5	1,82	2,16	4,33	3,69	12,7	5,7	14	2,0

Leicht erkennbar in den Spektren der vier Verbindungen sind jeweils die *AB*-Spektren von H-C(7,7') und H-C(8,8') mit $J_{AB} = 16,3 \pm 0,2$ Hz, wobei das erstere Dublett wegen der zusätzlichen Kopplung mit den $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(5,5')$ -Protonen deutlich verbreitert erscheint. Die Zuordnung der Protonen an C(10,10'), C(11,11') und C(12,12') erfolgt aufgrund der zu erwartenden Kopplungen. Es wurden folgende Werte beobachtet:

$$J_{10,11} = 11,5 \pm 0,3 \text{ Hz}$$

$$J_{11,12} = 14,7 \pm 0,3 \text{ Hz}$$

Damit liegt aufgrund dieser Ergebnisse bei allen Verbindungen die *trans*-Konfiguration von $\Delta^{7,7}$ und $\Delta^{11,11}$ eindeutig fest.

Die Protonen an C(14,14') und C(15,15') ergeben bei derartigen Verbindungen ein leicht erkennbares, nahezu symmetrisches *AA'BB'*-Spektrum, dessen Unsymmetrie in der durch Kopplung mit den Methylprotonen an C(13,13') hervorgerufenen Ver-

breiterung des AA' -Halbspektrums besteht. Dies erlaubt eine eindeutige Zuordnung der beiden Protonensorten.

Ein strenger Beweis für die Δ^{15} -*trans*- bzw. der Δ^{15} -*cis*-Konfiguration wäre nun aus dem Wert der Kopplungskonstanten $J_{15,15'}$ abzuleiten, welcher im Prinzip durch Analyse des $AA'BB'$ -Teilspektrums zu bestimmen wäre. Unsere diesbezüglichen Versuche auch bei einigen anderen, ähnlichen Fällen haben aber ergeben, dass hierfür möglichst auch die Frequenzen einiger schwacher Nebenlinien des $AA'BB'$ -Spektrums bekannt sein sollten. Diese Signale sind aber bei derartig stark überlappenden Spektren auch bei gutem Signal-Rauschverhältnis nur selten zu beobachten, so dass hier die Kopplungskonstanten meist nicht mit befriedigender Genauigkeit ermittelt werden können.

Der Nachweis der 15-*cis*-Struktur von **2** lässt sich aber in einfacher Weise allein aus den Werten für die chemischen Verschiebungen der Protonen an C(14, 14') bzw. C(15, 15') führen, die direkt als Schwerpunkte der beiden annähernd symmetrischen Halbspektren gemessen werden können. Bei all-*trans*- und 15-*cis*- β , β -Carotin war nämlich beobachtet worden [16], dass die Isomerisierung zu einer Verschiebung der Signale der Protonen an C(15, 15') um ca. 0,23 ppm nach höherem Feld führt, während umgekehrt die Signale der Protonen an C(14, 14') infolge ihrer starken sterischen Wechselwirkung um etwa 0,42 ppm nach tieferem Feld verschoben werden. Dies wurde auch hier bei der Verbindung **2** beobachtet. Die Zuordnung der beiden Halbspektren zu den beiden Protonensorten wurde zusätzlich noch durch Doppelresonanz gesichert: Einstrahlung mit einer bei etwa 6,71 ppm gelegenen Entkopplungsfrequenz (überlagerte Signale von H-C(14, 14') und H-C(11, 11')) bewirkte einen kräftigen Anstieg des Signals bei 1,995 ppm, welches den Methylgruppen an C(13, 13') zugeordnet werden muss. Weitere Doppelresonanzexperimente bestätigten ausserdem die Verknüpfung der Signale bei 6,30 ppm (H-C(10, 10')) und 2,01 ppm (H₃C-C(9, 9')) sowie 6,22 ppm (H-C(7, 7')) und 1,95 ppm (H₃C-C(5, 5')).

Für die Beurteilung der später noch zu diskutierenden CD.-Resultate ist ferner von Bedeutung, dass die Konformation des 3-OR-substituierten Cyclohexenrings bei allen Verbindungen offenbar dieselbe ist, wie aus den Werten der Kopplungskonstanten gemäss Tabelle 2 ersichtlich wird. Der grosse Wert von $J_{2a,3a} \sim 13$ –14 Hz deutet bei allen Verbindungen auf eine Halbsesselkonformation des Ringes mit *trans*-diaxialen Protonen an C(2, 2') und C(3, 3') hin.

Überprüfung der optischen Reinheit. – Vor der ¹H-NMR.-spektroskopischen Prüfung der optischen Reinheit des synthetischen (3*S*, 3'*S*)-Astaxanthins mit dem chiralen Verschiebungsreagens d-Eu(hfc)₃ wurden zunächst entsprechende Experimente mit der racemischen Verbindung durchgeführt. So wurden im 100-MHz-Spektrum des Racemats bei insgesamt 5 Konzentrationen bis zum Verhältnis ca. 1:1 von Substanz und Verschiebungsreagens die induzierten Verschiebungen der einzelnen Methylsignale nach tieferem Feld verfolgt, die in guter Näherung proportional zur Konzentration des Verschiebungsreagens erfolgten. Es zeigt sich, dass vor allem das Signal der Methylgruppen an C(5, 5') und eines der Signale der Methylgruppen an C(1, 1'), welches ursprünglich bei 1,21 ppm gelegen war, bei Anwesenheit beider Antipoden deutlich aufspalten, so dass diese Signale gut zur Messung der optischen Reinheit geeignet erscheinen. Beim Konzentrationsverhältnis 1:1 wurden folgende Eu(hfc)₃-induzierten Verschiebungen $\Delta\delta$ (1:1) gemessen:

	Methylgruppe an				
	C(1,1')	C(5,5')	C(9,9')	C(13,13')	
$\delta^a)$	1,21	1,32	1,95	2,00	1,99
$\Delta\delta$ (1:1) ^{b)}	1,74	2,05	1,33	~0,47	0,11
	1,81		1,37	~0,49	

a) Chemische Verschiebung in ppm ohne Zusatz eines Verschiebungsreagens.

b) Zusätzliche Verschiebung in ppm nach Zusatz von $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ im Mol.-Verhältnis Substanz/Verschiebungsreagens 1:1.

Die bei drei Konzentrationen bei 270 MHz aufgenommenen Spektren von (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin ergaben keine Hinweise auf das Vorhandensein des Antipoden. Eine Abschätzung ergab, dass die optische Reinheit der Probe mit Sicherheit über 95% lag.

Die mit zunehmender Konzentration des Verschiebungsreagens beobachtete Verschiebung der Signale der olefinischen Protonen nach tieferem Feld bestätigte im übrigen nochmals und in unabhängiger Weise die getroffenen Zuordnungen: Die durch das Verschiebungsreagens induzierten Verschiebungen nahmen in der Reihenfolge der Protonen an C(7,7'), C(8,8'), C(10,10'), C(11,11'), C(12,12'), C(14,14') und C(15,15') wie erwartet ab. In analoger Weise konnte die Zuordnung der Signale der Methylgruppen an C(9,9') und C(13,13') bestätigt werden.

Bei Zugabe von 2,5 mg (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin zu einer Lösung von 5 mg racemischer Verbindung mit 10,5 mg $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ in 0,4 ml CDCl_3 nahm eindeutig die bei *höherem* Feld gelegene Komponente der beiden $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(5,5')$ -Signale an Intensität zu. Das bedeutet also, dass unter den angegebenen experimentellen Bedingungen hier die (3*S*,3'*S*)-Komponente eine *kleinere* Verschiebung nach tieferem Feld aufwies, was im Gegensatz zu der in [13] angegebenen Beobachtung ist. Eine Deutung dieser gegensätzlichen Befunde ist uns jedoch bisher aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich.

Weitere Experimente mit dem chiralen Verschiebungsreagens $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ ergaben auch bei den (3*S*,3'*S*)-Verbindungen **3** und **5** keine Hinweise auf das Vorhandensein der optischen Antipoden.

^{13}C -NMR.-Spektren. – Das ^{13}C -NMR.-Spektrum von all-*trans*-Astaxanthin wurde bereits an anderer Stelle vollständig zugeordnet [17]. Die Zuordnung insbesondere auch der Signale der konjugierten Kette erfolgte damals im wesentlichen in Analogie zu derjenigen bei Canthaxanthin (Verbindung **97** von [17]), dessen Zuordnung seinerseits in eindeutiger Weise durch Anwendung des Verschiebungsreagens $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ erfolgt war. In Tabelle 3 wurden nun die Daten der Verbindungen **1**, **2**, **3** und **5** zusammengestellt.

Die Richtigkeit der früher für **1** getroffenen Zuordnungen konnte inzwischen an der Verbindung **3**, ebenfalls durch Verwendung des Verschiebungsreagens $\text{Yb}(\text{dpm})_3$, gesichert werden. Die bis zum Molverhältnis 1:1 bei fünf Konzentrationen gemessenen Verschiebungen nach tieferem Feld gestatteten wie früher eine sichere Zuordnung der Signale, da die durch $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ induzierten Verschiebungen mit steigendem Abstand von der Komplexbildungsstelle in der Molekel, also hauptsächlich dem Acetyl-

Tabelle 3. ^{13}C -NMR.-Verschiebungen in ppm (22,65 MHz; CDCl_3) von Astaxanthin (1), 15-cis-Astaxanthin (2), Astaxanthindiacetat (3) und 15,15'-Didehydroastaxanthin (5). In Klammern: $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ -induzierte Verschiebungen (in ppm) für (1:1)-Verhältnis von Substanz und Verschiebungsreagens

Verbindung	Endgruppe						Sonstige
	1,1'	2,2'	3,3'	4,4'	5,5'	6,6'	
1	36,8	45,6	69,2	200,3	126,9	162,4	
2	36,8	45,5	69,2	200,4	126,9	162,1	
3	37,0 (1,8)	42,7 (3,6)	71,0 (7,3)	193,4 (7,3)	128,4 (3,4)	160,3 (1,7)	CO: 170,1; CH_3 : 20,8 (16,7) (5,0)
5	36,8 (0,8)	45,5 (1,4)	69,2 (2,9)	200,4 (2,3)	127,1 (1,2)	161,9 (0,6)	

Verbindung	Kette									
	7,7'	8,8'	9,9'	10,10'	11,11'	12,12'	13,13'	14,14'	15,15'	
1	123,3	142,2	134,7	135,1	124,6	139,7	136,7	133,8	130,7	
2	123,4	142,2	134,7	135,1	125,0	139,9	137,3	128,1	126,2	
3	123,2 (0,8)	142,1 (0,5)	134,5 (0,2)	135,1 (0,13)	124,6 (0,09)	139,7 (0,07)	136,6 (-0,07)	133,8 (0,0)	130,7 (0,0)	
5	124,0 (0,2)	141,9 (0,0)	136,0 (-0,2)	134,4 (-0,2)	126,6 (-0,2)	137,3 (0,0)	146,6 (-0,2)	112,1 (0,07)	98,7 (-0,2)	

Verbindung	Methylgruppen					Bemerkungen
	1,1'-	5,5'-	9,9'	13,13'		
1	30,8	26,2	13,9	12,6	12,8	
2	30,7	26,2	13,9	12,5	12,5	CW-offset ^1H -Entkopplung.
3	30,5 (1,0)	26,3 (0,8)	14,0 (1,9)	12,5 (0,26)	12,7 (0,06)	CW-offset ^1H -Entkopplung, $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ -Messung. gemessene δ (1:1)-Werte.
5	30,7 (0,4)	26,1 (0,4)	13,9 (0,6)	12,6 (0,0)	15,3 (0,0)	CW-offset ^1H -Entkopplung, $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ -Messung. Aus δ (3:1) extrapolierte δ (1:1)-Werte.

Sauerstoff, abnehmen. Die beim Verhältnis 1:1 erhaltenen zusätzlichen Verschiebungswerte δ (1:1) wurden ebenfalls in Tabelle 3 angegeben.

Verbindungen mit 3-OR-substituierten β -4-Keto-Endgruppen erfahren offenbar wesentlich kleinere, durch $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ induzierte Signal-Verschiebungen als solche mit unsubstituierten β -4-Keto-Endgruppen wie beispielsweise Canthaxanthin. Während im letzteren Fall nämlich die durch $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ -induzierten δ (1:1)-Werte von etwa 42 ppm bei C(4,4') bis auf 0,14 ppm bei C(15,15') abnehmen und somit eine eindeutige Zuordnung aller Signale ermöglicht wird, konnten bei 3 und 5 nur deutlich kleinere Verschiebungen gemessen werden. So sind bei der letzteren Verbindung die δ -Werte nur bis einschliesslich C(7,7') signifikant verschieden. Die Zuordnung der übrigen Signale erfolgte daher in Analogie zu 3 bzw. zu der bereits früher behandelten Verbindung 15,15'-Didehydrocanthaxanthin (vgl. 98 von [17]).

Bei der Zuordnung der Signale von C(13, 13'), C(14, 14') und C(15, 15') der 15-*cis*-Verbindung **2** konnten wir auf die früher für β, β -Carotin und 15-*cis*- β, β -Carotin angegebenen Zuordnungen zurückgreifen. Die dort insbesondere für C(14, 14') und C(15, 15') getroffenen Zuordnungen konnten inzwischen von Moss [18] durch Untersuchung der 15, 15'-deutierten Verbindung gesichert werden.

Die beim Übergang von **1** nach **2** beobachteten Verschiebungsänderungen $\Delta = \delta_{cis} - \delta_{trans}$ betragen: C(11, 11'): 0,4 ppm; C(12, 12'): 0,2 ppm; C(13, 13'): 0,6 ppm; C(14, 14'): -5,7 ppm; C(15, 15'): -4,5 ppm.

Diese Werte stimmen gut mit denjenigen von β, β -Carotin und seinem 15-*cis*-Isomeren überein und dürften somit ebenfalls generell für die Identifizierung von 15-*cis*-Isomeren geeignet sein.

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Methylgruppen an C(9, 9') bzw. C(13, 13') beweisen übrigens zweifelsfrei die *trans*-Konfiguration dieser Doppelbindungen [17], so dass zusammen mit den oben diskutierten ¹H-NMR.-Ergebnissen die Konfiguration aller Doppelbindungen bei den hier untersuchten Verbindungen eindeutig festliegt.

Circulardichroismus (CD). – Die bisher veröffentlichten CD.-Kurven von Astaxanthin [8] [12] [13] sind auf den Bereich von ca. 220–450 nm beschränkt und zeigen ausserdem nur den qualitativen Verlauf ohne Skalenangabe der Ordinate ($\Delta\epsilon$, bzw. Elliptizität θ). In der Figur geben wir die CD.-Spektren von **1**, **2** und **5** auch im Bereich der Hauptabsorptionsbande wieder. Im experimentellen Teil sind ausserdem die CD.-Daten von **3** und **4** sowie von (3*R*, 3'*R*)-Zeaxanthin (= (3*R*, 3'*R*)- β, β -Carotin-3, 3'-diol) zum Vergleich aufgeführt. CD.-Kurven von Zeaxanthin im Bereich $\lambda < 450$ nm sind schon verschiedentlich veröffentlicht und mit demjenigen von Astaxanthin verglichen worden [8]. Wir geben hier zusätzlich auch die CD.-Daten unter der Hauptabsorptionsbande.

(3*S*, 3'*S*)-Astaxanthin (**1**) und die beiden untersuchten Ester **3** und **4** zeigen qualitativ gleiche, quantitativ nur wenig verschiedene CD.-Daten. Die Verbindung **4** hat allerdings deutlich niedrige $\Delta\epsilon$ -Werte (und auch Extinktionskoeffizienten), was möglicherweise auf eine etwas geringere Reinheit der Probe zurückzuführen sein dürfte. Gegenüber **1** ist bei der Didehydro-Verbindung **5** das gesamte Spektrum (CD.- und Absorption) um ca. 30–35 nm nach kürzeren Wellenlängen verschoben. Berücksichtigt man diese Verschiebung, so ist das CD.-Spektrum von **5** demjenigen von **1** sehr ähnlich. Die Form und Feinstruktur der Banden sind jedoch deutlich verschieden, auch die $\Delta\epsilon$ -Werte der Maxima. Auch die CD.- und Absorptionsspektren von Zeaxanthin zeigen gegenüber **1** eine hypsochrome Verschiebung [8].

Beim (3*S*, 3'*S*)-15-*cis*-Astaxanthin (**2**) liegen nun aber offenbar grundsätzlich andere Verhältnisse vor. Das CD.-Spektrum sieht auf den ersten Blick wie ein Spiegelbild desjenigen der all-*trans*-Verbindung aus. Das negative Maximum (neg. Max.) bei 380 nm ist aber mit $\Delta\epsilon = -24$ viel stärker als das positive der all-*trans*-Verbindung bei etwa derselben Wellenlänge (384 nm, $\Delta\epsilon = 6,7$). Da die absolute Konfiguration und, wie die hier mitgeteilten ¹H-NMR.-Daten zeigen, auch die Konformation der Endgruppen von **1** und **2** identisch sind, bedarf somit jede Theorie, die das CD.-Spektrum allein aus der Konfiguration des chiralen Zentrums und der Konformation der Endgruppen zu erklären sucht [8], einer Erweiterung. Eine Vorzeichenumkehr beim Über-

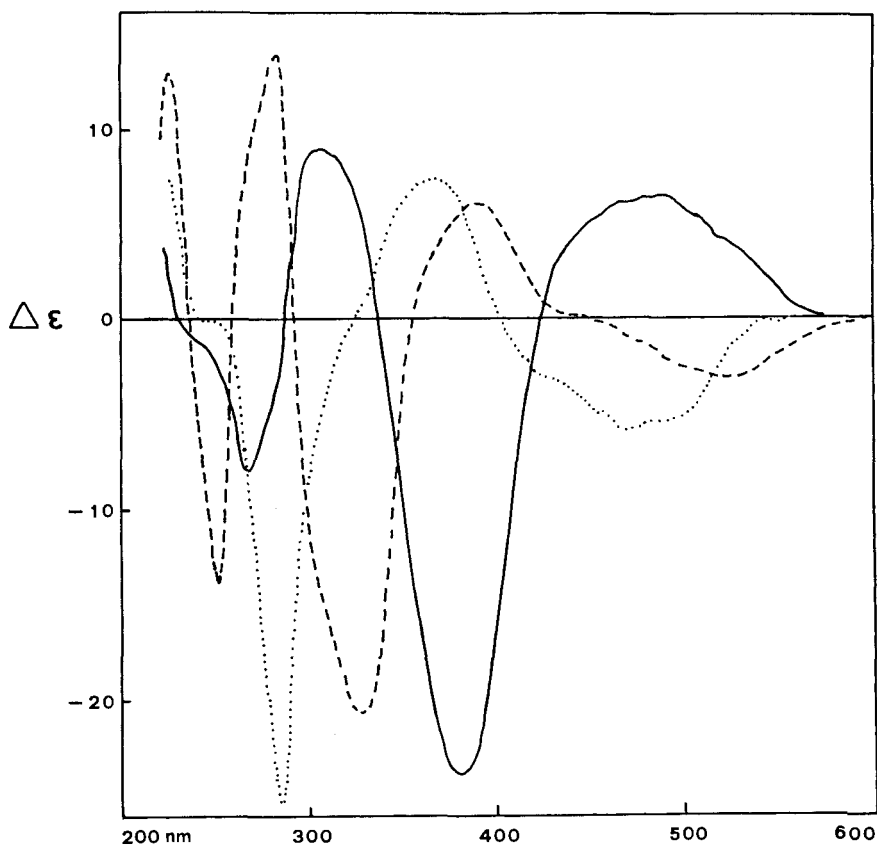


Fig. CD.-Spektren (λ_{\max} ($\Delta\epsilon$), in CH_2Cl_2)

- (3S,3'S)-Astaxanthin (1): 521 (-3,2 sehr breit); 384 (+6,7); 323 (-23,1); 280 (+12,5); 249 (-14,4); 224 (+12,8) nm
 — (3S,3'S)-15-cis-Astaxanthin (2): 477 (+6,3, sehr breit); 380 (-24,0); 305 (+9,0); 266 (-8,0) nm
 (3S,3'S)-15,15'-Didehydroastaxanthin (5): 466 (-5,9); 365 (+7,5); 282 (-25,5) nm

gang von all-*trans*- zu *cis*-Carotinoiden wurde übrigens schon früher bei Fucoxanthin [19] und Violaxanthin [20] beobachtet. Demnach sind die Verhältnisse doch komplizierter als bisher angenommen wurde. Das starke neg. Max. bei 380 nm bei **2** erscheint bei derselben Wellenlänge wie der *cis*-Pik im Absorptionsspektrum. Aber auch alle hier untersuchten all-*trans*-Verbindungen haben bei derselben Wellenlänge (evtl. unter Berücksichtigung der oben erwähnten hypsochromen Verschiebung) ein CD.-Maximum, jedoch mit positivem Vorzeichen. Bei **5** und Zeaxanthin kann man auch im Absorptionsspektrum an dieser Stelle eine Schulter erkennen. Dass diese nicht auf etwa in Spuren vorhandener *cis*-Verbindung beruht, folgt daraus, dass im CD. das entsprechende Maximum entgegengesetztes Vorzeichen wie bei der *cis*-Verbindung besitzt. Bei **1**, **3** und **4** ist der abfallende Ast der Hauptabsorption so breit, dass im Bereich um 380 nm keine Schulter zu erkennen ist. 15-*cis*-Astaxanthin lagert sich bei Raumtemperatur unter Lichteinfluss im CD.-Spektrometer ziemlich rasch teilweise in die all-*trans*-Verbindung um, wobei das neg. Max. schliesslich sein Vor-

zeichen umkehrt. Auch bei (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin haben wir ähnliche Effekte in umgekehrter Richtung beobachtet. Bekanntlich katalysiert Jod die Umlagerung zu einem Gleichgewicht der all-*trans*-Form und verschiedenen *cis*-Isomeren [21]. Nach Zugabe einer Spur Jod zu einer Lösung von all-*trans*-(3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin kehrt das pos. Max. bei ca. 350 nm sein Vorzeichen um. Der $\Delta\epsilon$ -Wert des CD.-Maximums bei 350 nm (bzw. bei 380 nm im Fall von Astaxanthin) ist also ein empfindliches Kriterium für die Anwesenheit von *cis*-Isomeren.

Für die übrigen CD.-Banden lassen sich nicht überall entsprechende Absorptionsbanden finden. Auffällig ist auch, dass bei den drei *trans*-Verbindungen (1, 5, 6) das langwelligste CD.-Maximum nicht genau mit dem Absorptionsmaximum zusammenfällt, sondern ca. 15–30 nm langwelliger auftritt. Bei 15-*cis*-Astaxanthin ist die spektrale Lage der langwelligsten CD.- und Absorptionsbande gleich.

Die absolute Konfiguration der beschriebenen Verbindungen liegt durch den Syntheseweg eindeutig fest und die NMR.-Spektren geben sowohl detaillierte Auskunft über die Konformation der Endgruppen als auch über die Konfiguration aller Doppelbindungen. Daher folgt aus den CD.-Daten, dass eine eindeutige Korrelation zwischen CD.-Spektrum einerseits und absoluter Konfiguration des chiralen Zentrums und der Konformation der Endgruppe andererseits nur dann möglich ist, wenn die Geometrie der olefinischen Kette sicher bekannt ist. Es scheint aufgrund dieser theoretisch noch nicht deutbaren Befunde auch durchaus möglich, dass der Charakter des CD.-Spektrums nicht nur durch *cis*-Isomerisierung, sondern auch durch chemische Änderungen in der olefinischen Kette in stärkerem Masse beeinflusst werden könnte, als dies bisher angenommen wurde.

Experimenteller Teil

Substanzen. – Über die Herstellung der Substanzen soll an anderer Stelle ausführlich berichtet werden [11]. Das von uns totalsynthetisch hergestellte (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin (1) zeigte dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Lösungsmittelsystemen nur einen Fleck. Dadurch ist mit einiger Sicherheit die Anwesenheit von *cis*-Isomeren auszuschliessen, ein Befund, der sich auch durch ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektroskopie bestätigen liess.

Schmelzpunkte (Literaturwerte in Klammern): – 1: 217–219° (216° [7]); 2: 90–93°; 3: 187–189° (203–205° [7]); 4: 76–78° (71,5–72,5° [7]); 5: 210°; 1a: 216–218° (182–183° [14]); 3a: 189–191°; 4a: 92–94°.

^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren. – Die Aufnahme der 270-MHz- ^1H -NMR.-Spektren erfolgte mittels Fourier-Transformationstechnik auf einem Bruker-Spectrospin Spektrometer HX-270 mit supraleitendem Magnet und BNC 80-Computer mit 40 K-Speicher. Es wurden Lösungen von etwa 5 mg in 0,4 ml CDCl_3 mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard untersucht, wobei i. a. nur etwa 10 bis 20 freie Induktionszerfälle im 32 K-Speicher aufsummiert wurden. Die Proben temperatur betrug ca. 21°. In Ausnahmefällen wurden auch Messungen bei 100 MHz (Varian HA-100; ca. 10 mg in 0,4 ml CDCl_3) durchgeführt.

Die ^{13}C -NMR.-Spektren wurden bei 22,65 MHz auf einem HX-90/15 der Fa. Bruker-Spectrospin mit Nicolet-Computer 1083 (12 K) aufgenommen. Als Lösungsmittel diente ebenfalls CDCl_3 mit TMS als internem Standard. Die Proben temperatur lag bei ca. 30°C.

Die Verschiebungsreagentien $\text{Yb}(\text{dpm})_3$ und $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ (Tris[3-(Heptafluorpropylhydroxymethylen)-d-camphorato]Eu(III)) wurden von den Firmen Stohler Isotope Chemicals bzw. Aldrich bezogen und ohne weitere Behandlung verwendet.

UV.-Spektren. – Die Absorptionsspektren wurden in CHCl_3 mit einem Spektralphotometer Modell DK 2 A von Beckman oder in CH_2Cl_2 mit einem Spektralphotometer Model 124 von Perkin-Elmer-Hitachi aufgenommen.

CD.-Messungen. – Sie wurden in CH_2Cl_2 mit einem Dichrographen *Mark II* von *Jouan* (Paris) mit einer 450 Watt-Xenon-Hochdrucklampe durchgeführt. Es wurden Küvetten von 1 bis 10 mm Schichtdicke verwendet. Jeweils vor und nach der CD.-Messung wurde ein Absorptionsspektrum zur Kontrolle auf etwaige Veränderung der Probe aufgenommen. Die Reproduzierbarkeit der $\Delta\epsilon$ -Werte ist $\pm 10\%$ (ausser unter der Hauptabsorptionsbande).

Für die Messungen im Bereich der Hauptabsorptionsbande wurde eine besondere Technik verwendet. Wie bei allen CD.-Messungen wurden die Daten für eine Computerauswertung auf Lochstreifen gespeichert. Da wegen des ungünstigen $\Delta\epsilon/\epsilon$ -Verhältnisses sehr langsam und mit hoher Zeitkonstante (10 Sek.) registriert werden musste, wurden die Lösungen in einer Kühlküvette auf -30° gehalten, um Zersetzung zu vermeiden. Es wurde jeweils eine Nulllinie, darauf 2mal das Spektrum der Probe und am Ende nochmals eine Nulllinie registriert. Mit Hilfe eines Computers wurde der Mittelwert der beiden Nulllinien vom Mittelwert der Spektren subtrahiert und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis weiter mit einer Glättungsfunktion verbessert. Der Messfehler dürfte $\pm 30\%$ nicht übersteigen (die Ausschläge im Maximum betragen $3-8 \times 10^{-5} \Delta\epsilon$). Die maximale optische Dichte war $< 1,3$. In zwei Fällen wurden zusätzlich CD.-Spektren mit maximaler optischer Dichte von 1,8 ohne Änderung des Resultates gemessen.

CD.-Daten(λ_{max} ($\Delta\epsilon$) in nm, in CH_2Cl_2). – (3S,3'S)-*Astaxanthindiacetat* (3): 387 (+4,5); 321 (-19,6); 278 (+12,1); 248 (-14,7). – (3S,3'S)-*Astaxanthindipalmitat* (4): 385 (+3,7); 320 (-16,4); 279 (+11,5); 248 (-13,0). – (3R,3'R)-*Zeaxanthin*: 490 (-2,5); 348 (+3,7); 290 (-14,6); 251 (+8,1); 225 (-7,7).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *T. W. Goodwin*, 'The Comparative Biochemistry of the Carotenoids', Chapman and Hall, London 1952.
- [2] *R. Kuhn, J. Stene & N. A. Sörensen*, Ber. deut. chem. Ges. 72, 1688 (1939).
- [3] *D. L. Fox & T. S. Hopkins*, Comp. biochem. Physiol. 17, 841 (1966).
- [4] *F. Leuenberger & H. Thommen*, F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [5] *W. J. Hsu, D. B. Rodriguez & C. O. Chichester*, Int. J. Biochemistry 3, 333 (1972).
- [6] *O. Völker*, Wiss. Veröff. Deutch. Ges. Ernähr. 9, 282 (1963).
- [7] *R. Kuhn & N. A. Sörensen*, Ber. deut. chem. Ges. 71, 1879 (1938).
- [8] *A. G. Andrewes, G. Borch, S. Liaaen-Jensen & G. Snatzke*, Acta chem. scand. B 28, 730 (1974).
- [9] *G. Lambertsen & O. R. Braekkan*, J. Sci. Food Agric. 22, 99 (1971).
- [10] *H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer & R. Zell*, Helv. 59, 1832 (1976).
- [11] *F. Kienzle et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [12] *A. Veerman, G. Borch, R. Pedersen & S. Liaaen-Jensen*, Acta chem. scand. B 29, 525 (1975).
- [13] *A. G. Andrewes & M. P. Starr*, Phytochemistry 15, 1009 (1976).
- [14] *R. D. G. Cooper, J. B. Davis, A. P. Leftwick, C. Price & B. C. L. Weedon*, J. chem. Soc. Perkin I, 1975, 2195.
- [15] *M. Buchwald & W. P. Jencks*, Biochemistry 7, 834 (1968).
- [16] *W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi & U. Schwieter*, Carotenoids, Kapitel IV: Spectroscopic Methods, O. Isler, Editor, Birkhäuser Verlag, Basel 1971, S. 189.
- [17] *G. Englert*, Helv. 58, 2367 (1975).
- [18] *G. P. Moss*, Pure appl. Chemistry 45 (1976), in Press.
- [19] *K. Bernhard, G. P. Moss, G. Tóth & B. C. L. Weedon*, Tetrahedron Letters 1974, 3899.
- [20] *G. P. Moss, J. Szabolcs, G. Tóth & B. C. L. Weedon*, Acta chim. Acad. Sci. Hung. 87, 301 (1975).
- [21] *L. Zechmeister*, Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolynes, Springer-Verlag, Wien 1962.