

174. Beitrag zur Analytik und Synthese von 3-Hydroxy-4-oxocarotinoiden¹⁾²⁾

von Robert K. Müller, Kurt Bernhard, Hans Mayer, August Rüttimann und Max Vecchi

Abteilung für Vitamin- und Ernährungsforschung und Zentrale Forschungseinheiten,
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, 4002 Basel

Herrn Dr. O. Isler zum 70. Geburtstag gewidmet

(7. VI. 80)

Contribution to the Analytical Separation and the Synthesis of 3-Hydroxy-4-oxocarotenoids

Summary

(3*RS*,3'*RS*)-Astaxanthin (= 3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione, 1:1-mixture of racemate and *meso*-form; **1**) can be separated into its optical isomers (3*S*,3'*S*)-**1a**, (3*R*,3'*R*)-**1b** and *meso*-(3*R*,3'*S*)-**1c** via the corresponding diastereomeric di(-)-camphanates. Some aspects of the configurational stability of astaxanthin are discussed. - HPLC. analysis of the (-)-camphanates of 3-hydroxy-4-oxocarotenoids provides, in suitable cases and supported by spectroscopic data, an analytical method for the simultaneous determination of constitution and chirality.

Die Konstitution von Astaxanthin (**1**) wurde bereits 1938 von Kuhn & Sørensen [1] als 3,3'-Dihydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion erkannt. Für das aus der grünen Alge *Haematococcus pluvialis* gewonnene Astaxanthin wurde 1974 aufgrund von Vergleichen von CD.-Spektren sowie durch Konformationsanalysen die (3*S*,3'*S*)-Konfiguration bestimmt [2]. In der Folge wurde an einigen weiteren Proben aus natürlichen Quellen mittels CD.-Vergleich die (3*S*,3'*S*)-Konfiguration abgeleitet [3] [4]. Im Jahre 1975 isolierten Andrewes *et al.* [5] aus der roten Hefe *Phaffia rhodozyma* (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin (**1b**). Dieser Befund liess den Wunsch nach einer analytischen Methode zur Bestimmung der Astaxanthin-Konfigurations-Isomeren **1a**, **1b** und **1c** akut werden.

Die von Gerlach *et al.* [6] zur Racematspaltung von Alkoholen eingeführten Ester der (-)-Camphansäure haben sich allgemein als sehr geeignete Derivate zur Racematspaltung von α -Hydroxycarbonylverbindungen erwiesen [7]. Wir haben dieses Ergebnis zur Synthese verschiedener 3-Hydroxy-4-oxocarotinoide genutzt [7] [8] und zur Entwicklung einer Analysenmethode der bezüglich C(3) und C(3') konfigurationsisomeren Astaxanthine herangezogen [9].

1) Teilweise vorgetragen von R. K. Müller am 1st European Symposium on Organic Chemistry, Köln, 20.-23. August 1979.

2) 2. Mitt. der Reihe 'Natural Occurrence of Enantiomeric and *meso*-Astaxanthin' vgl. [10].

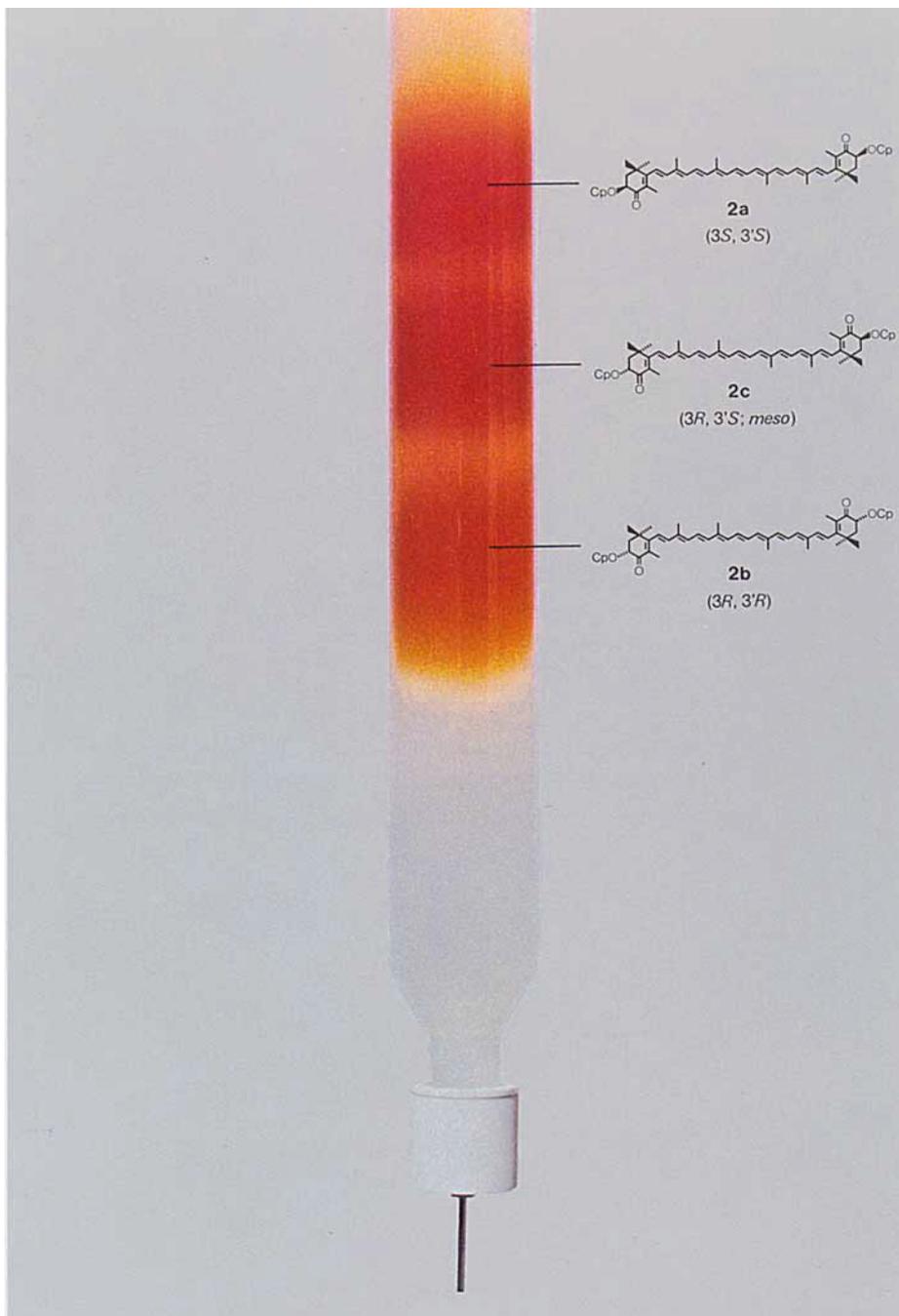


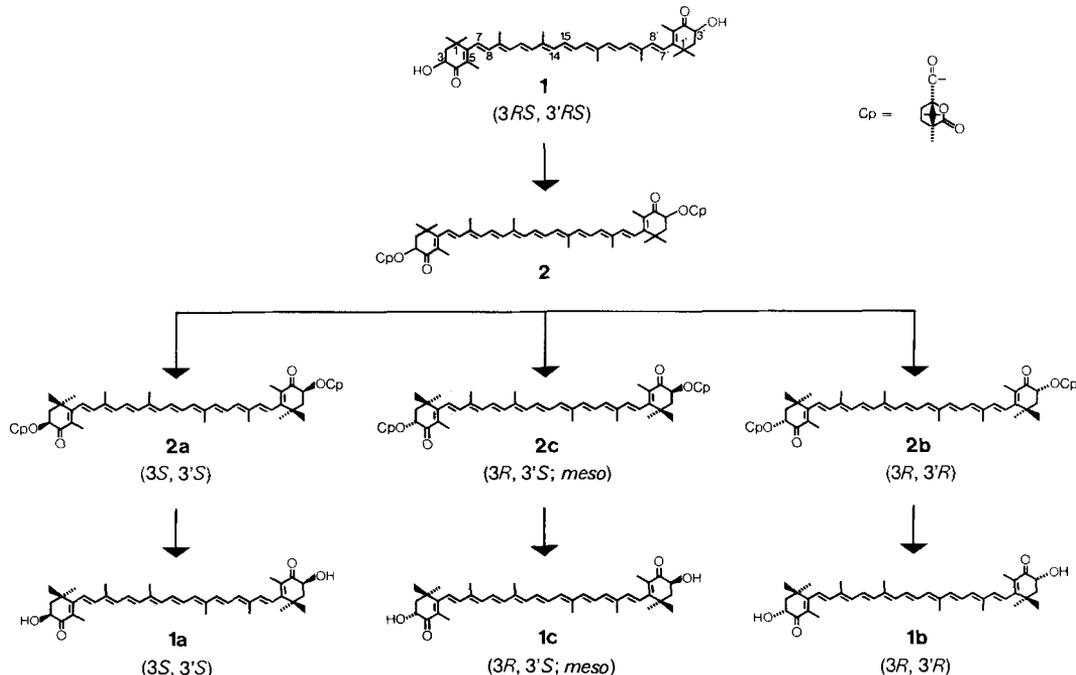
Fig. 1. Auftrennung des Gemisches Astaxanthin-di(-)-camphanat (2) an einer Merck-Lobar-Fertigsäule LiChrorep Si 60 (40-63 μm)

Wie in [10] kürzlich mitgeteilt, erwies sich das aus Hummereiern (*Homarus gammarus*) unter milden neutralen Bedingungen isolierte Astaxanthin als ein Gemisch von **1a**, **1b** und **1c**. Wir berichten im folgenden über die präparative Auftrennung von (3*RS*, 3'*RS*)-Astaxanthin (**1**) in die optischen Isomeren **1a**, **1b** und **1c** sowie über die Racematspaltung von Adonirubin (= 3-Hydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion; **5**). Einige orientierende Versuche zur Frage der konfigurativen Stabilität der 3-Hydroxy-4-oxocarotinoide werden beschrieben. Die bereits früher mitgeteilte Analysetechnik [9] wird auf ein Mehrkomponentengemisch angewandt.

Der Versuch zur Racematspaltung von Carotinoiden ist als wenig aussichtsreich beurteilt worden [11] [12]. Erschwerte Bedingungen sind durch die ausgeprägte chemische Reaktivität der Carotinoide gegeben, im besonderen durch den durch die Einwirkung von Wärme, Licht, Jod, Säuren und im Kontakt mit aktiven Oberflächen leicht erfolgenden Übergang der all-*trans*-Form in *cis/trans*-Gemische [13]. Dank der hervorragenden Eignung der Ester mit der (-)-Camphansäure zur Racematspaltung von α -Hydroxycarbonylverbindungen ist es im Falle von (3*RS*, 3'*RS*)-Astaxanthin (**1**; (1:1)-Gemisch von Racemat und *meso*-Form) gelungen, dieses Problem weitgehend in den Griff zu bekommen.

(3*RS*, 3'*RS*)-Astaxanthin (**1**) wurde mit (-)-Camphanoylchlorid in Pyridin unter Erhaltung der all-*trans*-Konfiguration mit nahezu quantitativer Ausbeute in das Estergemisch **2** übergeführt. Die Auftrennung desselben in **2a**, **2b** und **2c**

Schema 1. Herstellung der bezüglich C(3) und C(3') konfigurationsisomeren Astaxanthine **1a**, **1b**, **1c** aus (3*RS*, 3'*RS*)-Astaxanthin (**1**)



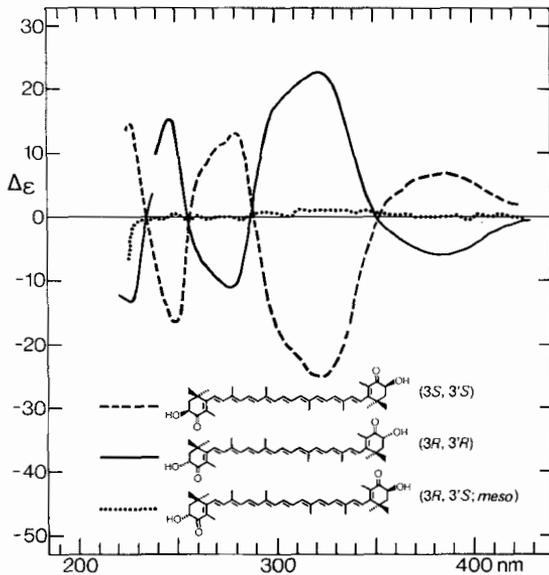
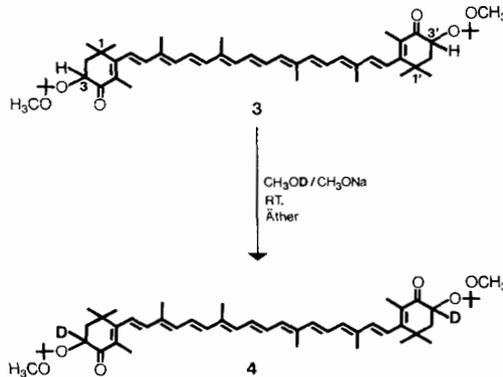


Fig. 2. CD.-Spektrn (CH_2Cl_2) der konfigurationsisomeren Astaxanthine

gelang durch Säulenchromatographie an Kieselgel einheitlicher Korngrösse (Eluierungsmittel Toluol/Äther/2-Propanol 89:9:2 (v/v), vgl. *Schema 1* und *Fig. 1*).

Die bezüglich C(3) und C(3') konfiguratv einheitlichen Ester **2a**, **2b** und **2c** wurden unter striktem Sauerstoffausschluss bei Raumtemperatur in Methylencchlorid/Methanol mit 2 Mol-Äquiv. Natriumhydroxid zu den entsprechenden Astaxanthinen **1a**, **1b** bzw. **1c** verseift. Dabei liess sich die sehr leicht eintretende Oxydation zu Astacin (=3,3'-Dihydroxy-2,3,2',3'-tetrahydro- β,β -carotin-4,4'-dion) weitgehend vermeiden. Zur Kontrolle wurden die Verseifungsprodukte in die Di(-)-camphanate bzw. Diacetate [14] übergeführt; deren HPLC.-Analyse zeigte, dass das in 60–75proz. Ausbeute kristallin gefasste Astaxanthin 3–5% des teilweise oxydierten 3,3'-Dihydroxy-2,3-didehydro- β,β -carotin-4,4'-dions enthielt. Unter

Schema 2. Einbau von Deuterium in (3RS,3'RS)-Astaxanthin-bis(1-methoxy-1-methyläthyl)äther (**3**)



den von uns gewählten Verseifungsbedingungen tritt üblicherweise in geringem Masse Racemisierung ein; in **1b**, das durch Verseifung von reinem **2b** ($\geq 99\%$) erhalten worden war, wurden nach Rückveresterung 2-6% *meso*-**2c** gefunden. Trotz dieser Vorbehalte entspricht das CD.-Spektrum von **1a** innerhalb der Fehlergrenze den Literaturwerten [15], vgl. *Figur 2*.

Die für Di(-)-camphanate gewonnenen Erkenntnisse lassen sich auf andere Ester übertragen. (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin (**1a**; HPLC.-Analyse des Di(-)-camphanats: 97,2% **2a**, 2,8% **2c**) wurde wie üblich [11] ins Diacetat übergeführt; in dem daraus nach Verseifung gewonnenen Astaxanthin wurde ein *meso*-Gehalt von 6,3% bestimmt.

Die 3,3'-Hydroxylgruppen des Astaxanthins sind konfiguratив bemerkenswert stabil. Für das von *Kienzle & Mayer* [11] erstmals synthetisierte **1a** wurde gemäss HPLC.-Analyse des entsprechenden Di(-)-camphanats ein Gehalt von mehr als 97,5% (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin (**1a**) ermittelt. In der Synthesesequenz hat die chirale Endgruppe offensichtlich stark saure und stark basische Bedingungen ohne wesentliche Racemisierung überstanden. Vollständig racemisieren lässt sich Astaxanthin, wenn das Bis(1-methoxy-1-methyläthyl)äther-Derivat **3** (*Schema 2*) 24 Std. bei RT. einer ätherischen Natriummethylatlösung ausgesetzt wird, wie der vollständige, spezifische Einbau von Deuterium in die Stellung C(3) bzw. C(3') mit dem entsprechenden deuterierten Reagens beweist (\rightarrow **4**); eine kürzere Reaktionsdauer führt zu partieller Racemisierung. So wurde in einer Probe von (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin-bis(1-methoxy-1-methyläthyl)äther (Reaktant: 97,2% **1a** und 2,8% **1c** gemäss HPLC.-Analyse des Di(-)-camphanats) nach Behandlung mit Natriummethylat in Tetrahydrofuran, saurer Hydrolyse und Rückveresterung folgende Astaxanthin-Zusammensetzung bestimmt: 74,4% **1a**, 23,8% **1c** und 1,7% **1b**.

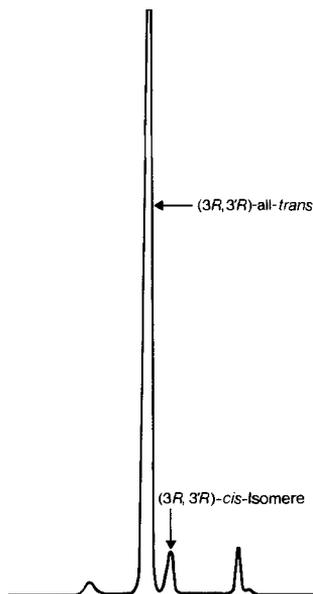


Fig.3. HPLC. der Astaxanthin-di(-)-camphanate ex *Phaffia rhodozyma*

In Zusammenhang mit der Isolierung von (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin (**1b**) aus *Phaffia rhodozyma* wurde auf den von *Englert, Kienzle & Noack* [15] gemachten Befund hingewiesen [16], dass auch 15-*cis*-Isomerie Anlass zu spiegelbildlichen CD.-Spektren geben kann. Um diese Interpretation auszuschliessen, haben wir eine uns von *Andrewes*³⁾ zur Verfügung gestellte Astaxanthinprobe *ex Phaffia rhodozyma* mit (-)-Camphanoylchlorid verestert. Die HPLC.-Analyse der Esterfraktion (vgl. *Fig. 3*) zeigte, dass Astaxanthin *ex Phaffia rhodozyma* zu mehr als 98% (3*R*,3'*R*)-konfiguriert ist und kein (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin enthält.

Analog zu dem für Astaxanthin beschriebenen Verfahren haben wir aus *rac*-Adonirubin (*S*)-Adonirubin (**5a**) und (*R*)-Adonirubin (**5b**) gewonnen (CD.-Spektren vgl. *Fig. 4*).

Astaxanthin (**1**) ist in Proben biologischer Herkunft oft von Adonirubin (**5**) und 3-Hydroxyechinenon (=3-Hydroxy- β,β -carotin-4-on; **6**) begleitet [17][18]. Wie in *Figur 5* gezeigt, vermag HPLC. die entsprechenden (-)-Camphanate aufzutrennen und somit in günstigen Fällen und unterstützt durch Referenzsubstanzen zur Ermittlung von Konstitution und Konfiguration beizutragen.

Wir haben (-)-Camphanate mit gleichbleibend gutem Erfolg zur Racemat-spaltung und Analytik einer Reihe von 3-Hydroxy-4-oxocarotinoiden und ihren Zwischenstufen herangezogen. Besonders günstige Verhältnisse sind bei den fünf-

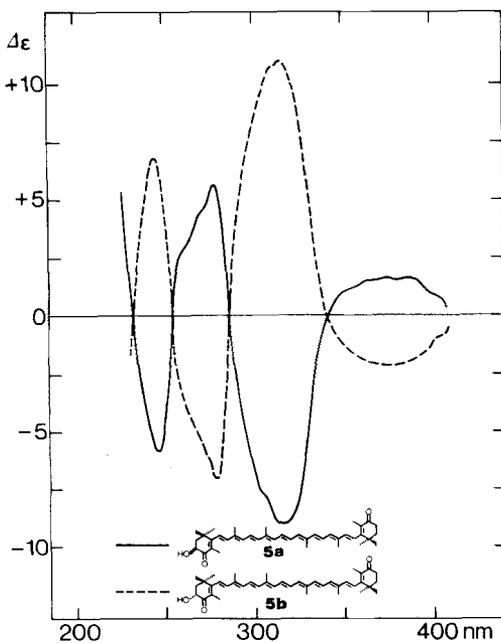


Fig. 4. CD.-Spektren (Dioxan) der enantiomeren Adonirubine

³⁾ Wir danken Herrn Dr. A. G. Andrewes für die Überlassung von (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin *ex Phaffia rhodozyma*.

gliedrigen 2-Norcarotinoiden gegeben, über deren Synthese und Analytik noch zu berichten sein wird [19].

Für die Aufnahme und Interpretation der Spektren danken wir den Herren Dr. K. Noack (CD.), Dr. G. Englert, Dr. W. Arnold und W. Grunauer (NMR.), Dr. W. Vetter und W. Meister (MS.) sowie Herrn Dr. L. Chopard (IR.). Frau K. Schiedt, Dr. H. Gutmann, Dr. F.J. Leuenberger und Dr. W.K. Lindenmann möchten wir für hilfreiche Diskussionen und den Herren M. Beck und Hp. Suter für die graphische Gestaltung dieser Arbeit herzlich danken.

Experimenteller Teil

Mitbearbeitet von Ernst Glinz und Heinz Schneider.

Allgemeine Bemerkungen. Die Bedingungen der HPLC.-Analytik sind bereits beschrieben [9]; Angabe von Flächenprozenten bei 476 nm. Zur Technik der CD.-Messungen vgl. [15]. Dünnschichtchromatogramme: Rf-Werte bestimmt mit Merck-DC.-Fertigplatten, Kieselgel 60 F-254. Zur Säulenchromatographie wurde Merck-Kieselgel-60 (Teilchengrösse 0,040-0,063 mm) verwendet. VIS.: Angabe von $\lambda_{max}(\epsilon)$ in nm.

1. *Herstellung von (3RS,3'RS)-Astaxanthin-di-(-)-camphanat (2; Diastereomergemisch).* Eine Lösung von 1,192 g (2,0 mmol) (3RS,3'RS)-Astaxanthin (1; Smp. 216-219°) [20] in 15 ml Pyridin wurde

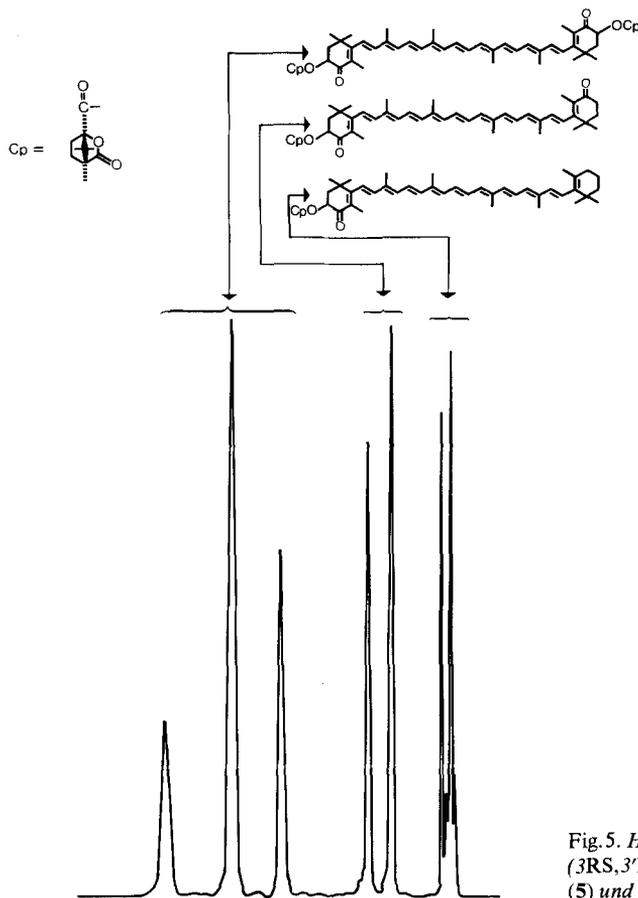


Fig. 5. HPLC. der (-)-Camphanate von (3RS,3'RS)-Astaxanthin (1), rac-Adonirubin (5) und rac-3-Hydroxyechinenon (6)

unter Argon auf 0° gekühlt und unter Rühren auf einmal mit 1,089 (5,0 mmol) (-)-Camphanoylchlorid (*Fluka, purum*; vor Gebrauch bei ca. 65°/0,01 Torr sublimiert) versetzt. Dann wurde das Eisbad entfernt und ca. 10 Min. weitergerührt; Reaktionskontrolle im DC. (Methylenchlorid/Äther 9:1). Unter Rühren wurde dann tropfenweise mit total 45 ml Wasser versetzt, wobei das Gemisch **2** auskristallisierte. Nach Filtration wurde das Filtergut zuerst mehrmals mit Wasser und darauf mit Hexan gewaschen. Nach Trocknung i.V. bei RT. wurden 1,88 g (98%) **2** als lockeres, rotbraunes Pulver erhalten. HPLC.: **2** nicht identifizierte Nebenprodukte zu je 0,7, all-*trans*-**2b** 24,3, all-*trans*-**2c** 49,2, all-*trans*-**2a** 25,1% (vgl. Fig. 6, A). DC. (Toluol/Äther/2-Propanol 89:9:2, 20-cm-Platte): 3 sauber getrennte Flecken, Rf (**2a**) 0,28, Rf (**2c**) 0,32, Rf (**2b**) 0,36. - VIS. (CHCl₃): 491 (117600).

2. *Isomerisierung von all-trans-2*. Ein unter analogen Bedingungen hergestelltes all-*trans*-Estergemisch **2** (gemäss HPLC. 24,6% all-*trans*-**2b**, 52,7% all-*trans*-**2c** und 22,4% all-*trans*-**2a**) wurde in Methylenchlorid gelöst unter Argon und unter Lichtausschluss 3 Wochen bei RT. stehen gelassen. HPLC.: nicht identifizierte Nebenprodukte ca. 0,8, **2b-cis**-Isomere 7,9, all-*trans*-**2b** 15,4, **2c-cis**-Isomere 18, all-*trans*-**2c** 32,5, **2a-cis**-Isomere 9,3 und all-*trans*-**2a** 16,1% (vgl. Fig. 6, B).

3. *Chromatographische Auftrennung von 2 in 2a, 2b und 2c*. Eine Lösung von 700 mg **2** in 100 ml Toluol/Äther/2-Propanol 89:9:2 wurde auf eine 700-g-Kieselgelsäule aufgetragen. Dasselbe Lösungsmittelgemisch eluierte in drei deutlich sichtbaren Zonen: 160 mg **2b** (*cis/trans*-Isomerengemisch, > 99% **2b**), 239 mg **2c** (97% **2c**, ca. 2,5% **2b**), 136 mg **2a** (94% **2a**, ca. 6% **2c**).

Bemerkungen: Zusatz von 2% 2-Propanol im Eluens führt zu einer deutlich verbesserten Trennung der Isomeren **2a**, **2b** und **2c**. Die *cis*-Isomeren werden hingegen unter diesen Bedingungen nicht mehr von den all-*trans*-Diestern abgetrennt. Der 2-Propanol-Zusatz scheint überdies teilweise Verseifung zu Astaxanthin-mono(-)-camphanaten zu bewirken. An einer *Merck-Lobar-Fertigsäule LiChroprep Si 60* (40-63 µm) der Grösse B liessen sich ca. 25 mg Diestergemisch **2** auftrennen (vgl. Fig. 1).

4. *Verseifung der Di(-)-camphanate 2a, 2b und 2c zu den Astaxanthinen 1a, 1b bzw. 1c*. - 4.1. **1b** aus **2b**. Zu einer Lösung von 160 mg (0,16 mmol) (3*R*,3'*R*)-Diester **2b** (gemäss HPLC. ≥ 99% (3*R*,3'*R*)) in 6 ml Methylenchlorid wurden bei RT. unter Argon 6 ml Methanol gegeben. Unter Rühren

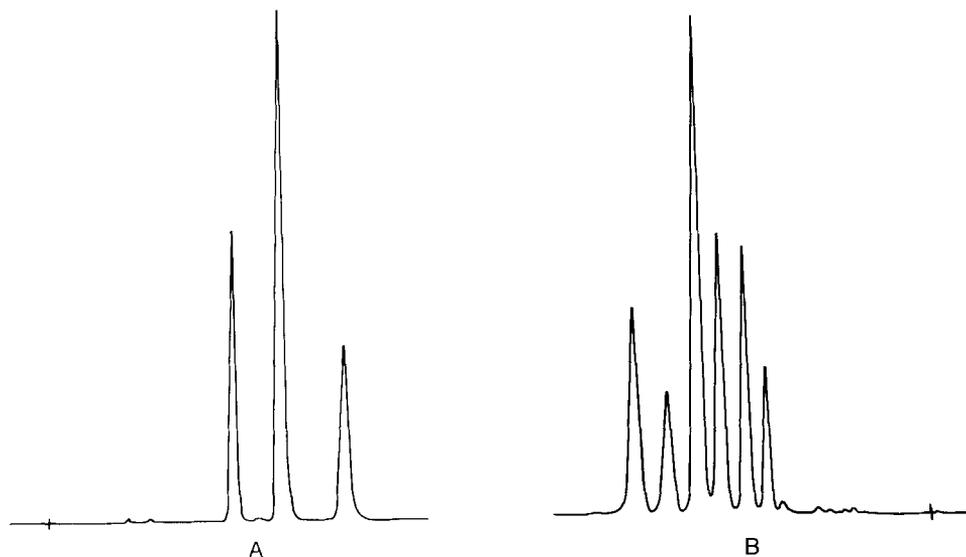


Fig. 6. HPLC. der Di(-)-camphanate von (3*RS*,3'*RS*)-Astaxanthin. A: all-*trans*-Isomerengemisch **2**, vgl. Kap.1; B: *cis/trans*-Isomerengemisch, vgl. Kap.2.

wurde mit 0,33 ml 1N wässriger NaOH versetzt. Reaktionskontrolle im DC. (Methylenchlorid/Äther 9:1). Nach ca. 70 Min. wurde das Gemisch i.RV. ohne Erwärmung auf das halbe Volumen eingengt, wobei das Produkt auskristallisierte. Nach Filtration wurde das Filtergut mehrmals gründlich mit Methanol und zum Schluss 1mal mit Hexan gewaschen und i.V. bei RT. getrocknet: 59 mg (59%) **1b**, Smp. 216–219°. In einer Serie von analog durchgeführten Verseifungen wurden für **1b** Ausbeuten zwischen 59 und 75% erzielt. Veresterung des so erhaltenen **1b** mit Acetanhydrid/Pyridin gefolgt von HPLC. des entsprechenden Diacetats [14] ergab als Verunreinigung ca. 3–5% 3,3'-Dihydroxy-2,3-didehydro- β , β -carotin-4,4'-dion (= «Halbastacin»). Zur Analyse gelangte eine Probe **1b**, die 1mal aus Methylenchlorid/Methanol umkristallisiert worden war, Smp. 216–219°. - CD. (CH₂Cl₂): 385 (-6,0), 322 (+22,1), 278 (-11,6), 247 (+14,8) (vgl. Fig. 2).

Die Analysenprobe wurde mit (-)-Camphanoylchlorid verestert⁴). HPLC.: nicht identifizierte Verunreinigung 1,3, *cis*-**2b** 5,7, all-*trans*-**2b** 85,2 und dann 2 Pike zu 0,5 und 7,3% (mit Schulter). Die beiden letzteren wurden durch Säulenchromatographie angereichert. Durch präp. HPLC. mit verbessertem Auflösungsvermögen wurden all-*trans*-**2c** und (3'R)-3,3'-Dihydroxy-2,3-didehydro- β , β -carotin-4,4'-dion-di(-)-camphanat im Verhältnis 2:1 isoliert. - ¹H-NMR. (all-*trans*-**2c**, 400 MHz): identisch mit demjenigen einer authentischen Probe. Das ¹H-NMR. des «(R)-Halbastacin-di(-)-camphanats» lässt sich lückenlos als Überlagerung der ¹H-NMR. von all-*trans*-**2b** und Astacin-di(-)-camphanat auffassen.

4.2. **1a aus 2a** vgl. 4.1: Ausbeute 73%, Smp. 216–219°. - CD. (CH₂Cl₂) [15]: 388 (+6,9), 323 (-24,7), 280 (+13,0), 249 (-16,8), vgl. Fig. 2.

HPLC. des entsprechenden Di(-)-camphanats: **2c-cis**-Isomere 0,4, all-*trans*-**2c** 6,0, **2a-cis**-Isomere 9,8, und all-*trans*-**2a** 83,9%.

4.3. **1c aus 2c** vgl. 4.1: Ausbeute 64%, Smp. 215–219°. - CD.: vgl. Fig. 2.

HPLC. des entsprechenden Di(-)-camphanats: nicht identifiziertes Nebenprodukt 0,3, all-*trans*-**2b** 2,5, **2c-cis**-Isomere 7,2, all-*trans*-**2c** 86,7 und Nebenprodukte 3,3%.

5. *Racematspaltung von Adonirubin* (= 3-Hydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion; **5**) via (-)-Camphanat. Die exper. Durchführung erfolgte weitgehend analog zu der für Astaxanthin beschriebenen, vgl. Kap. 1-4. (3S)-3-Hydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion (**5a**): Smp. 214–215° (aus Methylenchlorid/Hexan). - CD. (Dioxan): 387 (+1,6), 315 (-9,0), 278 (+5,6), 246 (-5,9), vgl. Fig. 4. - MS.: 580 (M⁺, 100), 488 (M⁺ - Toluol, 8), 474 (M⁺ - Xylol, 15), 119 (40), 105 (40), 91 (55).

(3R)-3-Hydroxy- β , β -carotin-4,4'-dion (**5b**): Smp. 214–215°. - CD. (Dioxan): 380 (-2,1), 316 (+10,9), 278 (-7,0), 246 (+6,9), vgl. Fig. 4.

6. *Herstellung von (3RS,3'RS)-Astaxanthin-bis(1-methoxy-1-methyläthyl)äther* (**3**) (Vorschrift nicht optimiert). Eine Lösung von 1,2 g (2,0 mmol) (3RS,3'RS)-Astaxanthin (**1**) [20] (Smp. 216–219°) in 180 ml Methylenchlorid/Isopropenylmethyläther 1:5 wurde unter Argon auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 1 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Reaktionskontrolle im DC. (Methylenchlorid/Äther 9:1). Nach 15 Min. wurde mit 5 Tropfen Triäthylamin versetzt und das Gemisch i.RV. ohne Erwärmung eingedampft. Nach Filterchromatographie an Kieselgel (Methylenchlorid/Äther 9:1) und Kristallisation der im DC. einheitlichen Fraktionen aus Methylenchlorid/Hexan wurden 400 mg (27%) **3** erhalten, Smp. 153–155°. - ¹H-NMR. (CDCl₃, vor Gebrauch durch basisches Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert): u.a. 4,47 (*d* × *d*, J_{2ax,3ax} = 12,5, J_{2äq,3ax} = 6,2, 2 H, H_{ax}-C(3), H_{ax}-C(3')). - MS. (Ionisationskammer ca. 180°): 740 (M⁺, 20), 709 (M⁺ - OCH₃, 5), 708 (M⁺ - HOCH₃, 5), 666 (3), 648 (M⁺ - Toluol, 1), 636 (2), 634 (M⁺ - Xylol, 2), 91 (5), 73 (C₃H₆OCH₃, 100).

7. *Deuterierung von 3 an C(3) und C(3')*. Zu 5 ml CH₃OD (Monodeuterio-methanol von Fluka (puriss.)) wurden unter Argon 24 mg Natrium gegeben. Zu dieser Natriummethylatlösung wurden 370 mg **3** und 100 ml Äther gegeben. Nach 24 Std. Rühren bei RT. wurde die Lösung eingedampft. Das durch direkte Kristallisation des Rückstandes aus Methylenchlorid/Hexan gewonnene **4** zeigte folgende Eigenschaften. - NMR.: kein Signal bei 4,47 ppm, was auf einen Deuterierungsgrad von $\geq 95\%$ schliessen lässt. - MS.: 742 (M⁺). Wegen D/H-Austausch in der Ionenquelle ist eine quantitative Aussage über den Deuterierungsgrad nicht möglich.

4) Bei der für kleine Mengen angewandten Veresterungstechnik kann *cis/trans*-Isomerisierung eintreten. Für die Veresterungstechnik biologischer Proben vgl. [21].

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Kuhn & N.A. Sørensen, Ber. Deutsch. Chem. Ges. 71, 1879 (1938).
- [2] A.G. Andrewes, G. Borch, S. Liaaen-Jensen & G. Snatzke, Acta Chem. Scand. B28, 730 (1974).
- [3] A. Veerman, G. Borch, R. Pedersen & S. Liaaen-Jensen, Acta Chem. Scand. B29, 525 (1975).
- [4] R. Buchecker, C.H. Eugster & A. Weber, Helv. 61, 1962 (1978).
- [5] A.G. Andrewes, M.P. Starr, H.J. Phaff & H. Hope, Fourth Int. Symp. on Carotenoids, Berne (Switzerland) 1975, Abstracts Contributed Papers, S. 4; A.G. Andrewes & M.P. Starr, Phytochemistry 15, 1009 (1976).
- [6] H. Gerlach, Helv. 51, 1587 (1968); H. Gerlach & W. Müller, Helv. 55, 2277 (1972); H. Gerlach, K. Oertle & A. Thalmann, Helv. 59, 755 (1976).
- [7] R.K. Müller, K. Bernhard, F. Kienzle, H. Mayer & A. Rüttimann, Food Chem. 5, 15 (1980).
- [8] R.K. Müller, H. Mayer, K. Noack, J.J. Daly, J.D. Tauber & S. Liaaen-Jensen, Helv. 61, 2881 (1978).
- [9] M. Vecchi & R.K. Müller, J. High Resolution Chromatogr. & Chromatogr. Commun. 2, 195 (1979).
- [10] H. Rønneberg, B. Renstrøm, K. Aareskjold, S. Liaaen-Jensen, M. Vecchi, F.J. Leuenberger, R.K. Müller & H. Mayer, Helv. 63, 711 (1980).
- [11] F. Kienzle & H. Mayer, Helv. 61, 2609 (1978).
- [12] H. Mayer, Pure Appl. Chem. 51, 535 (1979).
- [13] L. Zechmeister, 'cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes', Springer-Verlag 1962.
- [14] G. Englert & M. Vecchi, Helv. 63, 1711 (1980).
- [15] G. Englert, F. Kienzle & K. Noack, Helv. 60, 1209 (1977).
- [16] C.H. Eugster, Pure Appl. Chem. 51, 463 (1979).
- [17] K. Egger, Phytochemistry 4, 609 (1965); K. Egger & H. Kleinig, *ibid.* 6, 437 (1967); *idem*, *ibid.* 6, 903 (1967).
- [18] A.G. Andrewes, H.J. Phaff & M.P. Starr, Phytochemistry 15, 1003 (1976).
- [19] R.K. Müller, J.J. Daly, G. Englert, H. Mayer & K. Noack, in Vorbereitung.
- [20] E. Widmer, R. Zell, E.A. Broger, Y. Cramerli & M. Casadei, in Vorbereitung.
- [21] K. Schiedt, F.J. Leuenberger & M. Vecchi, in Vorbereitung.