

281. Trennung und Charakterisierung von β -Carotin-Isomeren

von Max Vecchi^{a)}, Gerhard Englert^{a)}, Res Maurer^{a)} und Vladimir Meduna^{b)}

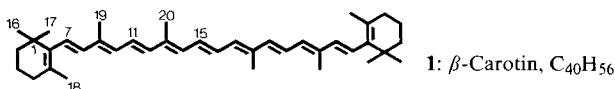
Zentrale Forschungseinheiten^{a)} und Abteilung für Verfahrensentwicklung^{b)},
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, CH-4002 Basel

(2.X.81)

Separation and Characterization of the *cis*-Isomers of β , β -Carotene

Summary

A stable HPLC. system is described allowing the excellent separation of 11 different *cis*-isomers of β , β -carotene from the all-*trans* compound. The system is applied to the analysis of *cis/trans* mixtures obtained from plant extracts and by photoisomerization of the all-*trans* isomer. Al₂O₃ is used as the stationary phase while hexane with controlled H₂O content is utilized as the mobile phase. With the aid of the optimum conditions 8 sufficiently stable *cis* isomers were isolated and their structures shown to be the 9-, 13- and 15-*cis*, the 9,9'-, 9,13-, 9,13'- and 13,13'-*cis* and, tentatively, the 9,13,13'-*tri-cis* β , β -carotenes by application of 270-MHz-FT.-¹H-NMR. spectroscopy.



Einleitung. - β -Carotin (= β , β -Carotin; **1**) ist in der Natur als Pflanzenfarbstoff weit verbreitet. Im Zusammenhang mit Isomerisierungsversuchen von synthetischem β -Carotin stellte sich uns das Problem, eine geeignete Analysenmethode zur Bestimmung der verschiedenen *cis*-Isomeren zu erarbeiten. Diese sollten ferner in genügenden Mengen isoliert werden können, um deren Struktur mit Hilfe spektroskopischer Methoden zu ermitteln.

Kuhn *et al.* [1] [2] hatten die ursprünglich von Tswett [3] eingeführte Säulen-chromatographie zu einer sehr leistungsfähigen Methode speziell zur Auftrennung von Carotinoiden entwickelt, wobei vorwiegend CaCO₃, ZnCO₃, MgO und Ca(OH)₂ als Säulenfüllmaterialien verwendet wurden. Mit Hilfe dieser chromatographischen Techniken gelang es Zechmeister & Polgár [4] aus einer Lösung von kristallinem β -Carotin, die zuvor kurz mit UV.-Licht bestrahlt worden war, acht verschiedene, zu β -Carotin stereoisomere Verbindungen abzutrennen und zu isolieren. Unter ähnlichen chromatographischen Bedingungen isolierten Porter & Zscheibe [5] aus einem Extrakt von Tomaten zwölf Isomere mit der Summenformel C₄₀H₅₆. Da zum damaligen Zeitpunkt lediglich der Schmelzpunkt, die Daten der Mikroanalyse und die UV./VIS.-Spektren zur Charakterisierung der chromato-

graphischen Fraktionen zur Verfügung standen, konnten keine verlässlichen Aussagen über die Struktur der isolierten Verbindungen gemacht werden.

Zur Lösung unserer Aufgabenstellung, bei der *a priori* mit einer grossen Zahl zu analysierender Proben gerechnet wurde, kamen diese klassischen chromatographischen Trennmethode wegen ihres hohen Arbeitsaufwandes nicht in Frage. Die Entwicklung geeigneter Analysemethoden für Carotingemische wurde erst mit dem Aufkommen der HPLC. (Hochleistungsflüssigchromatographie) möglich. Stewart [6] gelang es erstmals, Gemische von α - und β -Carotin mittels HPLC. reproduzierbar zu analysieren. Fiksdahl *et al.* [7] trennten Lycopin, γ -Carotin und bicyclische Carotine mittels HPLC. auf einer Silicagelsäule. Kürzlich berichteten Zakaria *et al.* [8] über die Trennung von α - und β -Carotin an einer C_{18} -'reversed' Phase. Ähnliche Bedingungen benutzten Pfander *et al.* [9] zur Trennung von α -, β - und γ -Carotin sowie verschiedener Gemische von Diterpenen. Aufgrund der vorliegenden Erfahrungen war es naheliegend, die Lösung unserer Aufgabe ebenfalls mittels HPLC. zu versuchen.

Das Trennsystem. - In Anlehnung an die zitierten HPLC.-Arbeiten [6-9] wurden zunächst ausgedehnte Versuche mit sogenannten 'reversed' Phasen, bei denen C_{18} -Kohlenwasserstoff-Reste, Nitrilgruppen oder Benzyl-Reste über eine C, Si-Bindung chemisch an die Silicageloberfläche gebunden sind, durchgeführt. Dabei wurden jedoch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt. Die Packungsmaterialien MgO , $CaCO_3$ und $ZnCO_3$ erwiesen sich zur Herstellung von Hochleistungstrennsäulen (Mindestlänge: 30 cm) als ungeeignet, da diese Materialien bei den erforderlichen Bedingungen nicht genügend stabil sind.

Vorversuche mit Al_2O_3 als stationärer und Hexan als mobiler Phase verliefen zunächst sehr vielversprechend, doch liessen sich die erzielten Trennungen nur über relativ kurze Zeit reproduzieren. Der Grund hierfür lag darin, dass bei Trennsystemen mit polarer stationärer und unpolarer mobiler Phase das Retentionsverhalten sehr stark durch die in der mobilen Phase enthaltenen Spuren von Wasser beeinflusst wird [10] [11].

Kürzlich beschrieben Engelhardt & Boehme [12] ein relativ einfaches System, das sie 'Moisture Control System' (MCS.) nannten, mit dem es möglich ist, den Wassergehalt von unpolaren und mittelpolaren mobilen Phasen sehr präzise einzustellen. Wir benötigten eine Analysemethode, die im Routinebetrieb während Monaten sehr konstante R_f -Werte (= Retentionszeiten) liefert und damit über einen längeren Zeitraum eine eindeutige Zuordnung der einmal identifizierten Komponenten ermöglicht. Unter diesem Gesichtspunkt geprüft, erwies sich das erwähnte MCS. jedoch als zu wenig leistungsfähig. Bei einem täglichen Eluensverbrauch von 0,7-1,0 Liter reichte der Vorrat lediglich für wenige Tage. Andererseits dauerte es nach dem Ergänzen des Lösungsmittelvorrates mindestens zwei Tage bis die ursprünglich erzielte Trennung wieder reproduziert werden konnte.

Aus diesem Grunde haben wir das beschriebene MCS. in der Weise ausgebaut, dass damit auch bei relativ grossem Eluensverbrauch während Monaten ohne Unterbrechung reproduzierbar analysiert werden kann. Eine schematische Darstellung des verwendeten Trennsystems ist in den Figuren 1 und 2 wiedergegeben (vgl. auch exper. Teil).

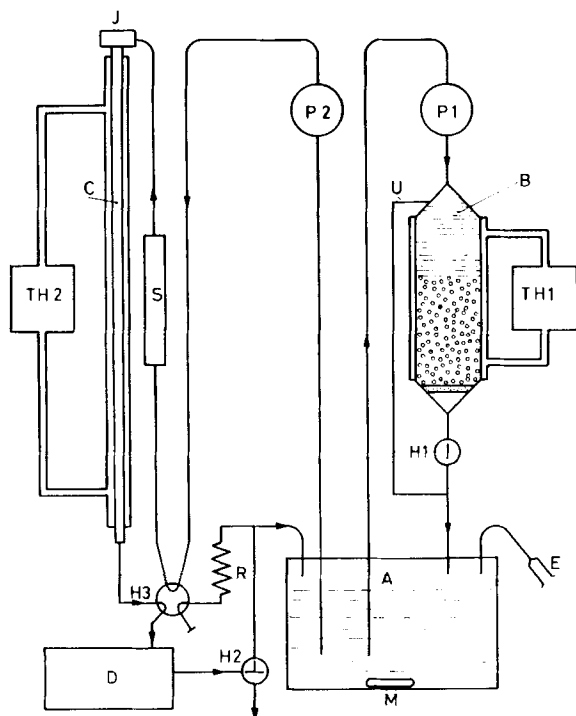


Fig. 1. Schematische Darstellung des Trennsystems

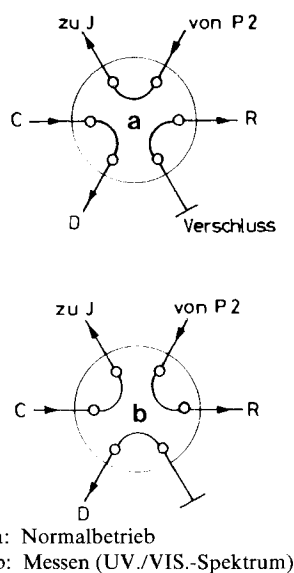


Fig. 2. Schaltung des Hahmens H3

Das Glasgefäß A dient als Vorratsgefäß für die mobile Phase. Beim Aufsatz B handelt es sich im Prinzip um ein thermostatisierbares Chromatographierohr, das gut zur Hälfte mit Al_2O_3 , belegt mit 15% H_2O , gefüllt ist. Mit Hilfe des Thermostaten TH 1 wird die Füllung auf einer vorgewählten Temperatur gehalten. Mit der Membranpumpe P 1 wird das Eluens *via* Säule B ständig im Kreislauf umgewälzt. Die Kombination Vorratsgefäß A, Hochdruckpumpe P 2, Einspritzblock J, Vorsäule S, Kolonne C, Detektor D entspricht einem üblichen HPLC.-Trennsystem. Die Optimierung der Trennung erfolgt durch Feinregulierung der Temperatur der Trennsäule (C) mit Hilfe des Thermostaten TH 2.

Ergebnisse. - *Optimierung des Trennsystems.* Wie das in *Figur 3* wiedergegebene Chromatogramm eines β -Carotin-Isomerengemisches natürlichen Ursprungs zeigt, lassen sich mit Hilfe des beschriebenen Trennsystems (*Fig. 1*) *cis/trans*-Isomerengemische von β -Carotin weitgehend auftrennen. Die Strukturaufklärung der Isomeren mittels $^1\text{H-NMR}$, ist im nächsten Kap. diskutiert.

In *Figur 4* sind die Chromatogramme eines β -Carotin-Isomerengemisches bei fünf verschiedenen Säulentemperaturen zusammengestellt. Ein Vergleich der Chromatogramme A-E zeigt, dass sich durch Feineinstellung der Temperatur der Trennsäule C - die Kolonne B wird stets auf der ursprünglich eingestellten Äquilibriumstemperatur gehalten - die chromatographische Trennung sehr subtil optimieren lässt. Wie ersichtlich, bewirkt eine Erhöhung der Säulentemperatur in

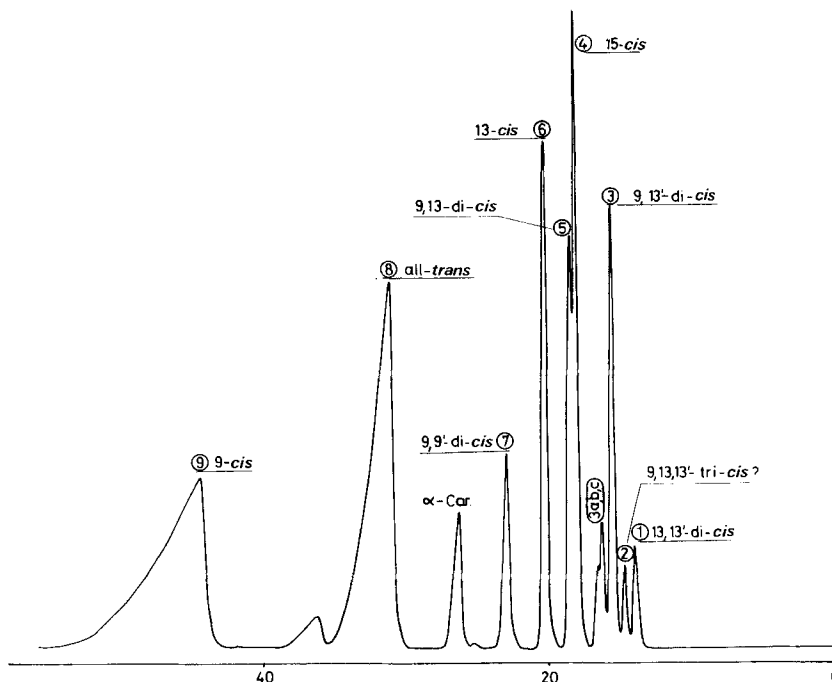


Fig. 3. HPLC.-Trennung eines β -Carotin-Isomerengemisches natürlichen Ursprungs (analytisches System bei 19,5°)

der Regel eine Verlängerung der Retentionszeiten, während andererseits beim Absenken der Säulentemperatur kleinere R_f -Werte gemessen werden. Dabei ist die Temperaturabhängigkeit der R_f -Werte sehr substanzspezifisch.

Bei einer Temperaturänderung der Trennsäule um 1-2° dauert es normalerweise 18-24 Stunden bis die neue Gleichgewichtseinstellung erreicht ist. Es zeigte sich jedoch, dass die Äquilibrationdauer für die Trennsäule C bei einer notwendigen Änderung der Säulentemperatur z.B. um 1,5° wesentlich verkürzt werden kann, indem zunächst die Temperatur der Trennsäule um 5° abgesenkt (sogeannter Temperaturwischenschritt) und erst ca. 2 Stunden später der neue Sollwert ($\Delta T = -1,5^\circ$) eingestellt wird. Wie die Werte in *Tabelle 1* zeigen, reagiert das Trennsystem bei dieser Arbeitsweise rasch auf die vorgenommene Temperaturänderung (neues Gleichgewicht schon nach ca. 7 Stunden statt nach 24 Stunden).

Zeitaufwendig - ca. 4 Tage - ist bei Arbeiten mit der beschriebenen Anordnung (*Fig. 1*) nur noch das Äquilibrieren des ganzen Systems vor dessen Inbetriebnahme. Da allabendlich 400-500 ml, über das Wochenende bis zu 2 Liter Eluens ohne Störung der Gleichgewichtslage in das Vorratsgefäß nachgefüllt werden können, lassen sich mit der gewählten Anordnung über Monate routinemässig sehr reproduzierbare Chromatogramme erzielen.

Wie oben erwähnt, werden - Gleichgewicht vorausgesetzt - mit dem beschriebenen System bei tieferer Säulentemperatur kürzere Retentionszeiten gemessen. Beim Beobachten der Retentionszeiten während des Einstellens auf eine neue, tiefere Temperatur lässt sich aber feststellen (vgl. *Tab. 2*), dass die Retentionszeiten zunächst länger, und erst nach ca. 1-1½ Stunden kürzer werden. Dieser Sachverhalt lässt sich mit Hilfe der chromatographischen Grundgleichung [11]

$$\log k' = \log \left(V_a \frac{W}{V_m} \right) + a \cdot (S^\circ - A_s \cdot \varepsilon^\circ)$$

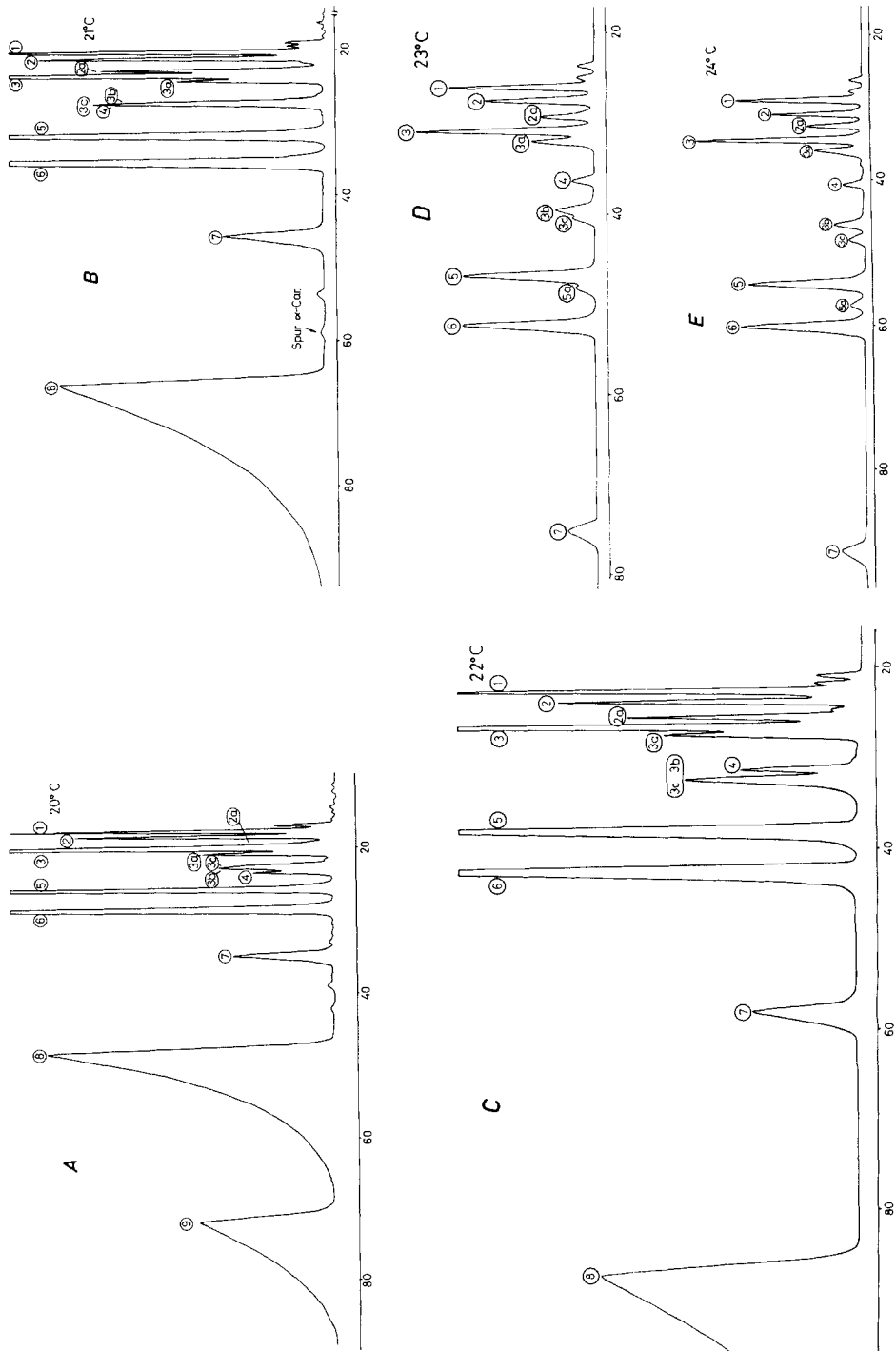


Fig. 4. HPLC.-Trennung eines β -Carotin-Isomerengemisches bei verschiedenen Säulentemperaturen (semipräparatives System)

erklären. Darin wird k' im wesentlichen als Funktion von zwei Parametern, V_a und a , dargestellt, welche das adsorptive Verhalten der stationären Phase beschreiben. V_a (Volumen der adsorbierten Schicht Eluens pro Gramm Adsorbens) ist ein Mass für jenen Oberflächenanteil des Adsorbens, welcher nicht durch einen Desaktivator, im vorliegenden Fall Wasser, abgedeckt ist und daher für die Adsorption des Gelösten zur Verfügung steht. Mit a wird die Oberflächenaktivität eines nicht desaktivierten Adsorbens bezeichnet. W ist das Gewicht der stationären Phase und V_m das Volumen der mobilen Phase in der Kolonne. Der Ausdruck in Klammer des zweiten Terms stellt die Energieänderung beim Adsorptionsvorgang dar.

Beim Absenken der Temperatur der Trennsäule nimmt die Oberflächenaktivität a der stationären Phase zu [10]. Als Folge werden die am Kolonnenkopf aufgegebenen Substanzen in der Trennsäule stärker retardiert (Effekt I), d.h. man beobachtet bei tieferer Kolonnentemperatur zunächst längere Retentionszeiten. Da aber auch die mit dem Eluens zugeführten Wassermolekeln stärker retardiert werden, - der Wassergehalt des zugeführten Eluens wird bei der verwendeten Anordnung (Fig. 1) konstant gehalten - stellt sich allmählich ein neuer Gleichgewichtszustand ein. Entsprechend der Anlagerung zusätzlicher H_2O -Molekeln an der Oberfläche des Adsorbens verkleinert sich V_a , was bedeutet, dass die am Kolonnenkopf aufgegebenen Substanzen wieder kleinere k' -Werte aufweisen (Effekt II). Der sich rasch auswirkende Effekt I dominiert anfänglich, wird jedoch mit der Zeit durch Effekt II kompensiert. Nach Erreichen des Gleichgewichts überwiegt Effekt II, so dass kürzere Retentionszeiten resultierten.

Identifizierung der Fraktionen. Die Strukturaufklärung der einzelnen Komponenten erfolgte im wesentlichen mittels 270-MHz- 1H -NMR.-Spektroskopie. Als Ergänzung wurde von sämtlichen chromatographischen Fraktionen ein UV./VIS.-Spektrum, von den meisten auch ein Massenspektrum aufgenommen.

Tabelle 1. Zeitlicher Verlauf der Gleichgewichtseinstellung der Trennsäule bei einer Temperaturänderung um 1° und Einschaltung eines Temperaturzwischenschrittes (R_I -Werte in relativen Einheiten)

Zeitpunkt der Dosierung [Std.]	Temp. der Trennsäule [$^\circ C$]	R_I von all-trans	R_I von 13-cis	R_I von unbekannter Komponente
0	26.5	39	24	18
1,0	26,5 \rightarrow 22,0			
1,0-1,5	22,0	-	-	-
1,5	22,0 \rightarrow 25,5			
3,5	25,5	34,5	22	17
4,75	25,5	32,5	21	16
7,50	25,5	31	20,5	15,5

Tabelle 2. Veränderung der R_I -Werte von all-trans- und 13-cis- β -Carotin beim Senken der Säulentemperatur um 4° (R_I -Werte in relativen Einheiten)

Zeitpunkt der Dosierung [Std.]	Temp. der Trennsäule [$^\circ C$]	Temp. des MCS. [$^\circ C$]	R_I von all-trans	R_I von 13-cis
0	26,5	26,5	41	25
0,5	Umstellung des Thermostaten von 26,5 \rightarrow 21,5	26,5	-	-
0,75	21,5	26,5	-	-
1,0	21,5	26,5	53	31
1,75	21,5	26,5	49,5	28,5
2,5	21,5	26,5	46	27
3,25	21,5	26,5	34	22
4,0	21,5	26,5	27,5	13,5

Tabelle 3. Chemische Verschiebungen δ in ppm (270 MHz, CDCl_3) und Relevante Werte der Isomerisierungs-

Protonen	Pik \odot all-trans	Pik \ominus 9-cis		Pik \odot 9,9'-di-cis		Pik \ominus 13-cis	
		δ	Δ	δ	Δ	δ	Δ
H-C(7)	6,16	6,19	0,05	6,18	0,02	6,17	
H-C(7')		6,16				6,18	
H-C(8)	6,15	6,67	0,52	6,67	0,52	6,15	
H-C(8')		6,15				6,16	
H-C(10)	6,15	6,06	-0,09	6,06	-0,09	6,20	0,05
H-C(10')		6,15				6,16	
H-C(11)	6,65	6,76	0,11	6,76	0,11	6,64 ^{b)}	
H-C(11')		6,65				6,65 ^{b)}	
H-C(12)	6,35	6,29	-0,06	6,28	-0,07	6,89	0,54
H-C(12')		6,35				6,36	
H-C(14)	ca. 6,25	ca. 6,24		ca. 6,24		6,11	-0,14
H-C(14')						6,23	
H-C(15)	ca. 6,63	ca. 6,63		ca. 6,62		6,80	0,17
H-C(15')						6,56	-0,07
H ₃ C(16), H ₃ C(17)	1,028	1,043	0,02	1,041		1,036	
H ₃ C(16'), H ₃ C(17')		1,029				1,029	
H ₃ C(18)	1,719	1,759	0,04	1,756	0,04	ca. 1,727	
H ₃ C(18')		1,719				ca. 1,722	
H ₃ C(19)	1,972	ca. 1,973		1,960		ca. 1,973	
H ₃ C(19')						ca. 1,973	
H ₃ C(20)	1,972	ca. 1,973		1,973		1,996	0,02
H ₃ C(20')						1,973	

^{a)} Nicht zugeordnet. ^{b)} Entsprechende Zuordnungen könnten vertauscht werden.

Frühere analoge Untersuchungen an Gemischen von *cis*-isomeren Astaxanthin-diacetaten [13] sowie eines aromatischen Vitamin-A-Analogen [14] haben gezeigt, dass im Hochfeldspektrum derartiger Verbindungen eine weitgehende Zuordnung der ¹H-NMR.-Signale möglich ist. Die Verschiebung der Signale der einzelnen Protonen des betreffenden *cis*-Isomeren gegenüber der *all-trans*-Verbindung, $\Delta = \delta_{cis} - \delta_{trans}$ (in ppm), gestattet es dann (zusammen mit evtl. beobachteten Änderungen von Kopplungskonstanten), eine sichere Identifizierung der Isomeren durchzuführen. Eine Zusammenstellung der Werte der Isomerisierungsverschiebungen Δ für die 10 häufigsten Typen von *cis*-isomeren Carotinoiden wird demnächst veröffentlicht [15].

Im hier vorliegenden Fall der isomeren β -Carotine wurde die Identifizierung der *cis*-Isomeren in analoger Weise durchgeführt. Eine zusätzliche Anwendung der ¹³C-NMR.-Spektroskopie war ausgeschlossen, da trotz mehrfachem Abfangen der einzelnen HPLC.-Fraktionen nur Substanzmengen zwischen etwa 5 und 50 μg isoliert werden konnten. Jede dieser isolierten Fraktionen wurde vor der Aufnahme der ¹H-NMR.-Spektren, teilweise auch nochmals danach, durch Rechromatographieren auf ihre Reinheit und Stabilität geprüft. Dabei zeigte es sich, dass die Fraktionen 3 a, 3 b und 3 c (s. Fig. 3 und 4) sehr instabil waren, so dass auf deren Identifizierung verzichtet wurde.

Zuordnung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale von all-*trans*- β -Carotin und seinen *cis*-Isomeren.
 verschiebung $\Delta = \delta_{\text{cis}} - \delta_{\text{trans}}$ (in ppm)

Pik ⊕ 13, 13'-di- <i>cis</i>		Pik ⊙ 15- <i>cis</i>		Pik ⊙ 9, 13-di- <i>cis</i>		Pik ⊙ 9, 13'-di- <i>cis</i>		Pik ⊙ 9, 13, 13'-tri- <i>cis</i> ?	
δ	Δ	δ	Δ	δ	Δ	δ	Δ	δ	Δ
6,19	0,03	6,18		6,20?	0,04?	6,18		a)	
				ca. 6,15		6,18		6,18	
6,14		6,13		6,67	0,52	6,67	0,52	6,66	0,51
				ca. 6,15		6,15		6,15	
6,19	0,04	6,16		6,10	-0,05	6,06	-0,09	a)	
				6,14		6,18	0,03	a)	
6,64		6,68	0,03	6,75	0,10	6,75?	0,10?	6,74?	0,09?
				6,64		6,65		a)	
6,87	0,52	6,42	0,07	6,81	0,46	6,29	-0,06	6,81?	
				6,35		6,88	0,53	6,87	0,54
6,08	-0,17	ca. 6,66	0,41	6,19?	-0,06?	6,22	-0,03	a)	
				6,23		6,10	-0,15	a)	
ca. 6,72	0,09	ca. 6,39	-0,24	6,80	0,17	6,55	-0,08	a)	
				6,55	-0,08	6,79	0,16	a)	
1,034		1,033		1,043	0,02	1,044	0,02	1,042	
				1,029		1,038		1,033	
1,724		1,724		1,756	0,04	1,758	0,04	1,754	0,04
				1,721		1,727		1,724	
1,977		ca. 1,976		ca. 1,98 ^b)		1,955	-0,02	ca. 1,979 ^b)	
				ca. 1,97		1,981		ca. 1,979 ^b)	
1,991	0,02	ca. 1,976		ca. 1,99 ^b)		1,981		ca. 1,985 ^b)	
				ca. 1,97		ca. 1,990	ca. 0,02	ca. 1,985 ^b)	

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten von all-*trans*- β -Carotin und von 8 weiteren Fraktionen sind in *Tabelle 3* zusammengestellt. Nicht angegeben sind die Verschiebungen der Methylenprotonen an C(2), C(2'), C(3), C(3'), C(4) und C(4'), deren Signale bei allen Verbindungen als komplexe Multiplette bei ca. 1,46, 1,62 und 2,02 ppm beobachtet wurden. Die Identifizierung der 9-*cis*-, 9,9'-di-*cis*-, 13-*cis*-, 13,13'-di-*cis*-, 15-*cis*-, 9,13- und 9,13'-di-*cis*-Isomeren kann als gesichert gelten, da die Signale - bis auf einige Ausnahmen - eindeutig zugeordnet werden konnten. In allen Isomeren mit 9-*cis*-Konfiguration wurde wie früher [14] [15] eine starke Tieffeldverschiebung von H-C(8) gefunden, bei 13-*cis*- oder 13'-*cis*-Konfiguration eine solche von H-C(12) bzw. H-C(12'). Erwartungsgemäss sind beim 9,13'-di-*cis*-Isomeren die Δ -Werte in guter Näherung additiv aus denjenigen des 9-*cis*- und 13'-*cis*-Isomeren zusammengesetzt. Stärkere Abweichungen von der Additivität treten beim 9,13-di-*cis*-Isomeren auf, wodurch die beiden Fälle leicht unterscheidbar werden.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pik 2 kann wegen sehr starker Überlagerung der Signale in den Bereichen 6,07-6,20 ppm (7 Protonen, sicher erkennbar H-C(7') und H-C(8), vermutlich noch H-C(10), H-C(10'), H-C(14), H-C(14') sowie H-C(7)) und ca. 6,7-6,9 ppm (7 Protonen, sicher H-C(12') mit $J = 15$ Hz, vermutlich H-C(12), H-C(11), H-C(11'), H-C(15), H-C(15') und H-C(8)) nicht

im einzelnen zugeordnet werden. Wegen der Verschiebung der Methylsignale von $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(1)$ und $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(5)$ folgt eindeutig, dass eine 9-*cis*-Konfiguration vorliegt. Dies wird bestätigt durch ein Doppelresonanzexperiment. Beim Einstrahlen bei 6,19 ppm geht u. a. das Dublett bei 6,66 ppm ($J \approx 16$ Hz; $\text{H}-\text{C}(8)$) in ein Singulett über. Gleichzeitig werden Änderungen bei dem vermutlich $\text{H}-\text{C}(11)$ zuzuordnenden Signal (6,74 ppm, $d \times d$, $J \approx 15$ und 11 Hz) beobachtet. Weiterhin ordnen wir versuchsweise ein weiteres überlagertes Dublett ($J \approx 15$ Hz) bei 6,81 ppm $\text{H}-\text{C}(12)$ zu. Es entspricht genau dem entsprechenden Signal bei der 9,13-di-*cis*-Verbindung. Aus diesen Gründen schlagen wir für diese Fraktion versuchsweise eine 9,13,13'-*tri-cis*-Struktur vor.

UV./VIS.-Spektren. Mit Hilfe der im exper. Teil beschriebenen Schaltung (Fig. 2) gelang es, unter definierten Bedingungen von jeder chromatographischen Fraktion das UV./VIS.-Spektrum aufzunehmen. Die charakteristischen Daten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Eine Pikverbreiterung bedingt durch die verwendete Arbeitstechnik wurde nicht beobachtet.

Temperaturverhalten der HPLC.-Pike. Wie Figur 4 entnommen werden kann, führen schon Temperaturänderungen von zwei Grad zu erheblichen R_f -Verschiebungen, z. T. gar zur Umkehr der Pikreihenfolge (Pik 4 und 3 b bzw. 3 c), was eine Zuordnung der einmal identifizierten Pike im mittleren Abschnitt der Chromatogramme sehr erschwert. Es wurde daher versucht, eine Gesetzmässigkeit in der Verschiebung dieser R_f -Werte festzustellen. Im Diagramm (Fig. 5) sind die k' -Werte der betreffenden Komponenten als Funktion des k' -Wertes von 13-*cis*- β -Carotin (Fig. 3, Pik 6) aufgetragen. Wie sich zeigte, liegen die für eine bestimmte Komponente erhaltenen Messpunkte auf Geraden. Das 13-*cis*- β -Carotin (k'_6) wurde deshalb als Referenzsubstanz gewählt, weil einerseits dieses im interessierenden Abschnitt des Chromatogramms liegt und von den anderen Isomeren gut ab-

Tabelle 4. Charakteristische Daten im UV./VIS.-Spektrum (Hexan) der verschiedenen β -Carotin-Isomeren^{a)}

Pik Nr.	Isomer	I			II			III		IV		V	
		λ	H_{rel}	$\Delta\lambda$	λ	H_{rel}	$\Delta\lambda$	λ	H_{rel}	λ	H_{rel}	λ	H_{rel}
①	13,13'-di- <i>cis</i>	459	77	443	100	15	412s	77	339	10	279	35	
②	9,13,13'-tri- <i>cis</i>	454	76	429	100	19	408s	77	341	15	272	22	
2a		465	79	439	100	9	417s	75	333	30	282	24	
③	9,13'-di- <i>cis</i>	461	80	435	100	13	413s	75	334	24	281	25	
3a		456	78	430	100	18	408s	75	335	13	262	19	
3b		460	76	435	100	13	411s	77	338s	9	281	28	
3c		457	75	431	100	17	408s	79	337s	12	277	20	
④	15- <i>cis</i>	472	80	446	100	2	423s	76	334	58	275	14	
⑤	9,13-di- <i>cis</i>	461	80	435	100	13	413s	72	334	20	276	15	
⑥	13- <i>cis</i>	467	81	441	100	7	417s	73	335	45	271	13	
⑦	9,9'-di- <i>cis</i>	465	86	438	100	10	415s	71			265	12	
⑧	9- <i>cis</i>	474	88	446	100	2	420s	66	340	8	255	11	
⑨	all- <i>trans</i>	476	88	448	100	0	421s	68	fehlt		271	15	

^{a)} I, III, IV und V sind Nebenmaxima (S = Schulter).

Das Hauptmaximum II dient als Bezugsgrösse (= 100%) bei der Bestimmung von H_{rel} . Hypsochrome Verschiebungen $\Delta\lambda = \lambda_{\text{II,trans}} - \lambda_{\text{II,cis}}$.

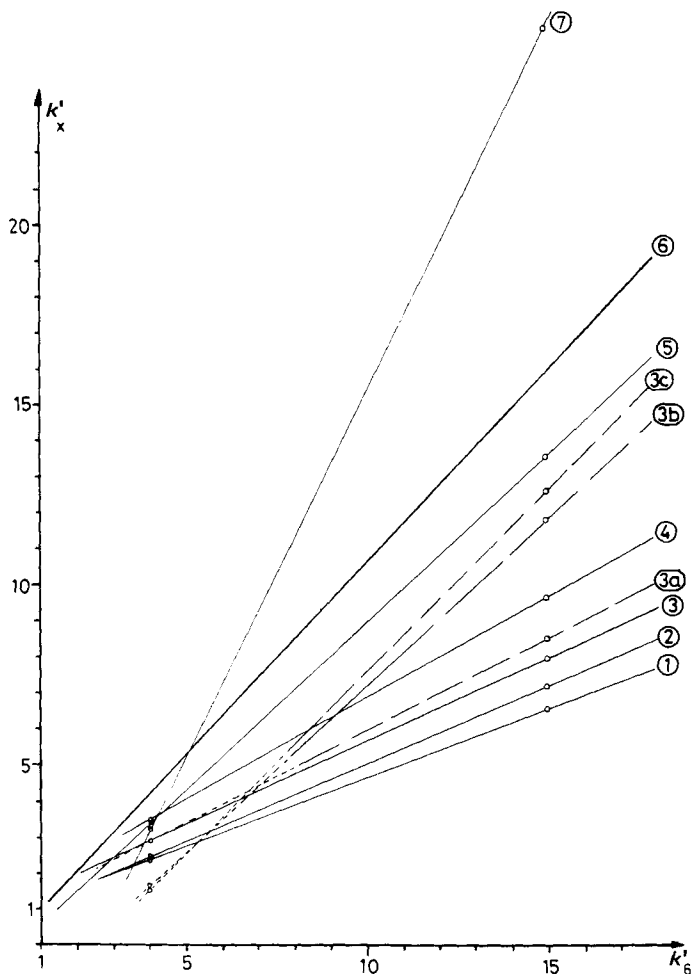


Fig. 5. k' -Werte von Pik 1-7 als Funktion des k' -Wertes von 13-cis- β -Carotin (Pik 6)

getrennt ist, andererseits die Verbindung aus dem käuflichen *trans*- β -Carotin leicht zugänglich ist.

Wir haben im Laufe von $1\frac{1}{4}$ Jahren Hunderte von β -Carotin-Proben auf der gleichen Säule analysiert und stellten fest, dass sich diese Geraden gut reproduzieren lassen. Für jede Gerade $k'_x = a + bk'_6$ wurden die Regressionskoeffizienten a und b sowie der Korrelationskoeffizient r berechnet (Tab. 5). Die der Berechnung zu Grunde liegenden Messwerte wurden im Laufe von 14 Monaten erhalten.

Wird als stationäre Phase nicht *Spherisorb A 5Y*, sondern ein Aluminiumoxyd anderer Provenienz verwendet, so ergibt die Auswertung Geraden mit leicht verschiedenen Regressionskoeffizienten. Wie die Erfahrung zeigt, können bei der Analyse von Isomerenmischungen von β -Carotin mit Hilfe dieser Geraden - trotz Pikumkehr usw. - die Pike verschiedener Chromatogramme einander zugeordnet werden.

Da in *Figur 5* als Abszisse nicht die Temperatur der Trennsäule, sondern die entsprechenden k' -Werte einer Referenzsubstanz aufgetragen sind, spielt bei dieser Auswertung die genaue Kenntnis der jeweiligen Analysentemperatur keine Rolle.

Analyse von Pflanzenextrakten. Mit dem beschriebenen Trennsystem wurden auch vorchromatographierte Extrakte aus Karotten und Paprika auf ihre Zusammensetzung an β -Carotin-Isomeren untersucht (s. *Tab. 6*). Wie ersichtlich, unterscheiden sich die beiden Naturprodukte quantitativ in ihrem Isomergehalt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass beide jedoch erhebliche Mengen an 9- und 13-*cis*- β -Carotin enthalten. Pike, die bislang in Chromatogrammen von sogenannten Isomerenlösungen nicht festgestellt werden konnten, werden in *Tabelle 6* unter der Bezeichnung «unbekannt» aufgeführt.

Tabelle 5. Charakteristische Daten der Regressionsgeraden für die Korrelation zwischen $k'_{\text{⊗}}$ und k'_x bei verschiedenen Aktivitäten der Trennsäule

Pik Nr.	Isomer	N ^{a)}	b	a	r	Berechnete Werte für k'_{x^b} bei	
						$k'_{\text{⊗}}=4$	$k'_{\text{⊗}}=15$
①	13, 13'-di- <i>cis</i>	19	0,375	0,891	0,9981	2,39	6,51
②	9, 13, 13'-tri- <i>cis</i>	19	0,428	0,724	0,9977	2,44	7,15
③	9, 13'-di- <i>cis</i>	19	0,463	1,017	0,9995	2,87	7,96
3a		18	0,509	0,851	0,9983	2,89	8,49
3b		14	0,924	-2,07	0,9969	1,62	11,8
3c		15	1,002	-2,44	0,9899	1,57	12,6
④	15- <i>cis</i>	18	0,557	1,26	0,9988	3,49	9,61
⑤	9, 13-di- <i>cis</i>	19	0,938	-0,357	0,9997	3,36	13,6
⑥	13- <i>cis</i>	«Bezugs»-Isomeres				4	15
⑦	9,9'-di- <i>cis</i>	15	2,03	-5,04	0,9956	3,07	25,4

a) N = Anzahl Wertepaare, die für die Berechnung verwendet wurden.

b) Diese Werte wurden für die Konstruktion der Regressionsgeraden (*Fig. 5*) verwendet.

Tabelle 6. Isomerenzusammensetzung der Carotin-Fraktion von Pflanzenextrakten^{a)}

Carotin-Isomer	Karottenextrakt Flächenprozent	Paprikaextrakt Flächenprozent
β -Carotin:		
all- <i>trans</i>	58,4	54,8
9- <i>cis</i>	2,0	6,9
13- <i>cis</i>	5,7	13,3
15- <i>cis</i>	0,8	1,8
9,9'-di- <i>cis</i>	1,4	1,2
9, 13-di- <i>cis</i>	1,2	1,4
9, 13'-di- <i>cis</i>	0,3	1,3
13, 13'-di- <i>cis</i>	0,5	1,6
9, 13, 13'-tri- <i>cis</i>	0,2	-
andere <i>cis</i>	0,8	1,2
unbekannte Komp.	7,0	13,3
α -Carotin	21,7	3,2
Gesamt-Carotin	100	100

a) Messwellenlänge: 420 nm.

Experimenteller Teil

Herstellen der Isomerenlösungen. Nach einer Vorschrift von Zechmeister & Polgár [4]: Zu der Lösung von 10 mg krist. β -Carotin in 100 ml Hexan werden 0,2 mg Jod gegeben und unter Ar 30 Min. dem Licht einer Neon-Fluoreszenz-Lampe ausgesetzt. Nach dem Einengen der Lösung auf ein Fünftel, werden 10 μ l der Lösung auf die Trennsäule injiziert.

Das Trennsystem. Eine schematische Darstellung des verwendeten Trennsystems zeigt *Figur 1*. Das gut wärmeisolierte geschlossene Glasgefäß A, an dessen Oberseite fünf mit Schlifflen versehene Ansätze angeschmolzen sind, dient als Vorratsgefäß für die mobile Phase. Beim Aufsatz B handelt es sich im Prinzip um ein thermostatisierbares Chromatographierohr, das gut zur Hälfte mit Al_2O_3 , belegt mit 15% H_2O , gefüllt ist. Mit Hilfe der Membranpumpe P1 wird das Eluens *via* Säule B ständig im Kreislauf umgewälzt. Dabei ist der feinregulierbare Hahn H1 so eingestellt, dass der allergrösste Teil des am Kolonnenkopf zufließenden Eluens durch die Al_2O_3 -Füllung, der Rest *via* Überlauf U in das Vorratsgefäß A zurückfließt. Der Lösungsmittelvorrat wird mittels eines Magnetrührers M in leichter Bewegung gehalten. Über das mit CaCl_2 und Blaugel gefüllte Röhrchen E erfolgt der Druckausgleich des Systems. Die Kombination Vorratsgefäß A, Hochdruckpumpe P2, Einspritzblock J, Vorsäule S, Kolonne C, Detektor D entspricht einem üblichen HPLC.-Trennsystem. Mit Ausnahme der Hochdruckpumpe und des Detektors sind sämtliche Teile des HPLC.-Systems mittels Watte wärmeisoliert. Beim eingebauten Hahnen H3 handelt es sich um ein Ventil mit sechs Ein- bzw. Austritten ('six port valve'), das im Normalbetrieb in Position a steht (*Fig. 2*). Das Eluens fließt in diesem Fall von der Hochdruckpumpe P2 *via* Hahnen H3 und Vorsäule S zum Einspritzkopf J der Trennsäule C und von deren Ende *via* H3 zum Detektor D und von dort zurück zum Vorratsgefäß A. Der zwischen Detektor D und Vorratsgefäß A eingebaute Dreiweg-Hahnen H2 ermöglicht das Abfangen einzelner chromatographischer Fraktionen. Für die Aufnahme der UV./VIS.-Spektren einzelner chromatographischer Fraktionen wird der Hahnen H3 in Position b (*Fig. 2*) gebracht: Eingang und Ausgang der Trennsäule werden dadurch kurzgeschlossen, d.h. der Trennvorgang in der Kolonne ist unterbrochen, der Kolonnendruck jedoch bleibt erhalten. Gleichzeitig ist auch der Eluensstrom durch die Messzelle des Detektors gestoppt. Das Eluens fließt von P2 zu H3 und von dort über eine Restriktion R, die einen möglichst ähnlichen Gegendruck erzeugt wie die eingesetzte Trennsäule, in das Vorratsgefäß A zurück. Die Kolonnen C und B werden mit Hilfe je eines Umwälzthermostaten (TH1 und TH2) auf die gewünschte Temperatur eingestellt. Die leere Vorsäule S befindet sich im Bad des Thermostaten der Trennsäule und dient lediglich zum Vorthermostatisieren der mobilen Phase.

Vor Inbetriebnahme des gesamten Systems muss dieses zunächst ins thermodynamische Gleichgewicht gebracht werden, was etwa 4 Tage dauert. Für das vorliegende Trennproblem sind die beiden Thermostaten zunächst auf Erfahrungswerte von 24° eingestellt. Durch Feinregulierung der Temperatur des Thermostaten TH 2 wird hierauf die chromatographische Trennung optimiert, was nochmals 1-2 Tage erfordert. Während des Routineeinsatzes des Trennsystems werden abends jeweils ca. 400 ml, an Wochenenden bis zu 2 Liter Hexan nachgefüllt. Vor der Zugabe wird dieses zwecks Voräquilibration bei Raumtemperatur 2mal über eine ca. 70 cm lange, mit Al_2O_3 (belegt mit 15% H_2O) gefüllte Chromatographiesäule abfiltriert.

Spezifikation der einzelnen Komponenten. A: 5-l-Vorratsgefäß aus Glas, gefüllt mit Hexan; aus Sicherheitsgründen in einem entsprechend dimensionierten Blechbehälter stehend. H1: Glashahnen mit Teflonküken, welches eine Feinregulierung ermöglicht. B: Thermostatisierbares Chromatographierohr (Innendurchmesser 8,5 cm, Länge 30 cm) mit Überlauf U und unten eingeschmolzener Sinterplatte Typ P2, gefüllt mit 450 g Al_2O_3 (Woelm, Akt.1). Vor dem Einfüllen wird das Al_2O_3 mit 67,5 ml dest. H_2O versetzt und unter gelegentlichem Durchschütteln 4 Std. in einem gut verschlossenen Gefäß aufbewahrt. P1: *Prominent-Electronic*-Dosierpumpe (Baureihe B) oder *Duramat*-Dosierpumpe. Pro Min. werden ca. 140 ml Eluens umgepumpt. P2: Hochdruckpumpe, *Altex 110* bzw. *Orlita*. S: Als Vorsäule dienen zwei parallel geschaltete leere Stahlsäulen (13 \times 100 mm) mit Kapillaran schlüssen, die im Thermostatenbad untergebracht sind. J: Septum-Einspritzkopf von *Perkin Elmer*. C: Analytische Säule (Innendurchmesser 2,8 mm, Länge 25 cm) oder semipräparative Säule (Innendurchmesser 7,7 mm, Länge 25 cm); stationäre Phase in beiden Fällen Aluminiumoxyd (*Spherisorb A 5Y*). H2: Kapillardreiweghahn von *Hamilton*. H3: Sog. 'six port valve' von *Valco* (Stahl; CV 6 UHP aN 60). R: Als Restriktion wird ein Nadelventil von *Whitney*, Typ SS-22RS-3MMM verwendet. D: *Uvikon 720 LC* von *Kontron* 'Scan'-Bereich 200-550 nm. M: Magnetrührer. Teflon-beschichtete Magnetührer haben sich nicht bewährt. Auch wenn deren Abrieb minimal ist, lässt sich ein Verstopfen der Fritten am unteren Ende der An-

saugleitungen nicht vermeiden. In Glas eingeschmolzene Eisenkerne sind geeigneter. TH1 und TH2: Umwälzthermostaten. Infolge der hohen Empfindlichkeit des Trennsystems auf Temperaturschwankungen sind zur Thermostatisierung der Kolonnen B und C nur Präzisionsthermostaten geeignet (z.B. *Haake*, Typ N3-H21; Temperaturkonstanz $\pm 0,01^\circ$). Wegen des leichtflüchtigen Eluens sollten diese unbedingt mit einem Sicherheitsschalter ausgerüstet sein, der bei einer Überschreitung des Temperatursollwertes den Thermostaten abschaltet.

¹H-NMR.-Spektren. Sie wurden bei 270 MHz in CDCl₃ (Qualität 100% D) auf einem *Bruker-HX-270-FT*-Spektrometer mit *Aspect 2000* Computer (32K Daten) und Diskeinheit aufgenommen. Im allgemeinen erfolgten die Aufnahmen in *Wilmad*-Mikrozellen mit etwa 0,2 ml Volumen. Wegen der teilweise sehr kleinen Substanzmengen betrug die Messzeiten bis zu 63 Std.

Massenspektren. Sie wurden auf einem *AEI-MS9*-Spektrometer mit direktem Einlass (Elektronenstossionisation, 70 eV) aufgenommen. Die MS. der all-*trans*- und der *cis*-Verbindungen waren im wesentlichen identisch. MS. (all-*trans*-1): 536 (45, M⁺), 444 (16), 430 (4), 219 (13), 197 (12), 157 (26), 145 (34), 133 (32), 119 (72), 105 (62), 95 (51), 91 (45), 81 (48), 69 (100), 55 (60), 41 (48).

Wir sind folgenden Herren sehr zu Dank verpflichtet: Herrn Dr. *P. Kreienbühl* für die vielen β -Carotin Standards, Herrn *W. Meister* für die Interpretation der Massenspektren, Herrn Dr. *R. Rüegg* und Herrn *E. Brodbeck* für die Herstellung der β -Carotinextrakte, Herrn *E. Glinz* für die wertvolle Mithilfe bei der Entwicklung der Methode und den Herren *W. Grunauer*, *K. Schmidt* und *R. Mutz* für ihre ausgezeichnete experimentelle Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. Kuhn & E. Lederer*, *Naturwissenschaften* 19, 306 (1931); *ibidem*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 64, 1349 (1931).
- [2] *R. Kuhn, A. Winterstein & E. Lederer*, *Z. Physiol. Chem.* 197, 141 (1931).
- [3] *M. Tswett*, *Proc. Warsaw Soc. Natur. Sci. Biol. Sect.* 14, 6 (1903).
- [4] *L. Zechmeister & A. Polgár*, *J. Am. Chem. Soc.* 64, 1856 (1942); *H. H. Strain*, *ibid.* 63, 3448 (1941).
- [5] *J. W. Porter & F. P. Zscheibe*, *Arch. Biochem.* 10, 537 (1946).
- [6] *I. Stewart & T. A. Wheaton*, *J. Chromatogr.* 55, 325 (1971).
- [7] *A. Fiksdahl, J. T. Mortensen & S. Liaaen-Jensen*, *J. Chromatogr.* 157, 111 (1978).
- [8] *M. Zakaria, K. Simson, P. R. Brown & A. Krestulovic*, *J. Chromatogr.* 176, 109 (1979).
- [9] *H. Pfander, H. Schurtenberger & V. R. Meyer*, *Chimia* 34, 179 (1980).
- [10] *L. Snyder*, 'Principles of Adsorption Chromatography', *Marcel Dekker Inc.*, New York 1968.
- [11] *J. H. Knox*, 'High-Performance Liquid Chromatography', *Edinburgh University Press*, ISBN 0852243413.
- [12] *H. Engelhardt & W. Boehme*, *J. Chromatogr.* 133, 67 (1977).
- [13] *G. Englert & M. Vecchi*, *Helv. Chim. Acta* 63, 1711-1718 (1980).
- [14] *G. Englert, S. Weber & M. Klaus*, *Helv. Chim. Acta* 61, 2697-2708 (1978).
- [15] *G. Englert*, 'NMR. of Carotenoids', in: 'Carotenoids-6', Herausgeber *T. W. Goodwin*, *Pergamon Press*, Oxford 1981.