

## 99. Chromatographische Trennung und Identifizierung diastereomerer Carotinoide mit grossem räumlichem Abstand der chiralen Zentren

von Max Vecchi<sup>a</sup>), Gerhard Englert<sup>a</sup>) und Hans Mayer<sup>b</sup>)

Zentrale Forschungseinheiten<sup>a</sup>) und Abteilung für Vitamin- und Ernährungsforschung<sup>b</sup>)

F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, CH-4002 Basel

Herrn Prof. Dr. W. Boguth zum 65. Geburtstag gewidmet

(24.II.82)

### Chromatographic Separation and Identification of Diastereomeric Carotenoids with Distant Chiral Centers

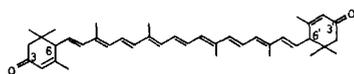
#### Summary

The high-performance liquid chromatographic separation of diastereomeric C<sub>40</sub>-carotenoids is described possessing chiral centers which are separated by 18 C-atoms (nonaene system). The method is applied to the separation of the two diastereomers of 6,6'-dihydrorhodoxanthin **1a** and **1b** ( $\epsilon, \epsilon$ -carotene-3,3'-dione) and the six diastereomers of tunaxanthin ( $\epsilon, \epsilon$ -carotene-3,3'-diol; **2a–2f**). Conditions for the separation of lutein [(3*R*, 3'*R*, 6'*R*)- $\beta, \epsilon$ -carotene-3,3'-diol, **3a**], 3'-epi-lutein [(3*R*, 3'*S*, 6'*R*)- $\beta, \epsilon$ -carotene-3,3'-diol, **3b**] and its 13'-*cis*- (**3c**) and 13-*cis*-stereoisomers (**3d**) are also reported. Identification of the different chromatographic fractions was possible by use of authentic synthetic samples or by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.

Durch Auswahl geeigneter chromatographischer Trennsysteme ist es uns gelungen, diastereomere C<sub>40</sub>-Carotinoide zu trennen, bei denen die Konfigurationen in den beiden durch neun konjugierte Doppelbindungen getrennten Endgruppen verschieden sind. Wir berichten im folgenden über die erfolgreiche Trennung der Diastereomeren **1a** und **1b** von all-*trans*-6,6'-Dihydrorhodoxanthin (**1**,  $\epsilon, \epsilon$ -Carotin-3,3'-dion) sowie der sechs möglichen Diastereomeren von all-*trans*-Tunaxanthin (**2a** bis **2f**,  $\epsilon, \epsilon$ -Carotin-3,3'-diol). Ferner behandeln wir die Auftrennung eines Xanthophyll-Extraktes aus der Haut der Regenbogenforelle in die Fraktionen all-*trans*-Lutein (**3a**), all-*trans*-3'-epi-Lutein (**3b**), sowie dessen 13'-*cis*- (**3c**) und 13-*cis*-Stereoisomeren (**3d**; siehe *Schema*).

(6*RS*, 6'*RS*)-Dihydrorhodoxanthin (**1**). Diese Verbindung weist in Stellung 6 und 6' chirale Zentren auf. Die *meso*-Verbindung **1b** (6*R*, 6'*S*) sowie die optisch-aktive Form **1a** (6*S*, 6'*S*) wurden kürzlich als Metabolite aus Eidottern von Hühnern nach Verfütterung von Lutein **3a** bzw. von (3*R*, 3'*R*)-Zeaxanthin (**4**) isoliert [1]. Über die Synthese von **1**, dem Gemisch aus Racemat und *meso*-Form, wurde ebenfalls berichtet [2].

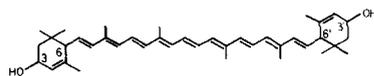
Schema



**1** (6*RS*, 6'*RS*)

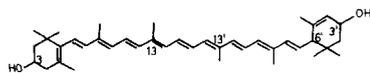
**1a** (6*R*, 6'*R*), (6*S*, 6'*S*): A–Z–A, B–Z–B

**1b** (6*R*, 6'*S*), *meso*: A–Z–B



**2** (3*RS*, 6*RS*, 3'*RS*, 6'*RS*)

**2a–2f**: vgl. *Tabelle 1*



**3a** (3*R*, 3'*R*, 6'*R*) G–Z–C

**3b** (3*R*, 3'*S*, 6'*R*) G–Z–D

**3c** 13'-*cis*-**3b**

**3d** 13-*cis*-**3b**

**4** G–Z–G

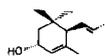
**5** G–Z–A



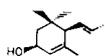
**A** (6*R*)



**B** (6*S*)



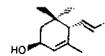
**C** (3*R*, 6*R*)



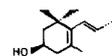
**D** (3*S*, 6*R*)



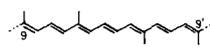
**E** (3*R*, 6*S*)



**F** (3*S*, 6*S*)

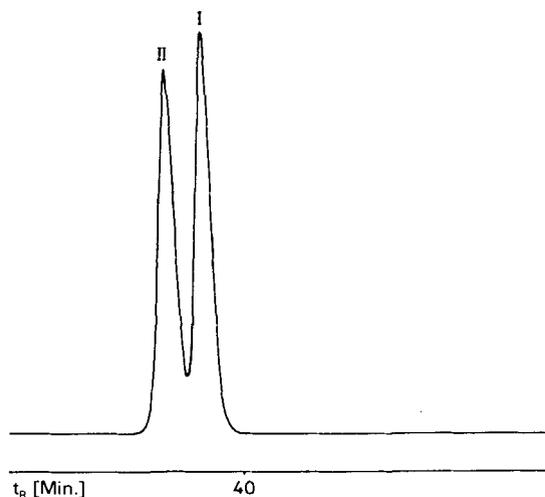


**G** (3*R*)



**Z**

Bei der chromatographischen Reinheitsprüfung mehrerer Chargen von **1** fanden wir zu unserer Überraschung, dass unter geeigneten experimentellen Bedingungen eine Auftrennung in zwei gleichstarke Fraktionen erzielt werden kann. Als Beispiel zeigt *Figur 1* das HPLC. von **1**, erhalten mit *Lichrosorb CN* als stationärer Phase und Hexan, Dichlormethan und *N*-Äthyl-diisopropylamin als mobiler Phase. Wie



*Fig. 1.* Chromatographische Trennung der Diastereoisomeren von (6*RS*, 6'*RS*)-Dihydrorhodoxanthin (**1**).  
 Pik I: (6*R*, 6'*S*) (*meso*-**1b**); Pik II: (6*R*, 6'*R*) und (6*S*, 6'*S*) (**1a**).

wir im folgenden zeigen, handelt es sich hierbei um das Enantiomerenpaar **1a** (6*R*, 6'*R*/6*S*, 6'*S*) und die *meso*-Verbindung **1b** (6*R*, 6'*S*). Wie ersichtlich, ist eine vollständige chromatographische Trennung dieser Diastereoisomeren möglich. Dies ist bemerkenswert, sind doch die beiden chiralen Zentren 6 und 6' durch ein Nonaen-System voneinander getrennt. Eine Auftrennung des Racemates **1a** selbst konnte jedoch nicht erwartet werden, da weder die mobile noch die stationäre Phase des verwendeten Trennsystems optisch-aktiv sind. Um die Struktur der aufgetrennten Komponenten zu bestimmen, wurden die chromatographischen Fraktionen rechromatographiert und spektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl die UV.-Spektren (aufgenommen mit der 'stopped-flow' Methode) als auch die 270-MHz-<sup>1</sup>H-NMR.-Spektren (in CDCl<sub>3</sub>) der beiden Fraktionen sowie der eingespritzten Probe **1** in allen Einzelheiten identisch waren (siehe *Exper. Teil*). Eine eventuell denkbare Umlagerung der beiden Fraktionen beim Abfangen oder während der NMR.-Messung konnte ausgeschlossen werden, da die Retentionszeiten der Fraktionen vor und nach den NMR.-Aufnahmen identisch waren. Die Pikzuordnung (siehe *Fig. 1*) erfolgte mit Hilfe von Referenzsubstanzen, nämlich (6*R*, 6'*R*)- bzw. (6*S*, 6'*R*)-Dihydrorhodoxanthin, deren Strukturen aufgrund der gezielten chemischen Synthese aus optisch-aktiven Bausteinen bekannter absoluter Konfiguration bewiesen worden war [3].

Hinsichtlich der chromatographischen Auftrennung der Diastereoisomeren von **1** ist noch erwähnenswert, dass wir kein anderes Trennsystem finden konnten, mit dem diese Trennung auch nur andeutungsweise erreicht wurde, obwohl eine Reihe von Nitril- und C<sub>18</sub>-Phasen sowie Silicagele verschiedener Provenienz zu diesen Versuchen eingesetzt wurden.

(3*RS*, 6*RS*, 3'*RS*, 6'*RS*)-*Tunaxanthin* (**2**). Bei der Reduktion von synthetischem all-*trans*-6, 6'-Dihydrorhodoxanthin (**1**) entstehen die verschiedenen *Tunaxanthine* **2** [2]. Diese besitzen vier chirale Zentren (3, 6, 3', 6'), die dem Typ A-B/B-A entsprechen. Daraus leiten sich insgesamt zehn Isomere ab, nämlich vier Enantiomerenpaare und zwei *meso*-Formen [4–10] (vgl. *Tabelle*).

Über die Synthese der optisch-aktiven Verbindungen, die uns als Referenzverbindungen zur Zuordnung der chromatographischen Fraktionen zur Verfügung standen, wird demnächst berichtet werden [3]. Da wiederum keine Auftrennung der

Tabelle. Daten der stereoisomeren *Tunaxanthine* **2**

	Struktur	Konfiguration	Weitere Bezeichnung	Symmetrie	Peak
<b>2a</b>	C–Z–C	(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>R</i> )- <sup>1</sup> )	Lactucaxanthin	C <sub>2</sub>	I
	F–Z–F	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 3' <i>S</i> , 6' <i>S</i> )-	<i>ent.</i> Lactucaxanthin		
<b>2b</b>	D–Z–D	(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 3' <i>S</i> , 6' <i>R</i> )-	Chiriquixanthin B	C <sub>2</sub>	II
	E–Z–E	(3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>S</i> )- <sup>1</sup> )	<i>ent.</i> Chiriquixanthin B		
<b>2c</b>	C–Z–E	(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>S</i> )- <sup>1</sup> )		C <sub>1</sub>	III
	F–Z–D	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 3' <i>S</i> , 6' <i>R</i> )- <sup>1</sup> )			
<b>2d</b>	C–Z–D	(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 3' <i>S</i> , 6' <i>R</i> )- <sup>1</sup> )	Chiriquixanthin A	C <sub>1</sub>	IV
	F–Z–E	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>S</i> )-	<i>ent.</i> Chiriquixanthin A		
<b>2e</b>	E–Z–D	(3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> , 3' <i>S</i> , 6' <i>R</i> )- <sup>1</sup> )	<i>meso</i>	S <sub>2</sub> (C <sub>i</sub> )	V
<b>2f</b>	C–Z–F	(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 3' <i>S</i> , 6' <i>S</i> )- <sup>1</sup> )	<i>meso</i>	S <sub>2</sub> (C <sub>i</sub> )	VI

<sup>1</sup>) Für die Zuordnung verwendete Referenzsubstanzen s. [3]. **2c** wurde als Racemat eingesetzt.

Komponenten der verschiedenen Enantiomerenpaare zu erwarten war, genügte für die Identifizierung das Vorhandensein jeweils eines der Enantiomeren (vgl. Tabelle).

Wie *Figur 2* zeigt, lassen sich alle sechs Diastereoisomere (vier Enantiomerenpaare sowie die beiden *meso*-Verbindungen) mit *Spherisorb 5 CN* als stationärer und Hexan/Dichlormethan/Methanol/Base als mobiler Phase weitgehend voneinander trennen. Dabei weisen jene Komponenten (I und VI), bei denen die Substituenten in den Stellungen 3 und 6 bzw. 3' und 6' jeweils *trans* zueinander stehen (*trans/trans*-Konfiguration), die kürzesten Retentionszeiten auf, gefolgt von den Fraktionen III und IV, bei denen die Substituenten am einen Ring in *trans*-, am anderen dagegen in *cis*-Konfiguration vorliegen (*trans/cis*-Konfiguration). Am stärksten verzögert erscheinen die Fraktionen II und V mit *cis/cis*-Konfiguration. Wie ersichtlich, wird jeweils diejenige Komponente eines solchen Isomerenpaares stärker verzögert, die in den Asymmetriezentren 6 und 6' gleiche Chiralität aufweist. So hat z. B. bei den Verbindungen mit *cis/cis*-Konfiguration die Fraktion II mit (6*S*, 6'*S*)- bzw. (6*R*, 6'*R*)-Konfiguration eine wesentlich längere Retentionszeit als die Komponente V mit (6*S*, 6'*R*)-Konfiguration. Die für das Isomerenpaar mit *trans/trans*-Konfiguration (I und VI) erzielte relative Retention  $\alpha$  ist wesentlich kleiner als diejenige der übrigen Paare IV und III bzw. V und II.

In Anbetracht der komplizierten Konformationsverhältnisse der substituierten Cyclohexenringe mit Gleichgewichtslagen, die vermutlich von Lösungsmittel und Temperatur abhängig sind, erscheint uns eine weitere Interpretation der erhaltenen experimentellen Befunde derzeit nicht möglich.

Einige weitere experimentelle Erfahrungen, die beim Ausarbeiten geeigneter Bedingungen zur Auftrennung der Fraktionen I bis VI gemacht wurden, sind aus

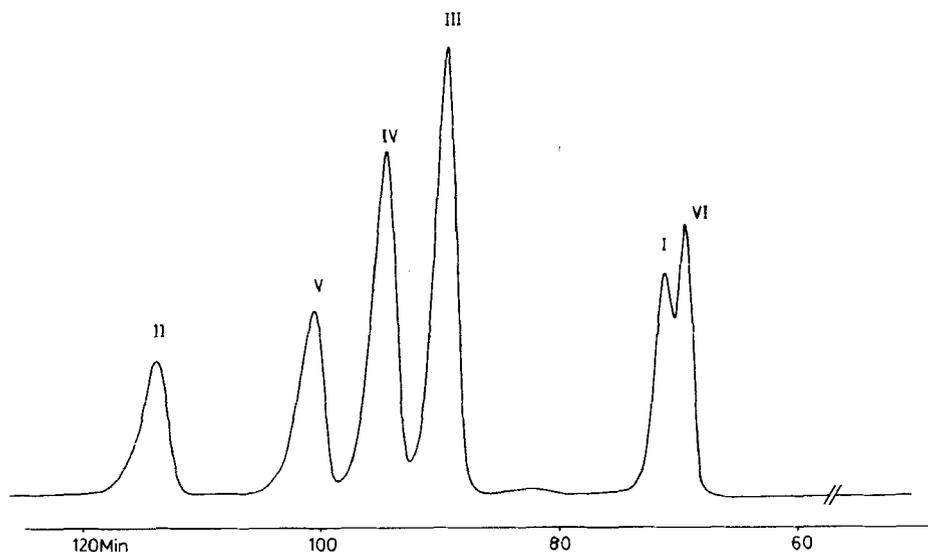


Fig. 2. Chromatographische Auftrennung der Diastereoisomeren von Tunaxanthin 2 (vgl. Tabelle)

Figur 3 (A bis F) noch ersichtlich. Schematisch dargestellt ist die mit verschiedenen käuflichen Nitrilphasen (A bis D) erzielte Trennung, wobei jeweils die gleiche mobile Phase eingesetzt wurde. Analoge Ergebnisse mit unbehandelten Silicagelen verschiedener Herkunft sind ebenfalls aufgeführt (E und F). Bei Ausführung der Analysen waren die benutzten Trennsysteme jeweils seit Tagen im Gleichgewicht. Wie ersichtlich, unterscheiden sich die verschiedenen Nitrilphasen sehr stark in ihrer Selektivität. Eine akzeptable Auftrennung aller sechs Diastereomeren konnte nur auf *Spherisorb 5 CN* erzielt werden. Andererseits erlaubt z. B. *Polygosil (Polygosil CN* wie auch *Lichrosorb CN*) eine bessere Auflösung ( $R=0.8$ ) des *trans/trans*-Isomerenpaares VI und I. Auf der rechten Seite der Graphik ist bei den Nitrilphasen jeweils der N- bzw. C-Gehalt aufgeführt, der sich aus der mikroanalytischen Elementaranalyse der betreffenden Phase ergibt. Offensichtlich besteht kein einfacher Zusammenhang zwischen der prozentualen Belegung des Silicagels mit Nitrilphase und der Selektivität der betreffenden stationären Phase. Andererseits zeigt die Prüfung verschiedener Chargen von Nitrilphasen, die im Laufe eines Jahres eingekauft wurden, dass Phasenmaterial gleicher Herkunft – von Nuancen abgesehen – stets die gleiche Selektivität aufweist. Dies lässt vermuten, dass bei der Herstellung dieser reversen Phasen verschiedene Verfahren angewandt werden, die zu einem mehr oder weniger firmenspezifischen Produkt führen. Ähnliche

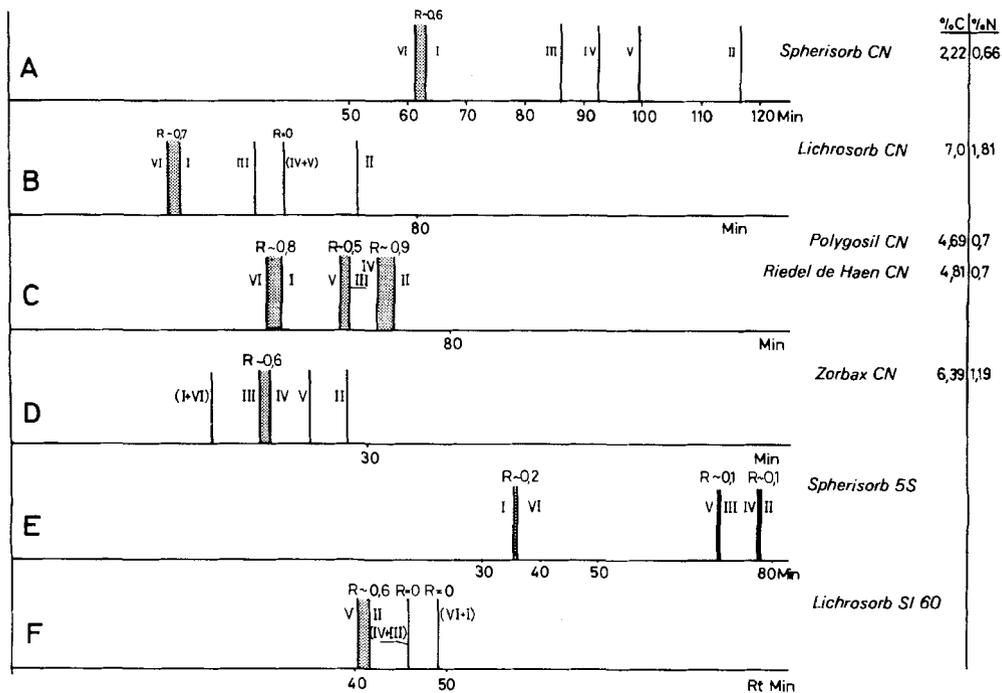


Fig. 3. Schematische Darstellung der Retentionszeiten der Fraktionen I bis VI von Tunaxanthin (Zuordnung vgl. Tabelle) auf verschiedenen stationären Phasen. Mobile Phase: Hexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / $\text{CH}_3\text{OH}$ / $N$ -Äthylisopropylamin.

Feststellungen machten *Nice & O'Hara* [11] sowie *Rabel et al.* [12] bei der Untersuchung verschiedener  $C_{18}$ -Phasen.

Das Analysenergebnis entsprechender Trennversuche auf unbehandeltem Silicagel verschiedener Provenienz zeigen die *Figuren 3 E* und *3 F*. Auf *Spherisorb 5 S* – wie auf der entsprechenden Nitrilphase – werden die Verbindungen mit *trans/trans*-Konfiguration (I und VI) als erste eluiert. Gut aufgelöst werden einerseits auch die Diastereomerenpaare mit *cis/trans*- (IV, III), andererseits mit *cis/cis*-Konfiguration (II, V). Da letztere in diesem System wesentlich kürzere relative Retentionszeiten aufweisen, ist eine Auftrennung eines Gemisches dieser vier Komponenten unter diesen Bedingungen nicht möglich. Wird andererseits ein Gemisch I bis VI der vier Enantiomerenpaare und der beiden *meso*-Verbindungen auf Silicagel *Lichrosorb SI 60* wiederum mit der gleichen mobilen Phase chromatographiert, so ergibt sich ein wesentlich anderes Bild: Die Verbindungen mit *cis/cis*-Konfiguration II und V werden jetzt zuerst eluiert, gefolgt von den beiden Diastereomeren mit *cis/trans*-Konfiguration IV und III, die jedoch beide identische Retentionszeiten aufweisen. Ebenfalls nicht aufgetrennt werden die Verbindungen mit *trans/trans*-Konfiguration I und VI, die in diesem System als letzte eluiert werden.

*Lutein und 3'-epi-Lutein.* Aus Xanthophyllfraktionen von Forellenhautextrakten wurden Lutein (**3a**), 3'-epi-Lutein (**3b**), 13'-*cis*-3'-epi-Lutein (**3c**) und 13-*cis*-3'-epi-Lutein (**3d**) identifiziert [1] [13]. Als Beispiel zeigen wir in *Figur 4* das Chromatogramm einer derartigen Probe, aufgetrennt auf dem Silicagel *Spherisorb 5 S* mit einer Mischung von Hexan, Dichlormethan, 2-Propanol und einer Base als mobiler Phase. Die Zuordnung von Pik I zu **3a** und von Pik IV zu **3b** erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten in zwei verschiedenen HPLC.-Systemen, der UV.- und MS.-Spektren mit den Daten vorhandener Referenzverbindungen. Von Pik IV wurde ausserdem ein 270-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen, welches eben-

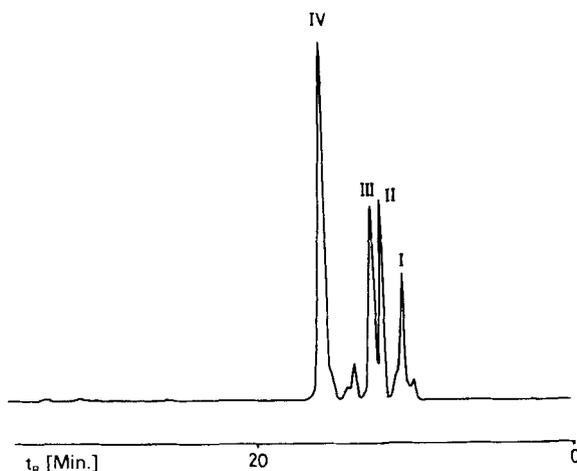


Fig. 4. *Chromatographische Auftrennung eines vorgereinigten Forellenhautextraktes.* Pik I: Lutein (**3a**); Pik II: 13'-*cis*-3'-epi-Lutein (**3c**); Pik III: 13-*cis*-3'-epi-Lutein (**3d**); Pik IV: 3'-epi-Lutein (**3b**).

falls mit demjenigen von authentischem Material identisch war (siehe *Exper. Teil*). Die absolute Konfiguration von **3b** aus Fraktion IV folgt eindeutig aus dem bereits veröffentlichten CD.-Spektrum [14] durch Vergleich mit Literaturdaten [15]. Die absolute Konfiguration von **3a** aus I nehmen wir aus Analogiegründen an [13][16].

Die relative Konfiguration sowie die Lage der *cis*-Doppelbindungen von **3c** und **3d** folgten aus dem 270-MHz-<sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum eines (1:1)-Gemisches beider Komponenten, das bei unseren ersten Trennversuchen noch als *eine* Fraktion eluiert worden war. Da für die späteren, verbesserten Trennungen nicht mehr genügend Material für NMR.-Untersuchungen zur Verfügung stand, musste der eigentliche Beweis für das Vorliegen von **3c** und **3d** im Gemisch indirekt geführt werden, nämlich durch Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten auf zwei verschiedenen Trennsystemen mit demjenigen von authentischem Material, welches durch Isomerisierung von 3'-epi-Lutein (**3b**) erhalten wurde. Ausserdem liess sich das <sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum des Gemisches additiv aus den Einzelspektren der beiden authentischen Verbindungen darstellen (siehe *Exper. Teil*). Wie bereits in einigen früheren Fällen anderer 13-*cis*-isomerer Carotinoide gezeigt wurde (vgl. z. B. [17][18]) lässt sich die 13- bzw. 13'-Stellung der *cis*-Doppelbindungen in sehr einfacher Weise aus der gegenüber der all-*trans*-Verbindung beobachteten Tieffeldverschiebung (ca. 0.5 ppm) der Protonen H-C(12) bei **3d** bzw. H-C(12') bei **3c** ableiten. Wir betrachten daher aufgrund der vorgebrachten Überlegungen die vorgeschlagenen Strukturen der Fraktionen I bis IV als hinreichend gesichert.

Für die Überlassung von Substanzen sind wir Frau K. Schiedt sowie den Herren Dres. R. Zell und E. Widmer aus unserer Firma zu grossem Dank verpflichtet. Den Herren E. Glinz, W. Grunauer und K. Holzhauser danken wir für ihre ausgezeichnete experimentelle Mitarbeit.

### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Die Auftrennung der verschiedenen Komponenten erfolgte durch HPLC. Die apparative Ausrüstung bestand aus einer *Alex 100* Pumpe, einem Septum Einspritzkopf (*Perkin-Elmer*), verschiedenen Trennsäulen (500 × 3, 2 mm, selbsthergestellt) und dem UV/VIS.-Detektor *LCD-725* (*Kontron*). Detektiert wurde bei 470 nm. Der Eluentsfluss betrug 1,2 ml/Min. Die <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren wurden in CDCl<sub>3</sub> bei 270 MHz (*Bruker HX-270*) oder 400 MHz (*Bruker WM-400*; beide Geräte mit *Aspect 2000 Computer*, 32 K Daten) aufgenommen. <sup>13</sup>C-NMR.: Aufnahme bei 68 MHz (*HX-270*) in CDCl<sub>3</sub>.

*Auftrennung von (6RS,6'RS)-Dihydrohodoxanthin (I; Gemisch von 1a und 1b).* Synthese und Eigenschaften von **1** wurden von *Widmer et al.* beschrieben [2], welche uns freundlicherweise die Substanz für unsere Versuche zur Verfügung stellten. HPLC.: Als stationäre Phase diente *Lichrosorb CN* (*Merck*), 7 μm, als mobile Phase eine Mischung von Hexan, 10% (V/V) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1% (V/V) *N*-Äthyl-diisopropylamin.

<sup>1</sup>H-NMR. von **1** (400 MHz, 6,3 mg in 0,5 ml): 0,971 und 1,050 (*s*, je 3 H, H<sub>3</sub>C-C(1,1')); 1,906 (*d* × *d*, *J* = 1,3 und 0,4, 6 H, H<sub>3</sub>C-C(5,5')); 1,914 (*s*, 6 H, H<sub>3</sub>C-C(9,9')); 1,969 (*s*, 6 H, H<sub>3</sub>C-C(13,13')); 2,377 und 2,097 (*2d*, *J* = 17, je 2 H, H<sub>2</sub>C(2,2')); 2,607 (*d*, *J* = 9,5, 2 H, H-C(6,6')); 5,54 (*d* × *d*, *J* = 15,5 und 9,5, 2 H, H-C(7,7')); 5,91 (*br. s*, 2 H, H-C(4,4')); 6,17 (*d*, *J* ≈ 11,5, 2 H, H-C(10,10')); 6,23 (*d*, *J* = 15,5, 2 H, H-C(8,8')); ca. 6,27 (*m*, 2 H, H-C(14,14')); 6,38 (*d*, *J* ≈ 14,8, 2 H, H-C(12,12')); 6,60 (*d* × *d*, *J* = 14,7 und 11,3, 2 H, H-C(11,11')); 6,63 (*m*, 2 H, H-C(15,15')). Eine Aufspaltung der Signale der Diastereoisomeren konnte auch bei Anwendung der «resolution-enhancement»-Methode (Auflösung besser als 0,2 Hz) nicht beobachtet werden.

Die 400-MHz-<sup>1</sup>H-NMR.-Spektren der *meso*-Verbindung **1b** (ca. 1 mg in 0,5 ml) und die 270-MHz-<sup>1</sup>H-NMR.-Spektren der Fraktionen I und II (ca. 20 µg in 0,3 ml) ergaben innerhalb der Messgenauigkeit identische <sup>1</sup>H-NMR.-Daten.

<sup>13</sup>C-NMR. von **1** (68 MHz): 12,78 (H<sub>3</sub>C–C(13,13′)); 13,04 (H<sub>3</sub>C–C(9,9′)); 25,59 (H<sub>3</sub>C–C(5,5′)); 27,27 und 27,90 (H<sub>3</sub>C–C(1,1′)); 36,51 (C(1,1′)); 47,59 (C(2,2′)); 56,30 (C(6,6′)); 124,57 (C(11,11′)); 125,57 (C(4,4′) und C(7,7′)); 130,25 (C(15,15′)); 132,09 (C(10,10′)); 133,00 (C(14,14′)); 134,39 (C(9,9′)); 136,35 (C(13,13′)); 138,30 (C(12,12′)); 138,49 (C(8,8′)); 162,13 (C(5,5′)); 199,00 (C(3,3′)). Die Zuordnung der Signale wurde durch Aufnahme des <sup>1</sup>H-gekoppelten <sup>13</sup>C-NMR.-Spektrums sowie durch mehrere Zugaben des Verschiebungsreagens Yb(dpm)<sub>3</sub> (Stohler Isotope Chemicals) unterstützt. Auch im <sup>13</sup>C-NMR.-Spektrum wurden keine Aufspaltungen für die Diastereoisomeren beobachtet.

*Auftrennung von (3RS,6RS,3′RS,6′RS)-Tunaxanthin (2)*. Das Gemisch der Isomeren **2a** bis **2f** wurde durch Reduktion von **1** mit DIBAH erhalten [2]. Hinsichtlich der Synthese und Eigenschaften der zur Zuordnung der Fraktionen von **2** verwendeten optisch-aktiven Referenzverbindungen verweisen wir auf [3]. HPLC.: Es wurde eine Reihe von chemisch gebundenen stationären Phasen eingesetzt: Spherisorb S-5CN (Phase Sep); Lichrosorb CN (Merck), 7 µm; Polygosil CN (Machery & Nagel), 5 µm; Riedel de Haen CN, 5 µm; Zorbax (Du Pont), 10 µm. Als mobile Phase diente dabei stets Hexan, 17% (V/V) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,1% (V/V) Methanol, 0,1% (V/V) *N*-Äthylidiisopropylamin. Zwei verschiedene Silicagele, Spherisorb 5 S (Phase Sep) und Lichrosorb SI 60 (Merck) wurden ebenfalls eingesetzt, wobei eine Mischung aus Hexan, 40% (V/V) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,1% (V/V) Methanol und 0,1% (V/V) *N*-Äthylidiisopropylamin als mobile Phase verwendet wurde.

*Auftrennung von Lutein (3a) und den 3′-epi-Lutein-Isomeren 3b, 3c und 3d*. Natürliches Lutein (**3a**), dessen spektrale Daten (UV., CD., <sup>1</sup>H-NMR., MS.) mit entsprechenden Literaturwerten übereinstimmen [16], wurde uns freundlicherweise von Frau K. Schiedt zur Verfügung gestellt. Die Verbindung **3b** wurde durch Reduktion aus **5** hergestellt. Als Nebenprodukte wurden daraus durch chromatographische Abtrennung geringe Mengen der 13-*cis*- und 13′-*cis*-Isomeren **3d** und **3c** erhalten. HPLC.: Als stationäre Phase diente Lichrosorb SI 60 (5 µm) bzw. Spherisorb 5 S; als mobile Phase Hexan, 6,5% (V/V) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2,5% (V/V) 2-Propanol, 0,1% (V/V) *N*-Äthylidiisopropylamin.

<sup>1</sup>H-NMR. von **3a** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,845 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C(β)–C(1′)); 1,000 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C(α)–C(1′)); 1,306 (d, *J* = 7, 1 H, HO–C(3′)); 1,338 (d, *J* = 5, 1 H, HO–C(3)); 1,367 (*d* × *d*, *J* = 13,2 und 7, 1 H, H–C(2′)); 1,478 (triplettartig, *J* ≈ 12, 1 H, H(β)–C(2)); 1,625 (br. s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5′)); 1,736 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5)); 1,771 (*d* × *d* × *d*, *J* ≈ 12,5, 4 und 2, ca. 1 H, H(α)–C(2)); 1,901 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(9′)); ca. 1,965 (br. s, 9 H, H<sub>3</sub>C–C(9,13,13′)); 2,04 (br., *d* × *d*, *J* = 17 und 10, 1 H, H(β)–C(4)); ca. 2,38 (*m*, ca. 1 H, H(α)–C(4)); 2,41 (dublettartig, ca. 1 H, H(α)–C(6′)); ca. 4,00 (*m*, 1 H, H–C(3)); 4,35 (*m*, 1 H, H–C(3′)); 5,43 (*d* × *d*, *J* = 15,3 und 9,5, 1 H, H–C(7′)); 5,55 (br. s, 1 H, H–C(4′)); 6,11 (*d*, *J* ≈ 16, 1 H, H–C(7)); 6,13 (2*d*, *J* ≈ 16, H–C(8) und H–C(8′)); 6,14 und 6,16 (2*d*, H–C(10′) und H–C(10)); ca. 6,26 (*m*, 2 H, H–C(14,14′)); ca. 6,36 (2*d*, *J* ≈ 15, 2 H, H–C(12′) und H–C(12)); 6,61–6,64 (*m*, 4 H, H–C(11′), H–C(15,15′) und H–C(11)).

<sup>1</sup>H-NMR. von **3b** (270 MHz, ca. 80 µg in 0,2 ml): 0,854 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C(β)–C(1′)); 0,944 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C(α)–C(1′)); 1,074 (s, 6 H, 2 H<sub>3</sub>C–C(1)); 1,32 (*d*, *J* ≈ 7) und ca. 1,34 (HO–C(3′ bzw. 3)); 1,477 (*t*, *J* ≈ 12, H(β)–C(2)); 1,645 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5′)); 1,738 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5)); 1,907 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(9′)); 1,968 (s, 9 H, H<sub>3</sub>C–C(9,13,13′)); 2,05 (*d* × *d*, *J* ≈ 17 und 9,5, H(β)–C(4)); 2,16 (*d*, *J* ≈ 9,5, 1 H, H–C(6′)); 2,39 (*d* × *d*, *J* ≈ 17 und 6, 1 H, H(α)–C(4)); ca. 4,00 (*m*, 1 H, H–C(3)); 4,23 (*m*, 1 H, H–C(3′)); 5,49 (s, 1 H, H–C(4′)); 5,53 (*d* × *d*, *J* = 15,5 und 9,5, H–C(7′)); ca. 6,12 (s, H–C(7) und H–C(8)); 6,13 (*d*, 1 H, H–C(8′)); ca. 6,13 und ca. 6,16 (H–C(10′) und H–C(10)); 6,25 (*m*, 2 H, H–C(14,14′)); 6,35 und 6,36 (2*d*, *J* ≈ 15, H–C(12′) und H–C(12)); 6,61–6,15 (*m*, 4 H, H–C(11′), H–C(15,15′) und H–C(11)). – CD.-Spektrum von **3b**: vgl. [14].

<sup>1</sup>H-NMR. von **3c** (erhalten durch Isomerisierung von **3b** und anschliessender chromatographischer Abtrennung; 400 MHz, ca. 0,2 mg in 0,45 ml): 0,860 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C(β)–C(1′)); 0,951 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C(α)–C(1′)); 1,076 (s, 6 H, H<sub>3</sub>C–C(1)); 1,32 (*d*, *J* = 7, 1 H, HO–C(3′)); 1,343 (*d*, *J* = 5, 1 H, HO–C(3)); 1,40 (*d* × *d*, *J* = 13 und 9,5, 1 H, H(β)–C(2)); 1,48 (*t*, *J* ≈ 12, 1 H, H(β)–C(2)); 1,562 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5′)); 1,739 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5)); 1,77 (*d* × *d* × *d*, *J* ≈ 12,4 und 2, 1 H, H(α)–C(2)); 1,913 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(9′)); ≈ 1,966 (s, 6 H, H<sub>3</sub>C–C(9) und H<sub>3</sub>C–C(13)); 1,984 (s, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(13′)); 2,05 (*d* × *d*, *J* = 17 und 9,5, 1 H, H(β)–C(4)); 2,18 (*d*, *J* ≈ 9, 1 H, H–C(6′)); 2,39 (*d* × *d*, *J* ≈ 17 und 6, 1 H, H(α)–C(4)); ≈ 4,00 (*m*, 1 H, H–C(3)); ca. 4,24 (*m*, 1 H, H–C(3′)); 5,49 (s, 1 H, H–C(4′)); 5,56 (*d* × *d*, *J* = 15,5 und 9,5, 1 H, H–C(7′)); 6,10 (*d*, *J* ≈ 16, H–C(7)); ca. 6,11 (H–C(14′)); 6,14 (*d*, *J* ≈ 16, H–C(8)); 6,16 (*d*, *J* ≈ 11, H–C(10)); 6,18 (*d*, *J* ≈ 11, H–C(10′)); 6,24 (*d*, *J* ≈ 11,8, 1 H,

H–C(14)); 6,37 (*d*,  $J = 14,8$ , 1 H, H–C(12)); 6,56 ( $d \times d$ ,  $J \approx 14,5$  und  $\approx 11$ , H–C(15)); 6,61 ( $d \times d$ ,  $J \approx 15$  und  $\approx 11$ , H–C(11')); 6,64 ( $d \times d$ ,  $J \approx 15$  und 11, H–C(11)); 6,79 ( $d \times d$ ,  $J \approx 14,5$  und 11, 1 H, H–C(15')); 6,88 (*d*,  $J = 15$ , 1 H, H–C(12')). – *CD*.-Spektrum von **3c**: vgl. [14].

<sup>1</sup>H-NMR. von **3d** (erhalten durch Isomerisierung von **3b**; 400 MHz, *ca.* 0,2 mg in 0,5 ml): 0,854 (*s*, 3 H, H<sub>3</sub>C(β)–C(1')); 0,945 (*s*, 3 H, H<sub>3</sub>C(α)–C(1')); 1,081 (*s*, 6 H, 2 H<sub>3</sub>C–C(1)); 1,33 (*d*,  $J = 7$ , 1 H, HO–C(3')); 1,36 (*d*,  $J \approx 5$ , 1 H, HO–C(3)); 1,40 ( $d \times d$ ,  $J \approx 13$  und 10, 1 H, H(β)–C(2')); 1,49 (*t*,  $J \approx 12$ , 1 H, H(β)–C(2)); 1,645 (*s*, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5')); 1,745 (*s*, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(5)); 1,78 ( $d \times d \times d$ ,  $J \approx 12$ , 4 und 2, 1 H, H(α)–C(2)); 1,904 (*s*, 3 H, H<sub>3</sub>C–C(9')); 1,953, 1,974 und 1,993 (H<sub>3</sub>C–C(9), H<sub>3</sub>C–C(13) und H<sub>3</sub>C–C(13')); 2,05 (*br. d \times d*,  $J \approx 17$  und 9, H(β)–C(4)); 2,16 (*d*,  $J \approx 9,5$ , 1 H, H–C(6')); 2,40 (*br. d \times d*,  $J \approx 17$  und 5, 1 H, H(α)–C(4));  $\approx 4,01$  (*m*, 1 H, H–C(3)); 4,24 (*m*, 1 H, H–C(3')); 5,49 (*s*, 1 H, H–C(4)); 5,53 ( $d \times d$ ,  $J = 15,5$  und 9,5, 1 H, H–C(7')); *ca.* 6,11 (H–C(14)); *ca.* 6,13 (H–C(7) und H–C(8)); 6,13 (*d*,  $J \approx 15,5$ , 1 H, H–C(8')); 6,14 (*d*?, H–C(10')); 6,21 (*d*,  $J \approx 11$ , 1 H, H–C(10)); 6,24 (*d*,  $J \approx 11$ , H–C(14')); 6,35 (*d*,  $J \approx 14,7$ , 1 H, H–C(12')); 6,56 ( $d \times d$ ,  $J \approx 15$  und 11, H–C(15')); 6,64 ( $d \times d$ ,  $J \approx 15$  und 11, H–C(11')); *ca.* 6,68 (H–C(11)'); 6,80 ( $d \times d$ ,  $J \approx 14,5$  und 11, 1 H, H–C(15)); 6,89 (*d*,  $J \approx 14,5$ , 1 H, H–C(12)). – Das <sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum beweist das Vorliegen einer zweiten Komponente (*ca.* 25%), vermutlich die während der Messung durch Umlagerung entstandene *all-trans*-Verbindung. – *CD*.-Spektrum von **3d**: vgl. [14]. – Das 270 MHz-<sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum der nichtaufgelösten Fraktionen II und III (*ca.* 20 µg in 0,2 ml CDCl<sub>3</sub>) entspricht der additiven Überlagerung der beiden Einzelspektren von **3c** und **3d**.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. Schiedt, G. Englert, K. Noack, M. Vecchi & F.J. Leuenberger, Abstracts 6th International Symposium on Carotenoids, Liverpool, 1981.
- [2] E. Widmer, R. Zell, H. Grass & R. Marbet, *Helv. Chim. Acta*, **65**, 958 (1982).
- [3] H. Mayer, *Pure Appl. Chem.* **54** (1982) im Druck.
- [4] A. Bingham, D. W. Wilkie & H. S. Mosher, *Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 489 (1979).
- [5] A. Bingham, H. S. Mosher & A. G. Andrewes, *Chem. Commun.* **96** (1977).
- [6] H. Ronneberg, G. Borch, S. Liaaen-Jensen, H. Matsutaka & T. Matsuno, *Acta Chem. Scand.* **B32**, 621 (1978).
- [7] D. Siefertmann-Harms, S. Hertzberg, G. Borch & S. Liaaen-Jensen, *Photochemistry* **20**, 85 (1981).
- [8] A. G. Andrewes, S. Liaaen-Jensen & O. Weeks, *Acta Chem. Scand.* **B29**, 884 (1975).
- [9] A. G. Andrewes, G. Borch & S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand.* **B30**, 1703 (1976).
- [10] S. Hertzberg, G. Borch & S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand.* **B33**, 42 (1979).
- [11] E. G. Nice & M. J. O'Hara, *J. Chromat.* **166**, 263 (1978).
- [12] F. M. Rabel, E. T. Bulls, M. L. Hellmann & D. J. Popovich, *J. Liquid Chromat.* **1** (5), 631 (1978).
- [13] K. Schiedt & F. J. Leuenberger, unveröffentlicht.
- [14] K. Noack, *Pure Appl. Chem.* **54** (1982), im Druck.
- [15] R. Buchecker & C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **62**, 2817 (1979).
- [16] R. Buchecker, P. Hamm & C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **57**, 631 (1974).
- [17] M. Vecchi, G. Englert, R. Maurer & V. Meduna, *Helv. Chim. Acta* **64**, 2746 (1981).
- [18] G. Englert, *Pure Appl. Chem.* **54** (1982), im Druck.