

**Analyse der**  
**RS,*cis/trans*-Tocotrienole**

**Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin Astrid M. Drotleff  
geboren am 14. Oktober 1968 in Karlstadt am Main**

**1999**

**Referent: Prof. Dr. Waldemar Ternes**

**Korreferent: Prof. Dr. Gerold Wunsch**

**Tag der Promotion: 11. Februar 1999**

# Zusammenfassung

Vitamin E ist bekannt als eine Gruppe von acht biologisch aktiven Vitamere: die vier Tocopherole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -) und die vier strukturell eng verwandten Tocotrienole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -). Letztere unterscheiden sich von den Tocopherolen lediglich durch drei Doppelbindungen in der Phytylseitenkette.

Wegen der physiologisch hochinteressanten Einschätzung der Tocotrienole sind einige chemische Synthesen vorgeschlagen worden. Praktikable Wege führen jedoch häufig zu racemischen *cis/trans*-Tocotrienolen, so daß für jedes der vier Tocotrienole acht Isomere möglich werden (vier geometrische Isomere und vier R,S-Stereoisomere). In der Natur dagegen kommen Tocotrienole nur in der 2R,3'trans,7'trans-Konfiguration vor.

In der vorliegenden Arbeit werden mehrere HPLC-Methoden entwickelt, mit denen diese synthetisch hergestellten Tocotrienol-Isomere auf einem breiten Feld analytisch zugänglich werden. *Cis/trans*-Tocotrienol-Isomere können auf einer RP18-, einer Silberionen- oder Cyclodextrin-Phase separiert werden. Die Vorteile der ersten beiden stationären Phasen liegen darin, daß die *cis/trans*-Isomere nebeneinander vorliegender Tocotrienole weitgehend unterschieden werden können, während die Cyclodextrin-Phase eine Basislinientrennung in die jeweils vier Seitenketten-Isomere getrennt injizierter Tocotrienole erlaubt. Die Elutionsreihenfolge der *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere auf der Cyclodextrin-Phase wurde zudem spektroskopisch verifiziert.

Die vorgestellten HPLC-Methoden sind so leistungsfähig, daß (meist in Kombination mit einer weiteren präparativen HPLC-Methode) auch komplexe Matrices untersucht werden können. Am Modell Futter-Huhn-Ei wird die Bioverfügbarkeit eines synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomeregemischs nachgewiesen. Ebenso wird anhand menschlicher Zellkulturen gezeigt, daß Magen- und Leberzellen unterschiedlich zwischen einem Angebot aus synthetischen  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomeren diskriminieren. Darüber hinaus wird festgestellt, daß aus der natürlichen Molekülstruktur der Tocotrienole durch technologische und biologische Prozesse kein signifikanter Anteil von *cis/trans*-Isomeren generiert wird.

Durch eine chirale Cellulosecarbamat-Phase gelingt schließlich im Anschluß an die Isolierung der geometrischen Tocotrienol-Isomere die komplette HPLC-Trennung in die acht möglichen RS,*cis/trans*-Isomere, wie am Beispiel von  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether demonstriert wird. Aber auch ohne präparative Vortrennung durch eine Cyclodextrin-Phase können die Isomere der derivatisierten Tocotrienole mit dieser Methode weitgehend getrennt werden.

**Schlagwörter:** Tocotrienole • RS,*cis/trans*-Isomere • HPLC

# Abstract

Vitamin E consists of eight biologically active vitamers: a family of four tocopherols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -) and the four structurally related tocotrienols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -). The latter differ from the tocopherols only by having three double bonds in the phytyl side chain.

Because of the health benefits of the tocotrienols many stereoselective synthesis methods have been suggested but practicable ways often lead to racemic *cis/trans* isomers. Thus a total of eight isomers (four geometric isomers and four R,S stereoisomers) can be present for each tocotrienol. Contrary, naturally occurring tocotrienols exclusively possess the 2R,3'*trans*,7'*trans*-configuration.

In this work several HPLC-methods have been developed to analyse the synthetic tocotrienols in various fields of application. *Cis/trans* tocotrienols can be separated on a RP18, silver ion or cyclodextrin phase. The two former allow the distinction between *cis/trans* isomers of coexisting tocotrienols to a great extent. The cyclodextrin phase makes a baseline separation of the four side chain isomers of the separately injected tocotrienols possible. The elution order of *cis/trans*- $\alpha$ -tocotrienol was confirmed by spectroscopy.

The presented analytical HPLC-methods can be combined with preparative HPLC-steps and are suitable for the determination of complex matrices. Using the model "feed-hen-egg" the bioavailability of synthetic  $\alpha$ -tocotrienol isomers is demonstrated. Moreover, using human tissue cultures it is shown, that cells from the liver and the stomach discriminate differently between the isomers on exposure to synthetic  $\gamma$ -tocotrienol. Furthermore it is concluded that none of the investigated biological or technological processes remarkably influence the geometric structure of the three double bonds in the tocotrienol side chain.

Following the preparative isolation of the geometric isomers the complete HPLC-separation of the eight existing RS,*cis/trans* isomers succeeds, as demonstrated in the case of  $\alpha$ -tocotrienol-methylether. Omitting the preparative step on a cyclodextrin phase the isomers of the tocotrienol derivatives also can be separated to a great extent.

**Key words:** tocotrienols • RS,*cis/trans* isomers • HPLC

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Struktur und physikalische Eigenschaften des Vitamin E</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Vorkommen von Tocotrienolen</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Synthese von Tocotrienolen</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Abriß der Vitamin-E-Analytik</b>	<b>10</b>
1.4.1 Extraktion	10
1.4.2 Biologische Methoden	10
1.4.3 Chemische Methoden	10
1.4.4 Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie	11
1.4.5 Molekulardestillation	11
1.4.6 Gaschromatographie	11
1.4.7 HPLC	12
1.4.8 Chirale Trennung von Vitamin-E-Homologen	13
<b>1.5 Mechanismus der Silberionen-Chromatographie</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Mechanismus der HPLC-Trennung an Cyclodextrin-Phasen</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Mechanismus der HPLC-Trennung an Cellulosecarbammat-Phasen</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Gesundheitliche Aspekte der Tocotrienole</b>	<b>17</b>
1.8.1 Bioverfügbarkeit	17
1.8.2 Vitamin-E-Aktivität	18
1.8.3 Gesundheitliche Wirkung	19
<b>1.9 Absorption und Transport von Vitamin E im Organismus</b>	<b>20</b>
1.9.1 Absorption im Dünndarm und Sekretion in Chylomikronen	20
1.9.2 Sekretion und Katabolismus der VLDL	21
1.9.3 Tocopherol-Bindeprotein (TBP)	21
<b>2 ÜBERSICHT ZUR DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Vorüberlegungen</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Allgemeine Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Vorgehen zum Erreichen der Zielvorgaben</b>	<b>26</b>
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>29</b>
<b>3.1 HPLC-Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen</b>	<b>29</b>
3.1.1 Zielsetzung	29
3.1.2 Analytische Trennung auf einer Diol-Phase	29
3.1.3 Semipräparative Trennung auf einer Diol-Phase	30
<b>3.2 HPLC-Trennung von cis/trans-Tocotrienolen</b>	<b>32</b>
3.2.1 Zielsetzung	32
3.2.2 Analytische Trennung mit einer RP18-Phase (Multimethode)	32
3.2.2.1 Vorüberlegung	32
3.2.2.2 Trennerfolg	32

3.2.3 Analytische Trennung mit einer RP18-Phase (Schwerpunkt <i>cis/trans</i> -Isomere)	34
3.2.4 Präparative Trennung mit einer RP18-Phase	35
3.2.5 Analytische Trennung mit einer Silberionen-Phase	35
3.2.5.1 Vorüberlegung	35
3.2.5.2 Trennerfolg	36
3.2.5.3 Einfluß des Acetonitril-Anteils im Eluenten auf den Trennerfolg	37
3.2.6 HPLC-Trennung mit einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase	37
3.2.6.1 Vorüberlegung	37
3.2.6.2 Trennerfolg	38
3.2.6.3 Einfluß verschiedener Parameter auf die Trennung der <i>cis/trans</i> -Isomere	41
3.2.7 Präparative Trennung mit einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase	42
<b>3.3 Spektroskopische Charakterisierung der <i>cis/trans</i>-Tocotrienole</b>	<b>43</b>
3.3.1 Zielsetzung	43
3.3.2 Massenspektrometrie	43
3.3.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektren	44
3.3.4 FTIR	47
3.3.5 Bedeutung der Ergebnisse	48
<b>3.4 Bioverfügbarkeit von <i>cis/trans</i>-<math>\alpha</math>-Tocotrienol-Isomeren im Modell „Futter-Huhn-Ei“</b>	<b>48</b>
3.4.1 Zielsetzung	48
3.4.2 Erfolg	48
3.4.3 Bedeutung der Ergebnisse	51
<b>3.5 Synthetisches <math>\gamma</math>-Tocotrienol und humane Zellkulturen</b>	<b>51</b>
3.5.1 Zielsetzung	51
3.5.2 Erfolg	51
3.5.3 Bedeutung der Ergebnisse	57
<b>3.6 Beeinflussung von <math>\gamma</math>-Tocotrienol durch katalytischen Fetthärtungsprozeß</b>	<b>58</b>
3.6.1 Zielsetzung	58
3.6.2 Erfolg	58
3.6.3 Bedeutung der Ergebnisse	58
<b>3.7 Beeinflussung von <math>\alpha</math>-Tocotrienol durch Biohydrierung im Pansen</b>	<b>60</b>
3.7.1 Zielsetzung	60
3.7.2 Erfolg	60
3.7.3 Bedeutung der Ergebnisse	63
<b>3.8 HPLC-Trennung der RS,<i>cis/trans</i>-Tocotrienole</b>	<b>64</b>
3.8.1 Zielsetzung	64
3.8.2 Trennerfolg	64
3.8.2.1 Chromatogramme der RS, <i>cis/trans</i> - $\alpha$ -Tocotrienole	64
3.8.2.2 Chromatogramme von RS, $\beta$ -, $\gamma$ - und $\delta$ -Tocotrienol-Methylether sowie $\alpha$ -Tocopherol-Methylether <sup>67</sup>	64
3.8.3 Untersuchung von Tocotrienolen und $\alpha$ -Tocopherol aus natürlichen Quellen	69
3.8.3.1 $\alpha$ -Tocotrienol aus Palmöl	69
3.8.3.2 $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafmilchfett	70
3.8.3.3 $\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl	71
3.8.3.4 $\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl	72
3.8.3.5 $\alpha$ -Tocopherol aus Palmöl	73
3.8.4 Einfluß der Derivatisierung auf die Enantiomertrennung	74
3.8.5 Einfluß des 2-Propanol-Anteiles im Eluenten	75
3.8.6 Prozentuale Verteilung der Enantiomere	76
3.8.7 Abschätzung der Nachweisgrenze für RS, <i>cis/trans</i> - $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether	76
3.8.8 Bedeutung der Ergebnisse	77
<b>4 EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>78</b>
<b>4.1 HPLC-Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen</b>	<b>79</b>

4.1.1 Analytische Trennung auf der Diol-Phase	79
4.1.1.1 Chemikalien	79
4.1.1.2 Chromatographische Bedingungen	79
4.1.1.3 Kalibriergeraden der Tocopherole und Tocotrienole	79
4.1.1.4 Formeln zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des internen Standards Tocol	82
4.1.2 Semipräparative Trennung mit der Diol-Phase	83
4.1.2.1 Chemikalien	83
4.1.2.2 Chromatographische Bedingungen	83
<b>4.2 HPLC-Trennung der cis/trans-Tocotrienole</b>	<b>84</b>
4.2.1 Analytische Trennung mit der RP18-Phase (Multimethode)	84
4.2.1.1 Chemikalien	84
4.2.1.2 Chromatographische Bedingungen	84
4.2.2 Analytische Trennung mit der RP18-Phase (Schwerpunkt <i>cis/trans</i> -Isomere)	84
4.2.2.1 Chemikalien	84
4.2.2.2 Chromatographische Bedingungen	85
4.2.2.3 Probenaufarbeitung	85
4.2.3 Präparative Trennung mit der RP18-Phase	86
4.2.3.1 Chemikalien	86
4.2.3.2 Chromatographische Bedingungen	86
4.2.4 Analytische Trennung mit der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase	86
4.2.4.1 Chemikalien	86
4.2.4.2 Chromatographische Bedingungen	86
4.2.4.3 Fluoreszenz-Detektion	87
4.2.4.4 Amperometrische Detektion	87
4.2.4.5 Ermittlung des geeigneten Potentials für die elektrochemische Detektion	87
4.2.4.6 Kalibriergeraden für $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere und Abschätzung ihrer Nachweisgrenze	88
4.2.5 Präparative Trennung mit der $\beta$ -Cyclodextrin-Phase	89
4.2.5.1 Chemikalien	89
4.2.5.2 Chromatographische Bedingungen	89
4.2.6 HPLC-Trennung mit der Silberionen-Phase	89
4.2.6.1 Chemikalien	89
4.2.6.2 Chromatographische Bedingungen	89
<b>4.3 Spektroskopische Charakterisierung der cis/trans-Tocotrienole</b>	<b>90</b>
4.3.1 Massenspektrometrie	90
4.3.1.1 Meßlösung	90
4.3.1.2 Geräteparameter	90
4.3.2 $^1\text{H-NMR}$	91
4.3.2.1 Meßlösung	91
4.3.2.2 Geräteparameter	91
4.3.3 FTIR	91
4.3.3.1 Meßlösung	91
4.3.3.2 Geräteparameter	91
<b>4.4 cis/trans-Tocotrienol-Isomere in komplexen Matrices – Anwendung der <math>\beta</math>-PM Cyclodextrin HPLC-Methode</b>	<b>91</b>
4.4.1 Material und Chemikalien	91
4.4.2 Bioverfügbarkeit von synthetischem $\alpha$ -Tocotrienol im Modell „Futter–Huhn–Ei“	93
4.4.2.1 Fütterung der Hühner	93
4.4.2.2 Verseifung des Eigelbs und Extraktion der unverseifbaren Lipide	93
4.4.2.3 Chromatographische Trennung der cis/trans-Isomere von $\alpha$ -Tocotrienol	94
4.4.3 Synthetisches $\gamma$ -Tocotrienol und humane Zellkulturen	94
4.4.3.1 Ansetzen der Zellkulturen	94
4.4.3.2 Aufarbeitung der Zellen und Mediumüberstände	97
4.4.3.2.1 Vorgehen für die abgestorbenen Zellkulturen	98
4.4.3.2.2 Vorgehen für die lebenden Zellkulturen	98
4.4.3.2.3 Extraktion der isolierten Mediumüberstände	98
4.4.3.2.4 Extraktion der isolierten Mediumüberstände	99

4.4.3.3 Chromatographische Trennung der cis/trans-Isomere von $\gamma$ -Tocotrienol und Auswertung der Chromatogramme	100
4.4.4 Beeinflussung von $\gamma$ -Tocotrienol durch katalytischen Fetthärtungsprozess	101
4.4.4.1 Palmöl	101
4.4.4.2 Verseifung des Palmöls und Extraktion der unverseifbaren Lipide	101
4.4.4.3 Chromatographische Trennung der cis/trans-Isomere von $\gamma$ -Tocotrienol	101
4.4.5 Beeinflussung von $\alpha$ -Tocotrienol durch Biohydrierung im Pansen	102
4.4.5.1 Schafsmilch	102
4.4.5.2 Bestimmung des $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalts in Schafsmilch	102
4.4.5.3 Verseifung des Schafsmilchfetts und Extraktion der unverseifbaren Lipide	103
4.4.5.4 Chromatographische Trennung der cis/trans-Isomere von $\alpha$ -Tocotrienol	103
<b>4.5 HPLC-Trennung der RS,cis/trans-Tocotrienole</b>	<b>104</b>
4.5.1 Chemikalien	104
4.5.1.1 Derivatisierung zum Methylether	104
4.5.1.2 Chromatographie	104
4.5.2 Gewinnung von cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomeren zur Derivatisierung	104
4.5.3 Gewinnung von $\alpha$ -Tocopherol, sowie $\alpha$ -, $\gamma$ - und $\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl zur Derivatisierung	105
4.5.4 Gewinnung von $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett zur Derivatisierung	106
4.5.5 Derivatisierung zum Methylether	106
4.5.5.1 Methode I, modifiziert nach [ris 94]	106
4.5.5.2 Methode II (doppelter Ansatz wie Methode I)	106
4.5.6 Vollständigkeit der Veretherung	106
4.5.7 Eignung der $\beta$ -PM Cyclodextrin-Phase für die Enantiomerentrennung	108
4.5.8 Herstellung der Probelösungen	108
4.5.9 Herstellung der Probelösungen für die Koinjektion	109
4.5.9.1 $\alpha$ -Tocotrienol aus Palmöl	109
4.5.9.2 $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett	109
4.5.9.3 $\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl	109
4.5.9.4 $\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl	109
4.5.9.5 $\alpha$ -Tocopherol aus Palmöl	109
4.5.10 Chromatographische Bedingungen	109
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>110</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>122</b>
7.1 Verzeichnis der Abkürzungen	122
7.2 Verzeichnis der Hersteller	122
7.3 Verzeichnis der Abbildungen	113
7.4 Verzeichnis der Tabellen	127



# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur und physikalische Eigenschaften des Vitamin E

Als Evans und Bishop [eva 22] an der University of California in Berkeley 1922 den Einfluß der Nahrung auf die Fertilität von Ratten untersuchten, entdeckten sie das Vitamin E (damals  $\alpha$ -Tocopherol) als essentiellen Faktor für die Reproduktion. Die Bezeichnung Tocopherol hat deshalb ihren Ursprung von „tocos“ (Geburt) und „phorein“ (hervorbringen); die Endung „-ol“ wurde zur Kenntlichmachung der phenolischen Struktur angefügt. Heute wird der Name Vitamin E als allgemeine Bezeichnung für alle Tocol- und Tocotrienolderivate benutzt, die qualitativ die biologische Aktivität von  $\alpha$ -Tocopherol aufweisen (siehe 1.8). Tocopherole und Tocotrienole bestehen aus einem Chromanolring mit einer Phytyl-Seitenkette (siehe Abbildung 1-1 und Abbildung 1-2). Die vier Tocopherole verfügen über eine gesättigte Seitenkette und unterscheiden sich nach Anzahl und Stellung ihrer Methylsubstituenten am Phenolring in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherole. Die vier Tocotrienole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol) unterscheiden sich von den Tocopherolen durch drei isolierte Doppelbindungen in der Phytyl-Seitenkette. Während die Tocopherole nur als freie Phenole vorkommen, können die Tocotrienole in der Natur auch verestert vorliegen [kam 96].

Die genauen Bezeichnungen der Tocopherole und verwandter Verbindungen wurde von der International Union of Nutritional Sciences (IUNS) [iun 78] und der International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry commission (IUPAC-IUB) [iup 82] standardisiert (siehe Tabelle 1-1 und Tabelle 1-2). Die acht Vertreter des Vitamin E nennt man auch Vitamere oder Vitamin-E-Homologe.

Das Tocopherolmolekül weist drei chirale Zentren ( $2'$ ,  $4'$  und  $8'$ ) in der Seitenkette auf, so daß acht ( $2^3$ ) stereoisomere Formen möglich sind. Alle natürlich vorkommenden Tocopherole haben die gleiche Konfiguration: RRR. Synthetisches  $\alpha$ -Tocopherol, das nicht durch stereoselektive Synthese hergestellt worden ist, liegt als Mischung von vier Enantiomerenpaaren vor, d. h. als acht Diastereoisomere vor und erhält die Bezeichnung *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol (früher *dl*- $\alpha$ -Tocopherol) [coh 81]. Die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Tocopherol Stereoisomeren ist im Hinblick auf die biologische Aktivität sehr wichtig, da die verschiedenen  $\alpha$ -Tocopherol Stereoisomere auch eine unterschiedliche Biopotenz *in vivo* aufweisen [wei 96, kiy 95, ued 93, pii 91, ing 87].

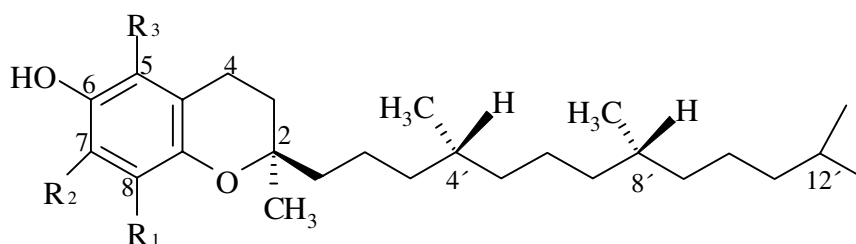


Abbildung 1-1 Strukturformel von 2R,4'R,8'R (RRR)-Tocopherol bzw. Tocol

Tabelle -1-1 Struktur und chemische Bezeichnung der Tocopherole

E Vitamer nach IUPAC	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Alternative IUPAC-Bezeichnung	Chemical Abstract Bezeichnungen
α-Tocopherol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	5,7,8-Trimethyltocol	3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol
β-Tocopherol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	5,8-Dimethyltocol	3,4-Dihydro-2,5,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,5,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol
γ-Tocopherol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	7,8-Dimethyltocol	3,4-Dihydro-2,7,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,7,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol
δ-Tocopherol	CH <sub>3</sub>	H	H	8-Monomethyltocol	3,4-Dihydro-2,8-dimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,8-dimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol
Tocol	H	H	H		3,4-Dihydro-2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol

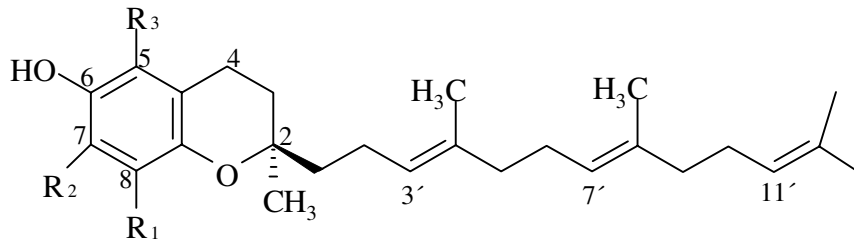


Abbildung 1-2 Strukturformel von 2R,3'trans,7'trans (R,trans-trans)-Tocotrienol

Tabelle 1-2 Struktur und chemische Bezeichnung der Tocotrienole

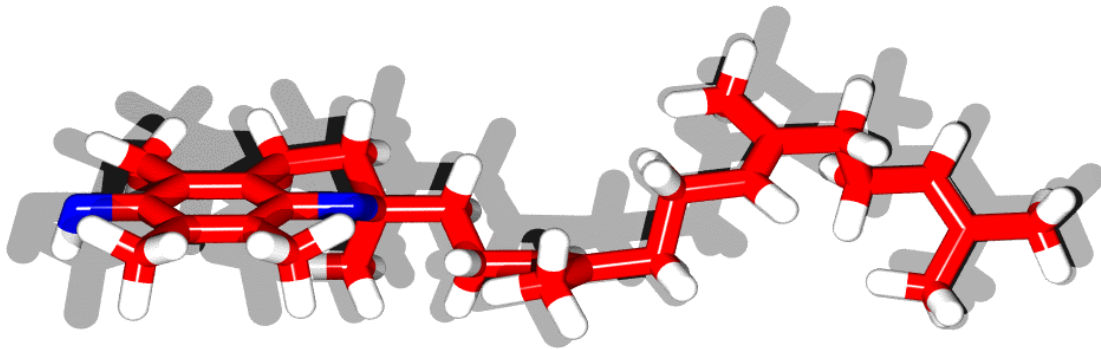
E Vitamer nach IUPAC	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Alternative IUPAC-Bezeichnung	Chemical Abstract Bezeichnungen
α-Tocotrienol (früher: ε-Tocopherol) <sup>a</sup>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	5,7,8-Trimethyltocotrienol	3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-6-chromanol
β-Tocotrienol (früher: ζ <sub>1</sub> -, ζ <sub>2</sub> -Tocopherol, Toco-chromanol-3) <sup>a</sup>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	5,8-Dimethyltocotrienol	3,4-Dihydro-2,5,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,5,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-6-chromanol
γ-Tocotrienol (früher: η-Tocopherol, Plastochromanol-3)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	7,8-Dimethyltocotrienol	3,4-Dihydro-2,7,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,7,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-6-chromanol
δ-Tocotrienol	CH <sub>3</sub>	H	H	8-Monomethyltocotrienol	3,4-Dihydro-2,8-dimethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,8-dimethyl-2-(4',8',12'-trimethyl-3',7',11'-tridecatrienyl)-6-chromanol

<sup>a</sup>widersprüchlich zu [sch 63]

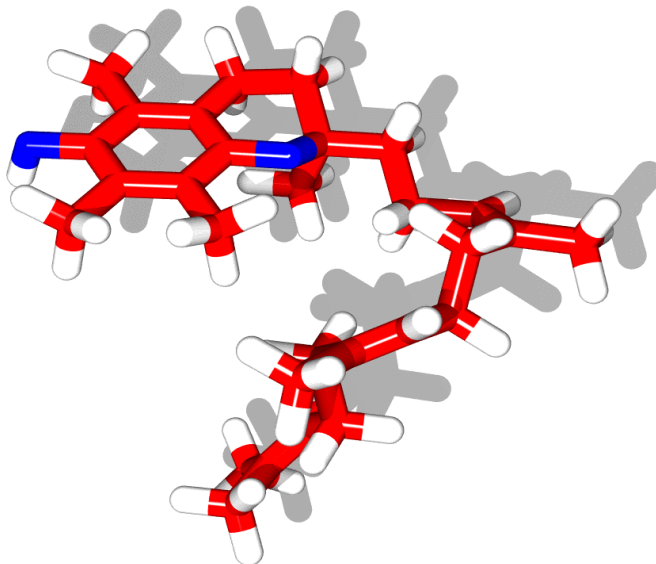
Die Tocotrienole besitzen lediglich *ein* chirales Zentrum an C2, so daß sie nur 2R und 2S Stereoisomere hervorbringen. Durch die Doppelbindungen an der Position 3' und 7' in der Phytyl-Seitenkette sind jedoch vier geometrische *cis/trans*-Isomere möglich. Für jedes Tocotrienol können deshalb acht Isomere erscheinen: 2R,3'*cis*,7'*cis* (R,*cis-cis*); 2R,3'*cis*,7'*trans* (R,*trans-trans*); 2R,3'*trans*,7'*cis* (R,*trans-cis*); 2R,3'*trans*,7'*trans* (R,*trans-trans*); 2S,3'*cis*,7'*cis* (S,*cis-cis*); 2S,3'*cis*,7'*trans* (S,*trans-trans*); 2S,3'*trans*,7'*cis* (S,*trans-cis*); 2S,3'*trans*,7'*trans* (S,*trans-trans*) [kam 96]. Die Schreibweise der Tocotrienol-Seitenkettenisomere wird in den IUNS- und IUPAC-Empfehlungen [iun 78, iup 83] nicht behandelt, weshalb, wie oben aufgeführt, die von Kamal-Eldin und Appelqvist [kam 96] verwendete übernommen wird. Die Reihenfolge, in der bei der Kurzschreibweise mit Bindestrich die geometrische Konfiguration aufgeführt wird, bezeichnet dabei die Konfiguration an der Position 3' und dann an 7'. Die Schreibweise *cis/trans*-(mit Schrägstrich) wird im folgenden als Bezeichnung für Tocotrienol-Seitenkettenisomere verwendet, ohne daß die Konfiguration der Doppelbindung an der Position 3' und 7' damit als festgelegt gilt.

In der Natur kommen die Tocotrienole nur in der 2R, 3'*trans*,7'*trans*-Konfiguration vor [kas 80]. Die Konfiguration der Doppelbindung wurde durch einen Vergleich der natürlichen Tocotrienole mit den entsprechenden synthetischen Verbindungen bekannter Stereochemie aufgeklärt [sch 63, may 67]. So konnten die synthetischen racemischen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocotrienole im UV-, IR-, NMR- und Massenspektrum, sowie im Dünnschicht- bzw. Papier- und Gaschromatogramm nicht von den entsprechenden aus natürlichen Quellen isolierten Verbindungen unterschieden werden. Die absolute Konfiguration an C2 wurde durch eine mehrstufige chemische Reaktion zu einem Kaliumhexacyanoferrat(III)-Oxidationsprodukt und der Messung dessen spezifischer Drehung bestimmt [may 67].

Abbildung 1-3 und Abbildung 1-4 demonstrieren die unterschiedliche geometrische Struktur von zwei  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomeren.



*Abbildung 1-3 Dreidimensionale Darstellung von R,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol mit weitgehend gestreckter Seitenkette.*



*Abbildung 1-4 Dreidimensionale Darstellung von R,cis-cis- $\alpha$ -Tocotrienol; die cis-Konfiguration der Seitenkette bewirkt eine geknickte räumliche Struktur des Moleküls.*

In den nachfolgenden Tabellen sind einige physikalische Eigenschaften der Tocopherole und Tocotrienole zusammengestellt:

Tabelle 1-3 Physikalische Eigenschaften der Tocopherole und Tocotrienole

E Vitamer	Äquivalent- masse [g/mol]	UV-Maximum in 96% Ethanol	spezifischer Ex- tinktionskoeff. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ in 96% Ethanol	Optische Drehung
$\alpha$ -Tocopherol	430,71	292 nm	71,0	$[\alpha]_{5461}^{25}$ $-3,0^\circ$ (Benzol) $[\alpha]_{5461}^{25}$ $+0,32^\circ$ (Alk.)
$\beta$ -Tocopherol	416,69	296 nm	86,4	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $+6,37^\circ$
$\gamma$ -Tocopherol	416,69	298 nm	92,8	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $-2,4^\circ$ (Alk.)
$\delta$ -Tocopherol	402,66	298 nm	91,2	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $+3,4^\circ$ (c = 15,5; Alk.) $[\alpha]_{546}^{25}$ $+1,1^\circ$ (c = 10,9; Benzol)
$\alpha$ -Tocotrienol	424,67	292,5 nm	91,0	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $-2,9^\circ$ (c = 1,0; CHCl <sub>3</sub> )
$\beta$ -Tocotrienol	410,64	294 nm	87,3	
$\gamma$ -Tocotrienol	410,64	296 nm	90,5	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $-5,2^\circ$ (c = 1,0; CHCl <sub>3</sub> )
$\delta$ -Tocotrienol	396,61	297 nm	98,1	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $-2,2^\circ$ (c = 1,0; CHCl <sub>3</sub> )
Tocol	388,63	299 nm	96,7	

[seb 72, kon 96, mer 96]

Tabelle 1-4 Fluoreszenz-Maxima der Tocopherole und Tocotrienole<sup>a</sup>

E Vitamer	Anregungsmaxima (Emmissionswellenlänge = 330 nm)	Emmissionsmaxima (Anregungswellenlänge = 295 nm)
$\alpha$ -Tocopherol	296 - 297	328 - 330
$\beta$ -Tocopherol	298 - 299	330 - 331
$\gamma$ -Tocopherol	299 - 300	328 - 330
$\delta$ -Tocopherol	300 - 301	330 - 331
$\alpha$ -Tocotrienol	298 - 299	329 - 330
$\beta$ -Tocotrienol	298 - 300	331
$\gamma$ -Tocotrienol	298 - 301	330 - 331
$\delta$ -Tocotrienol	300 - 302	330

<sup>a</sup> Lösungsmittel: 2 % 1,4-Dioxan in n-Hexan; Scan nach „stop flow“; Detektor: Spectrofluorometer SFM 23 B (Kontron)  
[coo 84]

## 1.2 Vorkommen von Tocotrienolen

Tocotrienole sind in der Pflanzenwelt nicht so weit verbreitet wie die Tocopherole. Besonders reichhaltige Quellen für Tocotrienole sind die ölhaltigen Anteile von Cerealien wie Weizen, Gerste, Roggen und Reis sowie pflanzliche Öle wie Palmöl und Reiskeimöl. Die nachfolgende Tabelle 1-5 gibt einen Überblick über den Gehalt von Tocopherolen und Tocotrienolen in Pflanzenölen.

Tabelle 1-5 Tocopherole (T) und Tocotrienole (T<sub>3</sub>) in Pflanzenölen [mg/kg]

Pflanzenöl	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T <sub>3</sub>	$\beta$ -T <sub>3</sub>	$\gamma$ -T <sub>3</sub>	$\delta$ -T <sub>3</sub>	Lit.
Baumwollsaatöl	573	40	317	10	–		–	–	ong 93
Gerstenöl	3	0,5	0,5	0,4	12	3	1,6		rao 72
Haferöl	3	1			10	3			rao 72
Kakaobutter	11	–	170	17	2		–	–	ong 93
Kokosnußöl <sup>a</sup>	– 4	–	– 4,5	3	20 3		– 15	–	ong 93 rao 72
Leinöl	–	–	–	–	–		–	–	ong 93
Maiskeimöl <sup>a</sup>	134	18	412	39	–		–	–	ong 93
Olivenöl	93	–	7	–	–		–	–	ong 93
Palmöl	150	–	–	–	117		297	80	ong 93
Palmöl <sup>a</sup>	133	–	–	–	130		204	45	ong 93
Öl aus dem Palmfruchtpreßkuchen	1662	–	–	–	456		485	142	ong 93
Rapsöl	70	16	178	7	–		–	–	ong 93
Reiskeimöl	324	18	53	–	236		349	–	ong 93
Reiskeimöl <sup>a</sup>	249	15	47	–	167		141	–	ong 93
Safloröl	477	–	44	10	–		–	–	ong 93
Senföl	75	–	494	31	–		–	–	ong 93
Sesamöl <sup>a</sup>	12	6	244	32	–		–	–	ong 93
Sojabohnenöl	116	34	737	275	–		–	–	ong 93
Sonnenblumenöl	608	17	11	–	–		–	–	ong 93
Weizenkeimöl	1179 1100	398 808	493	118	Spuren 85		–	–	ong 93 rao 72

<sup>a</sup>raffiniert „–“ = nicht nachweisbar leere Kästchen = keine Angaben vom Autor

Auch im Milchsaft des Gummibaums (*Hevea brasiliensis*), aus dem Kautschuk hergestellt wird, wurden beträchtliche Mengen von freiem und verestertem  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol in einer Konzentration von 0,82 % der Lipidfraktion gefunden [ong 93].

Wegen des besonders hohen Tocotrienol-Gehaltes von Palmöl wurden Verfahren entwickelt, die es ermöglichen aus Nebenprodukten der Ölraffination Vitamin E zu extrahieren. Das Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM) hat zu diesem Zweck eine Methode vorgestellt, wie aus dem Dämpfungs- (Desodorierungs-)destillat ein Konzentrat mit einem Vitamin-E-Gehalt von mehr als 95 % hergestellt werden kann, wobei der Tocotrienol-Anteil am Gesamt-Vitamin-E größer als 70 % ist [sun 92]. Die Prozeßführung ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

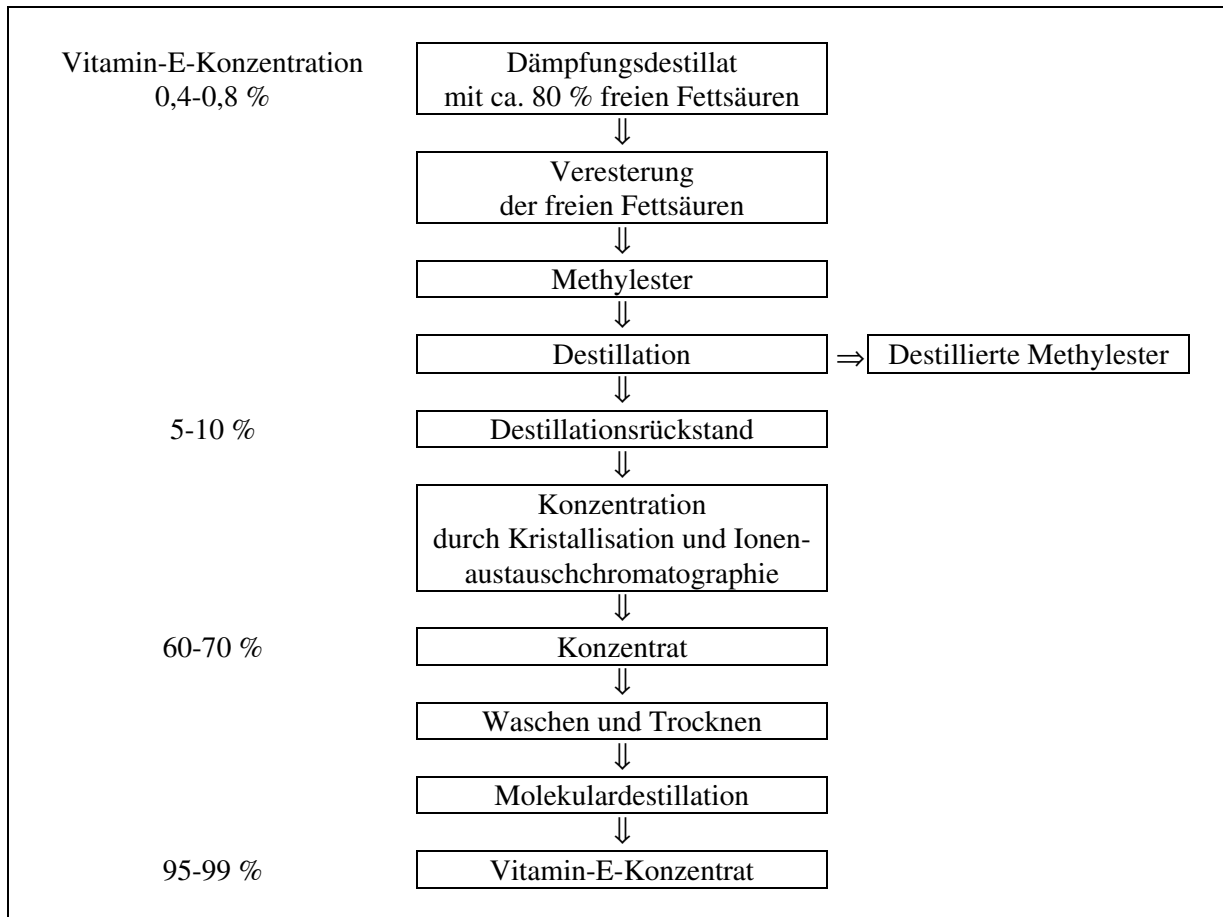


Abbildung 1-5 Prozeßführung zur Extraktion von Vitamin E aus dem Dämpfungsdestillat der Palmölraffination nach [sun 92].

### 1.3 Synthese von Tocotrienolen

Stereoselektive Synthesen zur Herstellung von naturidentischen Tocotrienolen sind, wie unten ausgeführt, seit einiger Zeit bekannt. Um jedoch Tocotrienol-Präparate wirtschaftlich herstellen zu können, müssen Kompromisse in der geometrischen Struktur und Stereoisomerie der Produkte eingegangen werden. Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß die als synthetischen Referenzsubstanzen verwendeten Tocotrienole jeweils ein Gemisch aller acht möglichen Isomere darstellen, so daß wahrscheinlich keine der unten genannten Synthesemethoden angewendet wurde. Selbst für das in großem Umfang hergestellte  $\alpha$ -Tocopherol ist noch keine wirtschaftliche Totalsynthese zum RRR-Isomer realisiert worden [net 96].



Bereits 1967 waren Synthesen für racemisches *trans-trans*- $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol entwickelt worden, die bei der Aufklärung der Konfiguration natürlicher Tocotrienole von entscheidender Bedeutung waren [sch 63, may 67]. Ausgehend von einem entsprechenden Methylhydrochinon<sup>1</sup> und synthetischem RS,*all-trans*-Geranylinalool kann durch Kondensation in Gegenwart von BF<sub>3</sub>-Etherat in Dioxan bei Raumtemperatur glatt das Methyl-5-geranyl-hydrochinon hergestellt werden, das sofort mit Ag<sub>2</sub>O in etherischer Lösung zu dem entsprechenden Chinon oxidiert wird. Die Cyclisierung dieses Produkt zum jeweiligen Tocotrienol gelingt durch 24stündiges Kochen in Pyridin. Die anschließende Reduktion der bei diesem Schritt entstehenden 3,4-Doppelbindung mit Natrium in siedendem Alkohol ergibt reines *trans-trans*-Tocotrienol.

Scott et al. [sco 76] schlugen eine insgesamt 20stufige Synthese für R,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol vor. Demnach wird aus Trimethylhydrochinon und Methylvinylketon in saurem Methanol *rac*-2-Methoxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-ol. Dieses Acetal wird in vier Schritten zur *rac*-(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)essigsäure (1), welche mit  $\alpha$ -Methyl-benzylamin in eine Säure (2) mit S-Konfiguration überführt wird. Das unerwünschte 2R-Enantiomer wird durch Säurebehandlung wieder zu (1) regeneriert. Eine mehrstufige Reaktion ausgehend von (2) unter Beteiligung von zwei hochstereoselektiven *Claisen*-Kondensationen ergibt reines R,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol.

Eine einfachere Synthese zum RS,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol wurde schließlich 1983 beschrieben [ura 83]. So wird die Tocotrienol-Seitenkette durch eine Kopplung des Schlüsselzwischenprodukts 6-Methoxymethoxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-(5-mercaptothiazolanyl-4-methyl-3-penten-1-yl)chroman mit Geranyl bromid aufgebaut. Nach der Desulfurisierung des Reaktionsproduktes und anschließender Hydrolyse entsteht  $\alpha$ -Tocotrienol mit *trans-trans*-konfigurierter Seitenkette.

Auch später wurden Synthesen für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol veröffentlicht [pea 92, pea 94], die mit über 95%iger Reinheit zum RS,*trans-trans*-Tocotrienol führten. Ziel dieser Synthesen war aber vor allen Dingen die Herstellung verschiedenster Tocotrienol-Analoga, um den Mechanismus der Cholesterinbiosynthesehemmung (siehe 1.8.3) zu erforschen und gleichzeitig mögliche Medikamente zu entwickeln.

Schudel et al. [sch 72] geben darüber hinaus eine detaillierte Zusammenfassung über weitere Synthesemöglichkeiten für Tocopherole und Tocotrienole an und machen deutlich, daß die Totalsynthese der Tocotrienol-Seitenkette zu *cis/trans*-Isomeren führen kann.

---

<sup>1</sup> Trimethylhydrochinon für  $\alpha$ -Tocotrienol, 2,5-Dimethylhydrochinon für  $\beta$ -Tocotrienol und 2,3-Dimethylhydrochinon für  $\gamma$ -Tocotrienol

## **1.4 Abriß der Vitamin-E-Analytik**

Die Methoden zur Bestimmung von Vitamin E haben sich im Laufe der Jahre mehrmals grundlegend geändert. Die frühesten Methoden waren biologische Fertilitätstests. Chemische Verfahren wurden kurz darauf entwickelt, gefolgt von Papier- und Dünnschichtchromatographie. Moderne Methoden in der Vitamin-E-Analytik basieren entweder auf der Gaschromatographie oder der HPLC.

Sheppard et al. [she 93] haben 1993 eine Übersicht über die Methodik in der Vitamin-E-Analytik zusammengestellt. Auf ihre Angaben bezieht sich, wenn nicht anders angegeben, die nachfolgende Zusammenstellung.

### **1.4.1 Extraktion**

Die Extraktion ist allgemein ein kritischer Schritt in der Analytik. Sie soll quantitativ sein und den Analyten nicht zerstören. Das gilt besonders für Vitamin-E-Homologe, die licht- und oxidationsgeschützt behandelt werden müssen, um den tatsächlichen Vitamin-E-Gehalt nicht zu niedrig zu bestimmen. Als Extraktionsmittel werden Ether, Hexan, Aceton, Chloroform, Ethanol, Propanol und in manchen Fällen auch Mischungen dieser Lösungsmittel verwendet. Durch Schütteln, Erhitzen, Gefriertrocknen, Soxhlet-Apparaturen oder Verseifung kann, abhängig von der Matrix und der analytischen Intention, die Extraktion vervollständigt werden.

### **1.4.2 Biologische Methoden**

In den 1920er und frühen 1930er Jahren wurden an weiblichen Ratten Verfahren zur biologischen Bestimmung von Vitamin E entwickelt. Die Tests basieren darauf, daß abhängig vom Grad einer Vitamin-E-Unterversorgung sich entwickelnde Föten vom Uterus resorbiert werden. So wurde der Prozentsatz der Fertilität als Maß für den Vitamin-E-Gehalt der Nahrung bestimmt oder später auch der sogenannte Uterus Index. Dabei wurde unter standardisierten Bedingungen vor und nach dem Entfernen von lebenden und toten Föten und von Resorptionsstellen das Uterusgewicht verglichen. Im Zusammenhang mit diesen Resorptions-Gestationsparametern wurde die IU (International Unit, Internationale Einheit) als 1 mg synthetisches racemisches  $\alpha$ -Tocopherylacetat definiert. Dies ist die durchschnittliche Menge in einer Standard-Zubereitung, die oral verabreicht dazu führt, daß es bei Ratten zu keiner Fötus-Resorption während der Trächtigkeit kommt. Auch wird noch heute u. a. mit dieser Methode die Vitamin-E-Aktivität bestimmt, wobei die Aktivität der verschiedenen Vitamere als Prozentsatz der Aktivität von  $\alpha$ -Tocopherol (in Tocopheroläquivalenten) ausgedrückt wird.

### **1.4.3 Chemische Methoden**

Verschiedene chemische Methoden wurden bis Anfang der 1940er Jahre entwickelt. Zu nennen sind v. a. die colorimetrischen Methoden unter Verwendung von Goldchlorid, Salpetersäure, Cersulfat (cerimetrische Titration) und Eisenchlorid-Dipyridyl. In modifizierter Art und Weise werden sie auch heute noch für spezielle Applikationen verwendet. Die AOAC (Association of Official Analytical

Chemists) unterstützt beispielsweise das Eisenchlorid-Dipyridyl-Prinzip in ihrer offiziellen Methode zur Bestimmung von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocopherylacetat in Lebens- und Futtermitteln, zur Identifizierung von RRR- und *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol in Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln und zur Bestimmung von supplementiertem  $\alpha$ -Tocopherylacetat in Lebens- und Futtermitteln [aoa 90, aoa 90a, aoa 90b].

#### 1.4.4 Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie

Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie werden üblicherweise als präparative Methoden in Kombination mit einer chemischen Bestimmungsmethode eingesetzt. Diese präparativen Verfahren sind sehr vorteilhaft, um größere Anteile von Verunreinigungen, die bei der Vitamin-E-Bestimmung stören, zu entfernen. Der unverseifbare Extrakt einer Probe kann beispielsweise durch eine Säulenchromatographie von störenden reduzierenden Begleitbestandteilen wie Vitamin A, Carotinoiden und Sterolen, aufgereinigt werden, bevor die individuellen Tocopherole und Tocotrienole nach einer chemischen Methode bestimmt werden, die deren reduzierende Eigenschaft ausnutzt. Eine solche Aufreinigungsmethode wird aktuell noch in offiziellen Methoden der AOAC verwendet [aoa 90a, aoa 90b]. Die Papierchromatographie wurde dagegen vorrangig in den 1950er und 1960er Jahren praktiziert. Ein leistungsfähiges zweidimensionales System konnte zur Entdeckung der verschiedenen natürlich vorkommenden Tocopherole beitragen [gre 55, mar 59]. Wegen der kürzeren Entwicklungszeit, überlegenen Trennung der einzelnen Tocopherole, höheren Beladungskapazität und einer besseren quantitativen Elution der Komponenten vom Adsorbens hat sich dann die Dünnschicht- immer mehr gegen die Papierchromatographie durchgesetzt. Unter Anwendung der zweidimensionalen Technik ist es möglich, sowohl  $\beta$ - von  $\gamma$ -Tocopherol als auch die Tocopherole von ihren korrespondierenden Tocotrienolen abzutrennen [des 80, aoa 90].

#### 1.4.5 Molekulardestillation

Diese seit den frühen 1940ern angewendete Destillationstechnik ist geeignet, Vitamin E effektiv von den meisten anderen natürlichen Begleitsubstanzen wie Glyceriden, Chlorophyllen, Xanthophyllen, Carotinoiden, Chinonen, Ubichinonen, Ubichromanolen und den Sterinen abzutrennen. Mit der Molekulardestillation ist ein vergleichsweise großer apparativer Aufwand verbunden, aber das Produkt weist eine sehr hohe Qualität auf und kann für eine weitergehende Analytik verwendet werden. So wird die Molekulardestillation als letzter Anreicherungsschritt bei der oben erwähnten Herstellung von Vitamin-E-Konzentraten (>95 %) aus Fettsäuredestillaten genutzt [sun 92, ong 93] (siehe 1.2).

#### 1.4.6 Gaschromatographie

Die Trennung und Quantifizierung der Tocopherole und Tocotrienole in einem einzigen Gaschromatogramm war nur schwierig zu erreichen, und die Trennung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol hat

sich als Herausforderung dargestellt. Mit Silikon beschichtete gepackte Säulen wurden sehr häufig für die Bestimmung von  $\alpha$ -, ( $\beta$ - und  $\gamma$ -) und  $\delta$ -Tocopherol verwendet. Mit etwas längeren Säulen von geringerem inneren Durchmesser konnte eine Trennung von sieben Tocopherolen und Tocotrienolen verwirklicht werden. Durch die Umstellung auf die Kapillarsäulenteknologie konnten  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol aus Lebensmitteln als Trimethylsilyl-Derivat gleichzeitig neben wichtigen Sterinen (Campesterin, Stigmasterin und Sitosterin) in einem Lauf getrennt werden, während die Unterscheidung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol schwerfaßbar blieb. Die Trennung dieses problematischen Paares gelang immer noch am besten mit Hilfe einer „altmodischen“ gepackten Säule als p-Chinon-Derivat.

Schudel et al. [sch 63] benutzten die Gaschromatographie, um über einen einheitlichen Peak bei synthetisch hergestelltem *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol die beabsichtigte Konfiguration zu bestätigen, während synthetisch hergestelltes *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol im Gaschromatogramm eine Antrennung von vier Peaks zeigte. Es wurde eine 1 m lange Apiezon-N-Säule verwendet (stationäre Phase: 10 % Apiezon-N; Träger: Anachrom ABS [1,2-1,5 mm]; Gasfluß: 60 mL Argon/min; Temperatur: 245 °C). Die Elutionsreihenfolge der *cis/trans*-Isomere (RT = 61, 75 und 88 min) neben dem *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol (RT = 96 min) wurde postuliert, aber nicht durch spektroskopische Untersuchungen bestätigt.

Eine gaschromatographische Trennmethode diente 1967 auch dazu, die *trans-trans*-Konfiguration der  $\gamma$ -Tocotrienol-Seitenkette zu bestätigen [may 67]. Der Trimethylsilylether von natürlichem  $\gamma$ -Tocotrienol zeigte nur einen einzigen Peak (RT = 20 min), während bei dem Trimethylsilyl-Derivat von synthetischem *cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol eine Auftrennung in vier basisliniengetrennte Peaks (RT = 15, 16, 19 und 20 min), entsprechend den vier erwarteten geometrischen Isomeren, beobachtet werden konnte. Die chromatographischen Bedingungen wurden angegeben mit: Säule: Glas,  $\varnothing$  = 2 mm, Länge 2 m; stationäre Phase: 10 % Apiezon-N; Träger: Gaschrom Q (80-100 mesh); Temperatur: Einspritzblock 280 °C, Säule 260 °C; Gasfluß: 40 mL Helium/min; Verdünnungsmittel: Pyridin. Die Elutionsreihenfolge der Seitenkettenisomere wurde in Analogie zu der von Schudel et al. [sch 63] lediglich postulierten vorgeschlagen.

#### 1.4.7 HPLC

Anfang der 1970er Jahre wurde die HPLC für die Vitamin-E-Analytik entdeckt. Van Niekerk [nie 73] beschrieb 1973 als erster eine Normal-Phasen-Chromatographie (Säule: Corasil II, 150 mm  $\times$  2 mm ID) mit n-Hexan/Diisopropylether-Eluenten und Fluoreszenz-Detektion, die eine gute Trennung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol ermöglichte. Die vier Tocopherole und drei Tocotrienole ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) wurden von Thompson und Hatina [tho 79] erfolgreich getrennt. Auf einer LiChroSorb Si60-Säule (250 mm) mit 0,2 % 2-Propanol oder 5 % Diethylether in wasserhaltigem n-Hexan ergaben bei Fluoreszenz-

Detektion 4 mg Tocopherol ein meßbares Signal. Gertz [ger 83] erreichte eine vollständige Trennung der insgesamt acht Tocopherole und Tocotrienole auf einer LiChrosorb Si60-Phase (Partikelgröße 7  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4,6 mm ID) mit Isooctan/tert-Butylmethylether-Eluenten (98:2, v/v) und Fluoreszenz-Detektion. Coors [coo 84] berichtete auch über eine komplette Separierung durch eine Diol-Phase (LiChrosorb Si-Diol; Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$ ; Eluent: n-Hexan/Dioxan [96:4]) und eine Nitro-Phase (Nucleosil 5 NO<sub>2</sub>; Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$ ; Eluent: n-Hexan/Ethylacetat [94:6]), beide Methoden mit Fluoreszenz-Detektion. Auch an einer polaren Amino-Cyano-Phase (Partisil PXS 5/25 PAC) mit Hexan/THF (94:6) konnten die Tocochromanole sehr gut getrennt und fluorimetrisch bestimmt werden [ram 85].

Da die Normal-Phasen-HPLC die beste Trennung der Tocopherole und Tocotrienole ergibt, wurden die meisten Untersuchungen von Vitamin E in verschiedenen Matrices mit dieser Technik durchgeführt [com 88, run 89, tan 89, bal 92, bal 93, loz 93, abd 93, iva 95, pfa 95, pet 95, ter 95, mur 96, kon 96, kra 97]. In der Elutionsreihenfolge erscheint mit wenigen Ausnahmen [ger 83] bei Tocopherolen und Tocotrienolen zuerst das  $\alpha$ -Homologe, gefolgt vom  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Homologen. Dies trifft auch für die bisher einzige Publikation über Cyclodextrin-Phasen zu, die die komplette Trennung der vier Tocopherole und 5,7-Dimethyltolcol unter Normal-Phasen-Bedingungen beschreibt [abi 94].

Versuche, die Tocopherole oder deren Methylether-Derivate durch Umkehr-Phasen-HPLC zu trennen, führten unter allen angewendeten Bedingungen zu dem Ergebnis, daß die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Homologen von Tocopherolen und Tocotrienolen koeluierten [abi 94]. Soll Vitamin E amperometrisch bestimmt werden, müssen dagegen Bedingungen wie in der Umkehr-Phasen-HPLC gewählt werden [ued 87, sch 92, pod 96] und dieser Nachteil in Kauf genommen werden. Die weitgehende Trennung von Tocopherol-Homologen auf einer C<sub>30</sub>-Säule mit 100 % Methanol als Eluenten konnte jedoch kürzlich gezeigt werden [str 98]. Die Elutionsreihenfolge der Vitamere ist prinzipiell umgekehrt zu der mit Normal-Phasen-Bedingungen beobachteten [tan 89, rog 93, huo 96, lie 96, lan 97].

#### 1.4.8 Chirale Trennung von Vitamin-E-Homologen

Erste Erfolge in der Trennung von Tocopherol-Stereoisomeren wurde unter Verwendung von Gaschromatographie auf achiraler Phase [coh 81, slo 81, pii 91] oder anhand deuterierter Substanzen mit GC-MS auf ebenfalls achiraler Phase erzielt [ing 87, tra 88].

HPLC-Methoden wurden für Polymethacrylat-Phasen beschrieben und können *all-rac- $\alpha$* -Tocopherol underivatisiert nur in zwei [yam 84], als Acetat in vier [ued 93, kiy 95] und als Methoxymethyl- bzw. Trifluoracetat-Derivat in sieben Fraktionen trennen [vec 90]. Eine komplette Trennung aller acht  $\alpha$ -Tocopherol Stereoisomere gelingt bis jetzt nur in der Kombination von HPLC mit GC. Nach der Isolierung der beiden Gruppen von C2-Epimeren über HPLC werden die zwei Fraktionen in jeweils vier Peaks aufgespalten [vec 90]. Dem gleichen Prinzip folgend bestimmten Riss et al. [ris 94] und

Weiser et al. [wei 96] mit einer Cellulosecarbamat-HPLC-Säule und anschließender GC-Trennung die acht Stereoisomere von *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol in Geweben und Plasma von Ratten.

Eine chromatographische Methode zur Trennung von RS-Tocotrienolen ist bis jetzt nicht beschrieben worden.

### **1.5 Mechanismus der Silberionen-Chromatographie**

Silberionen-Chromatographie ist sehr häufig die Methode der Wahl bei der Analyse von Lipiden. Vor allem seit stabile Silberionensäulen, deren Eluat nicht mit Silber verunreinigt ist, kommerziell erhältlich sind, hat ihre Bedeutung und auch Verbreitung deutlich zugenommen. Früher wurden Ionenaustauschsäulen auf Kieselgelbasis individuell mit Silberionen imprägniert, indem die Säule mit Ammoniumnitrat gespült und anschließend wiederholt wäßrige Silbernitratlösung injiziert wurde, wobei Wasser durch die Säule gepumpt wurde. Nach dem Spülen mit einem organischen Lösungsmittel war die Säule einsatzbereit [dob 95].

Silberionen-Chromatographie basiert auf dem Prinzip, daß ungesättigte organische Moleküle reversibel mit Übergangsmetallen wie Silber reagieren und dabei schwache polare Ladungs-Transfer-(Charge-Transfer-) Komplexe bilden. Zwischen den Elektronen des besetzten  $2p \pi^*$  Orbitals der  $>C=C<$  Doppelbindung und den freien  $5s$  und  $5p$  Orbitalen des Silberions entsteht eine  $\sigma$ -Bindung. Eine  $\pi$ -Akzeptor-Bindung zwischen den freien antibindenden  $2p \pi^*$  Elektronen der  $>C=C<$  Doppelbindung und den besetzten  $4d$  Orbitalen des Silberions ist ebenfalls beteiligt. Die Komplexstabilität wird von der Verfügbarkeit der Elektronen in den gefüllten Orbitalen und von der sterischen Hinderung der Orbitale bestimmt. Durch Röntgen-Kristallstrukturanalyse konnte außerdem gezeigt werden, daß *ein* Silberion mit *zwei* ungesättigten Molekülen gleichzeitig, bzw. mit *zwei* Doppelbindungen in einem Molekül wechselwirken kann. Auf diese Art und Weise können Lipide nach Anzahl, Geometrie und Stellung der Doppelbindung(en) im Fettsäureanteil getrennt werden [nik 96, dob 95].

Im Zusammenhang mit der Analytik von Fettsäuren ist z. B. bekannt, daß für 1,4-Diene die Komplexstabilität mit steigender Anzahl der Doppelbindungen zunimmt und *cis*-konfigurierte Isomere stärker gebunden werden als *trans*-Doppelbindungen. Üblicherweise werden Fettsäuren vor der Chromatographie verestert, wobei die Wahl des Esters großen Einfluß auf den Trennerfolg hat. Dieser Effekt läßt sich dadurch erklären, daß sich ein Drei-Zentren-Komplex zwischen der Doppelbindung, dem Silberion und einem Elektronenpaar eines anderen elektronenpaarreichen Bereichs im Esteranteil bildet. Durch die gezielte Wahl eines Esters, der entweder die Eigenschaft eines Elektronen-Donators oder -Akzeptors aufweist, kann so die Elektronendichte der Doppelbindungen und damit die Retardierung des gesamten Moleküls beeinflußt werden [nik 96].

Als Eluenten werden häufig n-Hexan, Dichlormethan, Aceton und Acetonitril in verschiedenen Verhältnissen und Gradienten verwendet. Acetonitril spielt dabei eine besondere Rolle, da es sehr stark Silberionen komplexiert und so ungesättigte Lipide verdrängt.

Da dieses Trennprinzip nicht nur auf Fettsäuren beschränkt ist, kann es auch auf die Analytik der *cis/trans*-Tocotrienole übertragen werden. Die Ähnlichkeit mit den Fettsäuren ist durch die Lipophilie und die isolierten Doppelbindungen in der Kohlenwasserstoff-Seitenkette gegeben. In dieser Arbeit wird erstmals diese Verbindung zwischen Silberionen-Chromatographie und Vitamin-E-Analytik geknüpft.

### **1.6 Mechanismus der HPLC-Trennung an Cyclodextrin-Phasen**

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus 6, 7 oder 8  $\alpha$ -D-Glucoseeinheiten aufgebaut sind und entsprechend der Anzahl der Glucoseeinheiten  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrine genannt werden (siehe Abbildung 1-6). Durch den Baustein Glucose haben die Cyclodextrine eine chirale Struktur. Sie bilden schematisiert einen hohlen Kegelstumpf, wobei die OH-Gruppen in 2, 3 und 6 Position nach außen gewendet sind und in beide Richtungen einen hydrophilen Kranz bedingen. Die Mantelflächen werden aus den Pyranoseringen gebildet und erhalten so einen eher unpolaren Charakter (siehe Abbildung 1-7). Die Konsequenz daraus ist, daß Cyclodextrine mit anderen unpolaren Molekülen geeigneter Größe durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte unter wäßrigen Bedingungen Inklusionskomplexe ausbilden können. Weitere Wechselwirkungen sind mit den Hydroxygruppen an der Öffnung des Kegelstumpfes möglich. Die primären OH-Gruppen an C6 der Glucosemoleküle zeigen zum schmalen Ende des Kegelstumpfes und dienen z. T. für eine kovalente Fixierung auf einer Kieselgelmatrix, die sekundären an C2 und C3 sind zur größeren Öffnung gerichtet und werden wie die restlichen freien OH-Gruppen häufig selektiv derivatisiert [ict 96, mac 96].

Tabelle 1-6 Eigenschaften der Cyclodextrine <sup>a</sup>

	Glucose-Gruppen	Durchmesser	Tiefe
$\alpha$ -Cyclodextrin	6	0,57 nm	0,78 nm
$\beta$ -Cyclodextrin	7	0,78 nm	0,78 nm
$\gamma$ -Cyclodextrin	8	0,95 nm	0,78 nm

<sup>a</sup>aus Menges und Armstrong [men 91]

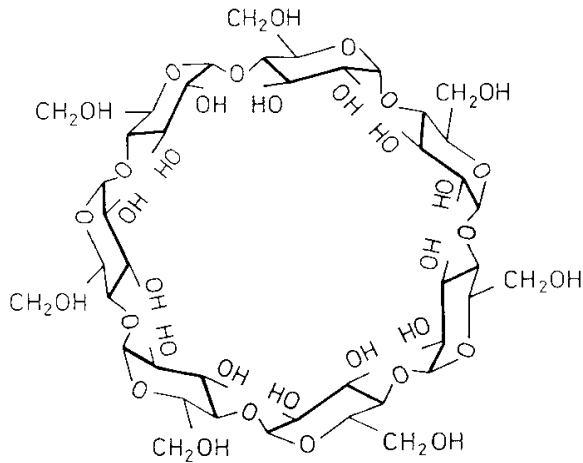


Abbildung 1-6 Struktur von  $\beta$ -Cyclodextrin

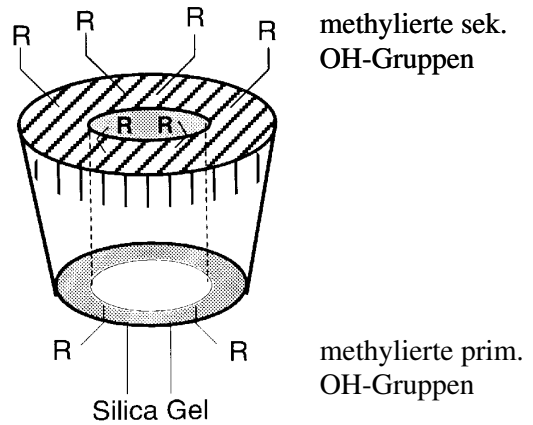


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung des von permethyliertem  $\beta$ -Cyclodextrin gebildeten Hohlkegelstumpfes;  $R = -OCH_3$

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase enthält keine freien OH-Gruppen, sondern ist ein permethyliertes Derivat, da sämtliche Hydroxygruppen des chiralen Selektors durch Methoxygruppen ersetzt sind. Dadurch wird der Cyclodextrin-Käfig im Vergleich zum underivatisierten Cyclodextrin vergrößert und die Hydrophobie der Öffnungen erhöht. Die permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -PM)-Phase eignet sich prinzipiell für die Trennung von Racematen, Konstitutions- und Konfigurationsisomeren, wobei für die Trennungen üblicherweise Umkehrphasen-Bedingungen gewählt werden.

Im Zusammenhang mit Vitamin E wurden Cyclodextrin-Phasen bisher äußerst selten erwähnt. Abidi und Mounts [abi 94] berichteten über die Trennung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol und 5,7-Dimethyltolcol durch Normalphasen-HPLC an  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrin. Stereoisomere wurden in ihrer Studie nicht behandelt.

## 1.7 Mechanismus der HPLC-Trennung an Cellulosecarbamat-Phasen

Enantiomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild; sie lassen sich nicht zur Deckung bringen. Obwohl Enantiomere sich in ihrer Konfiguration unterscheiden, sind ihre Eigenschaften, die die klassische chromatographische Trennung bestimmen, wie z. B. Löslichkeit, Ionisierbarkeit oder Polarität, identisch. Chirale HPLC-Trennung setzt voraus, daß *ein* Enantiomer mit der chiralen stationären Phase bevorzugt wechselwirkt. Dem Drei-Punkt-Wechselwirkungs-Modell (three-point interaction model) nach Dalgliesh [ber 92] zufolge werden drei Berührungspunkte zwischen dem Analyten und Stellen der stationären Phase benötigt: Nur eines von zwei Enantiomeren kann diese Drei-Punkt-Bindung besser ausbilden und wird deswegen länger retardiert. Dieses Modell basiert auf sehr einfachen Annahmen, da in Wirklichkeit nicht nur anziehende Wechselwirkungen eine Rolle



spielen, sondern auch sterische Hinderung als „abstoßende“ Wechselwirkung an dem chiralen Erkennungsmechanismus beteiligt sind [ber 92].

Da im Gegensatz zu der Cyclodextrin-Phase (siehe 1.6) bei einer Cellulosebasis keine Inklusionskomplexe zustandekommen können, müssen sich die Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Basis auf  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Wechselwirkungen und sterische Hinderung beschränken. Die Amidogruppe  $-\text{CO}-\text{NH}-$ , die sich als Substituent in unmittelbarer Nähe der chiralen C-Atome der Glucose-Bausteine befindet, kann nach dem Drei-Punkt-Modell an solchen Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein, wobei sie gleichzeitig als Protonendonator und-akzeptor wirken kann.

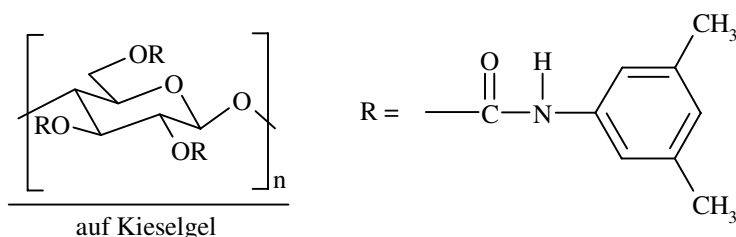


Abbildung 1-8 Struktur eines Cellulose-3,5-Dimethylphenylcarbamats als stationäre Phase

Cellulosecarbamate-Phasen können nur im Normal-Phasen Modus mit den mobilen Phasen Hexan/2-Propanol oder Hexan/Ethanol (jeweils beliebige Verhältnisse) betrieben werden, da sie sonst zerstört werden [dai 98].

## 1.8 Gesundheitliche Aspekte der Tocotrienole

### 1.8.1 Bioverfügbarkeit

Der Begriff Bioverfügbarkeit stammt aus der experimentellen Pharmakologie und wurde definiert als Anteil einer Testdosis, der nach der Absorption das Zielorgan erreicht [ber 93]. Übertragen auf Vitamin E wurde vorgeschlagen, die Bioverfügbarkeit als Rate bzw. Ausmaß zu bezeichnen, in der bzw. dem  $\alpha$ -Tocopherol aus der Nahrung oder einem Supplement absorbiert und in den Blutkreislauf gebracht wird [coh 97]. Die wichtigsten Einflußfaktoren auf die Absorption und damit auf die Bioverfügbarkeit eines Stoffs sind dessen chemische Struktur und seine physikalisch-chemischen Eigenschaften. Aber auch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren (Versorgungszustand, Dosierung, Art, Menge und Ballaststoffgehalt der Nahrung u. a.) können die Verwertbarkeit von Vitamin E ebenso fördern wie hemmen [elm 93]. Darüber, ob diese Definition auch auf Tocotrienole oder gar deren Seitenkettenisomere übertragbar ist, sind noch keine Stellungnahmen bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Bioverfügbarkeit trotzdem im Zusammenhang mit den *cis/trans*-Tocotrienolen verwendet. Da momentan noch keine Methoden zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit existieren, und auch für Tocopherolstereoisomere oder andere Homologe die

Bioverfügbarkeit stets nur als relativer Wert angegeben werden kann [coh 97], hat die relative Beurteilung der *cis/trans*-Tocotrienole ebenfalls ihre Berechtigung. Trotz oder gerade wegen einer Vielzahl von Einzeluntersuchungen zur Bioverfügbarkeit des Vitamin E [ing 87, tra 88, fer 93, acu 94, wei 96, kiy 97] konnte noch keine allgemein anerkannte Rangfolge der Vitamere und ihrer Stereoisomere aufgestellt werden, da die Versuchsbedingungen für einen direkten Vergleich der Ergebnisse zu unterschiedlich waren.

### 1.8.2 Vitamin-E-Aktivität

Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Tocopherolen und Tocotrienolen stützen sich auf sehr verschiedene Kenngrößen wie Plasma- und Gewebespiegel, Kreatinurie und Pyruvatkinaseaktivität als Symptome einer Myopathie (Muskelerkrankung), Resorptions-Gestationsparameter (siehe 1.4.2), Händedegeneration und Erythrozytenhämolyse bei Einwirkung von Oxidationsmitteln *in vitro*, wobei die mitgeteilten Werte in weiten Bereichen schwanken [gaß 95]. Die folgende Tabelle 1-7 gibt die Faktoren zur Umrechnung der verschiedenen Homologen in Tocopheroläquivalente (TÄ) und ein Beispiel der für die  $\alpha$ -Tocopherol-Stereoisomere ermittelten Werte wieder. Beide basieren auf dem Gestations-Fötusresorptionstest (siehe 1.4.2). Nach Gaßmann [gaß 95] sind diese Werte heute allgemein akzeptiert, obwohl sie, wie er betont, noch von keinem internationalen Gremium bestätigt wurden und der zur Bestimmung der Vitamin-E-Aktivität herangezogene Gestations-Fötusresorptionstest für den Menschen völlig irrelevant sei.

Tabelle 1-7 Vitamin-E-Aktivitäten von Tocopherolen und Tocotrienolen als Tocopheroläquivalente (TÄ)

Komponente	Aktivität in TÄ (mg/mg Komponente) [gaß 95]	Komponente	Aktivität in TÄ (mg/mg Komponente) [net 96]
RRR, $\alpha$ -Tocopherol	1,0	RRR, $\alpha$ -Tocopherol	1,0
RRR, $\beta$ -Tocopherol	0,5	RRS, $\alpha$ -Tocopherol	0,9
RRR, $\gamma$ -Tocopherol	0,1	RSS, $\alpha$ -Tocopherol	0,73
RRR, $\delta$ -Tocopherol	0,03	SSS, $\alpha$ -Tocopherol	0,6
R, $\alpha$ -Tocotrienol	0,3	RSR, $\alpha$ -Tocopherol	0,57
R, $\beta$ -Tocotrienol	0,05	SRS, $\alpha$ -Tocopherol	0,37
R, $\gamma$ -Tocotrienol	0,01	SRR, $\alpha$ -Tocopherol	0,31
all-rac-Tocopherylacetat	0,74	SSR, $\alpha$ -Tocopherol	0,21

Für  $\delta$ -Tocotrienol liegen keine Zahlenangaben vor. Sein Beitrag zur Vitamin-E-Aktivität gilt als vernachlässigbar.

### 1.8.3 Gesundheitliche Wirkung

Vitamin E ist das wichtigste, wenn nicht sogar das einzige Antioxidans in der biologischen Membran, das zum Abbruch einer Radikalkettenreaktion führen kann. Seine Membrankonzentration ist jedoch sehr gering: gewöhnlich nur 0,1-0,5 nmol/mg Protein und weniger als 1 Molekül pro 1000-2000 Membran-Phospholipiden [pac 93]. Trotz dieser niedrigen molaren Konzentration kommt es unter Normalbedingungen nicht zu oxidativen Schäden an Membranlipiden und -proteinen. Das liegt daran, daß Tocopherole und Tocotrienole effektiv von ihrer freien Radikalform, die sie nach dem Quenchen anderer freier Radikale selbst einnehmen, wieder in ihren Ausgangszustand zurückgeführt werden können. Bei diesem sogenannten Vitamin-E-Zyklus sind enzymatische und nichtenzymatische Reaktionen von wasser- und fettlöslichen Antioxidantien mit den entstehenden Tocochromanoxyl-Radikalen beteiligt, die zu einer Rückgewinnung des Vitamin E führen [pac 93a, bur 90]. Wenn jedoch der oxidative Streß diesen Vitamin-E-Zyklus überfordert oder wenn eine angeborene Vitamin-E-Absorptionsschwäche vorliegt, kann der wirksame Tocopherol- und Tocotrienol-Anteil so weit sinken, daß es zu oxidativen Schäden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommen kann. Diese akute Situation kann sich z. B. in Herzinfarkt, Schlaganfall oder hämorrhagischem Schock äußern [pac 93].

In den USA ist die empfohlene tägliche Aufnahmemenge 15 mg *all-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat*. Nach Packer sollte die Zufuhr jedoch wesentlich höher sein, zumal eine tägliche Aufnahme von 800 mg *all-rac- $\alpha$ -Tocopherylacetat* als bedenkenlos gilt [pac 93]. Kommerzielle Anbieter von natürlichen Tocotrienol-Präparaten offerieren 25-60 mg gemischter Tocotrienole als tägliche Nahrungsergänzung [eas 98]. Klinisch wird Vitamin E z. B. bei gestörter Absorptionsfähigkeit, Atemnot, Epilepsie, in der Krebstherapie und bei Sonnenbrand angewendet; vorbeugend wird Vitamin E gegen Alterungsprozesse, Krebs, Arthritis, Herz- und Kreislauferkrankungen, grauen Star, bei großer körperlicher Anstrengung und zum Schutz der Lunge gegen Folgen der Luftverschmutzung eingesetzt [pac 93].

Die biologische und die antioxidative Aktivität der Homologen ist nicht identisch. So wurde beispielsweise festgestellt, daß  $\alpha$ -Tocotrienol im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol zwar nur etwa 1/3 der Vitamin-E-Aktivität, aber eine bis zu 60fach höhere antioxidative Wirkung in biologischen Membranen [ser 91, pac 92, sua 93, suz 93] aufweist. So hat dieser Widerspruch zwischen der Bioaktivität und der Radikalfängeraktivität zu Irritationen geführt, die noch nicht ganz beseitigt sind [gaß 95].

Im Laufe der Zeit wurden einige interessante gesundheitsbezogene Eigenschaften der Tocotrienole bekannt. So zeigt  $\alpha$ -Tocotrienol *in vitro* eine höhere Schutzwirkung gegen eine oxidative Hämolyse von roten Blutzellen als  $\alpha$ -Tocopherol [tat 71], ebenso wie eine stärkere Antitumorwirkung *in vivo* und *in vitro*, was auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt wird [kat 85, sun 89, kom 89, kom 92, nes 95]. Besondere Aufmerksamkeit jedoch hat die cholesterinbiosynthesehemmende Wirkung der Tocotrienole erregt. Durch die Fütterung von Tieren (Schweine, Hühner) mit tocotrienolreichen

Extrakten aus Palmöl oder Gerstenöl wurde eine Senkung des Plasma-Cholesterinspiegels beobachtet [qur 91, wan 93]. Anhand von Zellkulturen wurde schließlich nachgewiesen, daß  $\gamma$ -Tocotrienol ca. 30mal stärker als  $\alpha$ -Tocotrienol die an der Cholesterinbiosynthese beteiligte 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase hemmt und so diese Wirkung entfaltet [pea 92, par 93].  $\alpha$ -Tocopherol zeigt diesen Effekt nicht. Auch wurde die Wirkung von natürlichen Tocotrienolen mit synthetisch hergestellten RS,*trans-trans*-Tocotrienolen verglichen, aber kein signifikanter Unterschied festgestellt. Weitere Studien bestätigten und ergänzten diese Erkenntnisse über die Cholesterinbiosynthesehemmung der Tocotrienole [wat 93, pea 94]. Dabei wurde u. a. gezeigt, daß eine freie aromatische Hydroxygruppe und die Doppelbindungen in der Tocotrienol-Seitenkette für die cholesterinsenkenden Eigenschaften unverzichtbar sind. Die geometrische Konfiguration der Doppelbindungen und die Chiralität an C2 spielen dabei aber eine untergeordnete Rolle, wie an einem synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Analogon, dessen Seitenkette zur Geranylstruktur verkürzt war, beobachtet wurde.

## **1.9 Absorption und Transport von Vitamin E im Organismus**

Vitamin E benötigt wegen seiner hydrophoben Eigenschaften spezielle Transportmechanismen im wäßrigen Milieu von Blutplasma, Körperflüssigkeiten und Zellen. Im Blutplasma werden die Tocopherole nicht wie andere fettlösliche Vitamine durch besondere Transportproteine, sondern in erster Linie durch unspezifische Lipoproteine, wie LDL (Low Density Lipoprotein), HDL (High Density Lipoprotein) und VLDL (Very Low Density Lipoprotein) transportiert [kay 93].

### **1.9.1 Absorption im Dünndarm und Sekretion in Chylomikronen**

Die freie Form der Tocopherole und Tocotrienole wird im Darm mit Hilfe von Gallensäuren in Mizellen überführt und so im ersten und zweiten Drittel des Dünndarms absorbiert. Die Aufnahme in die Darmepithelzellen (Enterozyten) ist ein passiver Prozeß, wobei Vitamin E zusammen mit den ebenfalls in den Mizellen vorhandenen Lipiden oder deren Hydrolysaten die Zellwand passiert. Eine neuere Studie berichtet, daß bei der Absorption im Dünndarm  $\alpha$ -Tocotrienol gegenüber  $\alpha$ -Tocopherol und  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol ca. um den Faktor 2 bevorzugt wird [ike 96]. Von den Enterozyten wird Vitamin E in entstehende Chylomikronen<sup>2</sup> eingebaut, worauf diese in die Lymphe sezerniert und zur Leber transportiert werden. Während des Chylomikronen-*Katabolismus* wird ein Teil des Vitamin E auch durch die beteiligte Lipoproteinlipase (LPL) direkt in die Gewebe verteilt und dort in die Zellen aufgenommen, sofern das Enzym an der Zelloberfläche gebunden wird. Ein anderer Teil wird während des enzymatischen Abbaus der Chylomikronen als überschüssiger Oberflächenbestandteil auf HDL übertragen. Die nach dem Abbau zurückbleibenden Chylomikronen-Reste (Remnants)

---

<sup>2</sup> große Lipoproteine ( $\varnothing$  80-500 nm) sehr geringer Dichte ( $< 0,94 \text{ g/cm}^3$ ), reich an Triglyceriden ( $> 98 \%$ ) [str 91]

erhalten Apolipoprotein E (Apo E) von den HDL, welches die Remnants zur Leber dirigiert, wo sie in einem wahrscheinlich rezeptorvermittelten Prozeß aufgenommen werden.

### 1.9.2 Sekretion und Katabolismus der VLDL

In der Leber findet eine klare Unterscheidung der Homologen zugunsten des  $\alpha$ -Tocopherols statt. Ein 30 kDa<sup>3</sup>  $\alpha$ -Tocopherol-Bindeprotein (TBP) im Zytoplasma von Leberzellen (Hepatozyten) wird für diese Präferenz verantwortlich gemacht, da es daran beteiligt ist, daß RRR- $\alpha$ -Tocopherol während der Synthese von VLDL bevorzugt inkorporiert und dann als Einheit aus den Hepatozyten sezerniert wird. Die anderen Homologe werden von der Leber aus in die Gallen-Canaliculi abgegeben.  $\alpha$ -Tocopherol, das mit VLDL aus der Leber ausgeschieden wird, wird auf verschiedene Arten weitertransportiert.  $\alpha$ -Tocopherol wird während der Lipolyse teilweise auf HDL übertragen, teilweise auch mit dem Inneren der VLDL in LDL überführt werden oder als VLDL-Rest wieder in die Leber zurückkehren. Darüber hinaus findet ein intensiver Austausch der Tocopherole zwischen LDL und HDL statt [dut 94].

Das oben angesprochene 30 kDa TBP wurde bisher nur in den Hepatozyten nachgewiesen, obwohl  $\alpha$ -Tocopherol in allen bedeutenden Geweben vorkommt. Über die *intrazellulären* Transportmechanismen, die darüber hinaus bewirken, daß Vitamin E dort angesammelt wird, wo die meisten Sauerstoffradikale produziert werden, wie z. B. in den Membranen von Mitochondrien und des Endoplasmatischen Reticulums, ist allerdings nur wenig bekannt. Im Cytosol von Leber- und Herzzellen wurde kürzlich ein 14,2 kDa Bindeprotein gefunden, das auch in Gegenwart von  $\gamma$ - und  $\delta$ -Homologen spezifisch  $\alpha$ -Tocopherol bindet und sowohl für den intrazellulären Transport als auch für die Verteilung von  $\alpha$ -Tocopherol im Gewebe verantwortlich sein soll.

LDL-Rezeptoren in den Zellmembranen sollen die Aufnahme des  $\alpha$ -Tocopherols von den Lipoproteinen in die Gewebe bewirken [dut 94]. In die Erythrozyten gelangt  $\alpha$ -Tocopherol über ein Plasmamembran- $\alpha$ -Tocopherol-Bindeprotein. Plasma-Tocotrienole halten sich dagegen offensichtlich in den Chylomikronen auf, da sie mit diesen aus dem Blut zu entfernen sind [hay 93].

### 1.9.3 Tocopherol-Bindeprotein (TBP)

Das TBP in Hepatozyten diskriminiert während der Einlagerung in entstehende VLDL zwischen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol. Kayden und Traber [kay 93] postulieren, daß das TBP eine hydrophobe Tasche aufweist, die die freie Hydroxylgruppe und die drei Methylgruppen des Chromanolrings ebenso wie die Konfiguration der 2-Position mit dem Phytol-Rest erkennen kann. So soll nach der Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Leber und der Hydrolyse der Remnants in den Lysosomen das Tocopherol für die Sekretion zur Verfügung stehen. TBP könnte bevorzugt RRR- $\alpha$ -Toco-

---

<sup>3</sup> Dalton (Da, atomare Masseneinheit):  $1,660 \times 10^{-24}$  g; Kildalton (kDa): Masseneinheit, die 1000 Dalton entspricht

pherol von den Lysosomen zum Endoplasmatischen Reticulum transportieren, damit es dort in die entstehenden VLDL inkorporiert werden kann. Wahrscheinlich wird das TBP dabei nicht Teil der VLDL, sondern entläßt das  $\alpha$ -Tocopherol in das Lipid-Milieu der sich bildenden VLDL.

In Abbildung 1-9 sind die erläuterten Absorptions- und Transportvorgänge in einem Schaubild zusammengefaßt.

Trotz des steigenden Interesses an den gesundheitserhaltenden Eigenschaften des Vitamin E ist auf dem Gebiet der *Tocotrienole* nur wenig über die Transportmechanismen berichtet worden. Insbesondere seit der Erkenntnis, daß im Organismus hochspezifische Bindeproteine die Verteilung von stereoisomeren  $\alpha$ -Tocopherolen steuern, ist die Frage relevant, ob auch in der Seitenkette geometrisch veränderte Tocotrienole im Stoffwechsel diskriminiert werden. Mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode ist der analytische Grundstein für eine Vielzahl von biologisch wichtigen Untersuchungen gelegt.

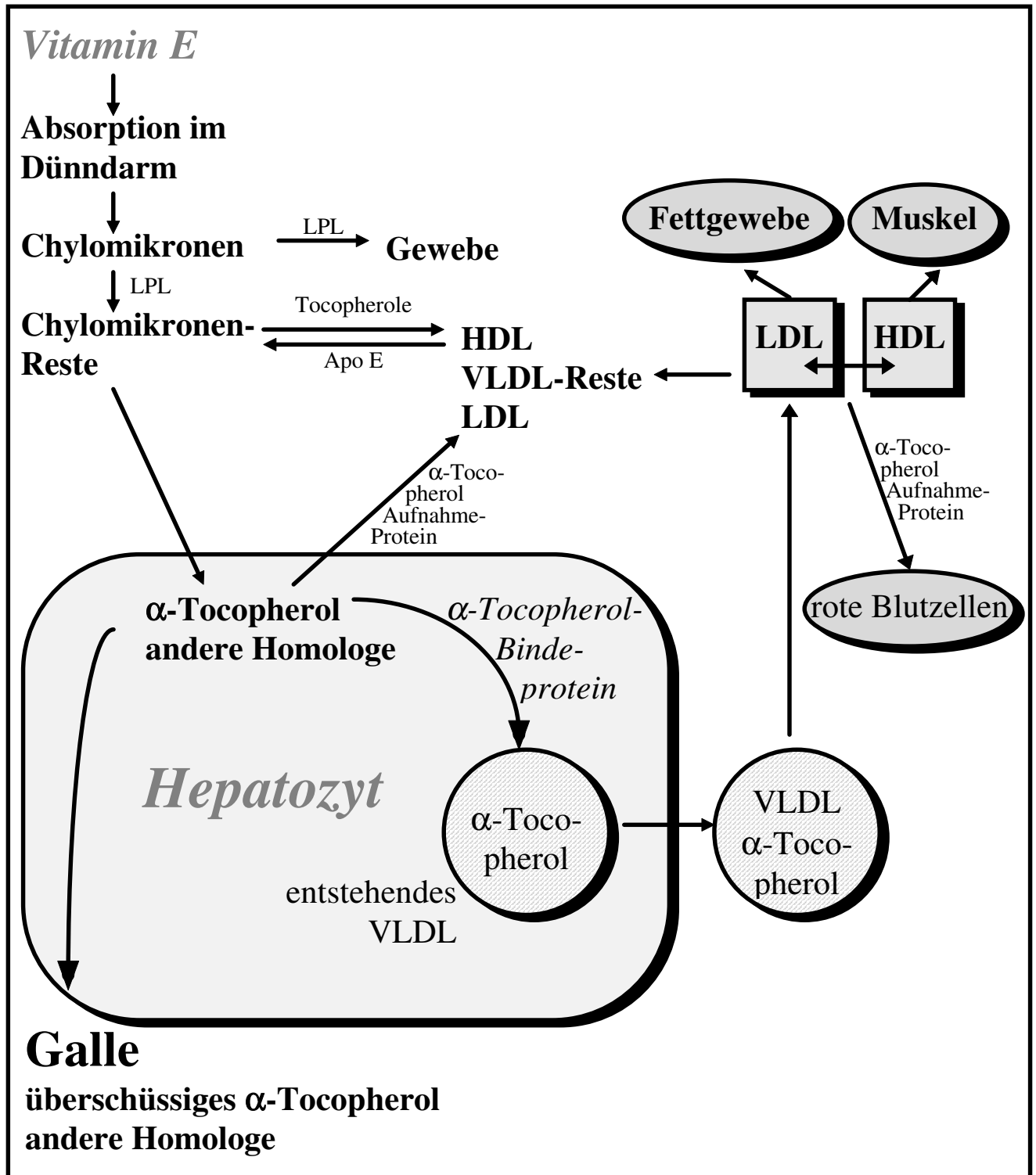


Abbildung 1-9 Vitamin-E-Transport-Mechanismus; Transport der Tocopherole vom Dünndarm zu anderen Geweben.

Tocopherole werden aus der Nahrung in Chylomikronen absorbiert und der Großteil dann unter dem Einfluß von Lipoproteinlipase (LPL) in die Leber transportiert, wo  $\alpha$ -Tocopherol im Normalfall in sich bildende VLDL sezerniert wird. Andere Vitamin-E-Homologe und überschüssiges  $\alpha$ -Tocopherol wird in die Galle ausgeschieden. Ein  $\alpha$ -Tocopherol-Bindeprotein soll für die spezifische Aufnahme von RRR- $\alpha$ -Tocopherol in VLDL verantwortlich sein. LDL-Rezeptoren vermitteln die Aufnahme von  $\alpha$ -Tocopherol aus Lipoproteinen in die Gewebe. Nach Dutta-Roy et al. [dut 94].

## 2 Übersicht zur Durchführung der Untersuchungen

### 2.1 Vorüberlegungen

Synthetische Tocotrienol-Präparate können, wenn keine stereoselektive Synthese angewendet wurde, als eine Mischung aus RS,*cis/trans*-Isomeren (siehe 1.3) vorliegen. Da die Tocotrienole biologisch aktiv sind, ist es geboten, sie umfassend analytisch-chemisch zu charakterisieren. Die unterschiedliche physiologische Wirksamkeit der Tocotrienole im Vergleich zu den Tocopherolen kann auf den einzigen Unterschied in ihrer molekularen Struktur, also die drei Doppelbindungen in der Phytylseitenkette, zurückgeführt werden. Wenn diese Doppelbindungen, die in der Natur ausschließlich *trans-trans*-konfiguriert sind [sch 72], eine andere geometrische Struktur aufweisen, könnte das durchaus Auswirkungen auf die biologische Aktivität oder Bioverfügbarkeit der Tocotrienole haben. Ungesättigte, essentielle Fettsäuren können z. B. ihre physiologische Bedeutung verlieren, wenn die geometrische Struktur der Doppelbindung von *cis* nach *trans* verändert wird.

Auch eine veränderte Konfiguration an C2 des Chromanolringsystems könnte ein verändertes Verhalten der Tocotrienole im Organismus zur Folge haben. Im Falle des *all-rac-α*-Tocopherols ist die bevorzugte Behandlung des RRR- $\alpha$ -Tocopherols vor den sieben anderen Stereoisomeren durch ein spezifisches  $\alpha$ -Tocopherol-Bindeprotein allgemein anerkannt [dut 94].

**Bioverfügbarkeit.** Erste Erkenntnisse über die Bioverfügbarkeit synthetischer Tocotrienole können Fütterungsversuche mit Hühnern bringen. Legehennen nehmen mit synthetischem Tocotrienol supplementiertes Futter auf und lagern die darin enthaltenen Tocotrienol-Seitenkettenisomere entsprechend ihrer Bioverfügbarkeit in das Eigelb ein. Bei diesem Modell „Futter-Huhn-Ei“ können so Aussagen getroffen werden, ob *cis/trans*-Tocotrienole im Vergleich zum natürlichen *trans-trans*-Tocotrienol überhaupt bioverfügbar sind und gegebenenfalls, ob Unterschiede zwischen den Isomeren bestehen. Daran können sich dann umfangreichere Untersuchungen anschließen, die den Eingriff in die Blutbahn von Tier oder Mensch rechtfertigen.

**Auswirkung auf Zellkulturen.** Mit der Zelle als kleinste lebende Einheit können physiologische Vorgänge aufgespürt werden, die zu einer unterschiedlichen Behandlung von Tocotrienol-Isomeren führen. An menschlichen Gewebezellkulturen, die synthetischem Tocotrienol exponiert werden, kann untersucht werden, ob aktiv (durch spezielle Stoffwechselforgänge) oder passiv Tocotrienol-Isomere diskriminiert werden. Die Ergebnisse aus solchen Studien sollen zu der Entscheidung beitragen, ob im gesamten Organismus mit einer unterschiedlichen Behandlung von *cis/trans*-Isomeren zu rechnen ist, und medizinisch-biologische Untersuchungen planen helfen.

**Technologische Prozesse.** Die chemische Synthese ist sicherlich als Hauptquelle für das Vorkommen von Tocotrienol-Isomeren anzusehen (siehe 1.3). Es sollte allerdings auch in Betracht gezogen



werden, daß ebenso *natürliche R,trans-trans*-Isomere durch äußere Einflüsse in ihrer Struktur modifiziert werden könnten. *Cis/trans*-Isomere an Doppelbindungen entstehen beispielsweise während des katalytischen Fetthärtungsprozesses, wo sich natürlicherweise *cis*- konfigurierte ungesättigte Fettsäuren in partiell hydrierte *trans*-konfigurierte Fettsäuren umwandeln können [pat 94]. Da die Tocotrienole wegen ihrer Kohlenwasserstoffkette in der Struktur den ungesättigten Fettsäuren ähnlich sind, kann man vermuten, daß auch sie aus dem Hydrierprozeß isomerisiert hervorgehen. Ungünstige Bedingungen herrschen deshalb bei der Härtung tocotrienolreicher Öle wie Palmöl. Nach Sojaöl ist Palmöl mit jährlich 12 Mio. Kubikmetern (1992) das weltweit am häufigsten produzierte Pflanzenöl, wovon der Großteil katalytisch hydriert wird [pat 94]. Es kann daher ernährungsphysiologisch von großer Bedeutung sein, *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere aufzuspüren.

**Biohydrierung.** Wiederkäuer verfügen in ihrem Pansen über eine Mikroorganismenflora, die die Anzahl, Stellung und Konfiguration von freien ungesättigten Fettsäuren beeinflusst. Während der sogenannten Biohydrierung im Pansen entstehen partiell hydrierte *cis/trans*-Fettsäuren, die sich auch in Milch und Geweben der Wiederkäuer wiederfinden. Dieser enzymatisch gesteuerte Prozeß der Biohydrierung könnte auch die lipophilen Tocotrienole erfassen und die Doppelbindungen in der Phytolseitenkette modifizieren, so daß der Lipidmetabolismus der Wiederkäuer ebenfalls als eine Quelle für *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere in Frage kommt.

## 2.2 Allgemeine Zielsetzung

Für die *RS,cis/trans*-Tocotrienol-Isomere wurde bisher noch keine chemische Analysenmethode beschrieben, die eine vollständige Charakterisierung der Tocotrienole erlaubt. Lediglich für *cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol ist eine Isomerentrennung durch Gaschromatographie bekannt, wobei jedoch die Zuordnung der Peaks nicht spektroskopisch bestätigt wurde [may 67]. Wünschenswert ist gleichzeitig eine Analytik, die verschiedenen Anforderungen gerecht wird: So kann für manche Belange eine Methode von Vorteil sein, die in einer Lebensmittelprobe, einem Nahrungsergänzungs- oder Arzneimittel den Nachweis von *cis/trans*-Isomeren der Tocotrienole neben einer Vielzahl anderer Antioxidantien ermöglicht. Die Feststellung, daß und gegebenenfalls in welchem Verhältnis geometrische Isomere nachzuweisen sind, erlaubt bereits den Rückschluß auf die Verwendung eines synthetischen Präparats. Für andere Zwecke kann eine komplette Trennung der acht *RS,cis/trans*-Isomere von den vier einzelnen Tocotrienolen erwünscht sein, um physiologische Vorgänge genau nachvollziehen zu können.

Durch die spektroskopische Charakterisierung und Zuordnung der Isomere im HPLC-Chromatogramm muß die Voraussetzung für eine möglichst konkrete Bestimmung geschaffen werden. Die entwickelten HPLC-Methoden sollen in Kombination mit einer geeigneten Probenvorbereitung eine Vielzahl von detaillierten Bestimmungen in komplexen Matrices realisierbar

werden lassen. Zumindest sollen Antworten auf die oben aufgeworfenen Fragen zur Bioverfügbarkeit, Auswirkung auf Zellkulturen, technologischen und biologischen Prozessen angeboten werden.

### **2.3 Vorgehen zum Erreichen der Zielvorgaben**

Mit der Realisierung der oben genannten Ziele wird eine völlig neuartige Vitamin-E-Analytik etabliert und ihre Leistungsfähigkeit an mehreren Beispielen demonstriert.

In der Abbildung 2-1 ist schematisiert, wie die Auftrennung von Tocotrienolen in *cis/trans*-Isomere und deren Enantiomere verwirklicht werden kann. Sie soll ein Wegweiser für die folgenden Kapitel sein, in denen genaue Angaben zu den Methoden enthalten sind und die Ergebnisse ihrer Anwendung diskutiert werden. An dieser Stelle sollen die Möglichkeiten vorab kurz skizziert werden.

Für die Bestimmung von Tocotrienolen aus einer beliebigen Probe werden die Vitamin-E-Homologen durch die Extraktion des Unverseifbaren aus der Matrix isoliert. Besonders tocotrienolreiche Öle oder Präparate können auch direkt in einem unpolaren Lösungsmittel gelöst werden und für die analytische oder präparative HPLC-Methode auf der Diol-Phase benutzt werden. Die analytische Diol-Phase dient zur Trennung aller acht Homologen und verschafft dadurch einen Überblick über den Tocopherol- und Tocotrienolgehalt der Probelösung. Wird die isokratische Methode auf einen semipräparativen Maßstab übertragen, dient sie zur Isolierung beliebiger Vitamere aus einer Probelösung, woraufhin die Tocotrienole dann weiter differenziert werden können.

Ein System zum Erkennen von *cis/trans*-Tocotrienolen neben einer Reihe von anderen Antioxidantien stellt die RP18-Multimethode mit Gradientenelution dar. Hier trennen sich die vier Seitenkettenisomere eines jeden Tocotrienols in zwei Fraktionen, womit nachgewiesen werden kann, daß das Tocotrienol aus einer nicht stereoselektiven Synthese stammt. Die Methode deckt ein breites Spektrum von häufig verwendeten Antioxidantien ab, so daß der Vorteil in einem Screening der Inhaltsstoffe einer Probe liegt und gleichzeitig Rückschlüsse auf den Ursprung der Tocotrienole erlaubt sind. Sowohl  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, als auch die Isomere von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol trennen sich dabei als Kompromiß jedoch nicht vollständig voneinander ab.

Durch die im Vergleich zur analytischen Methode durch isokratische Elution vereinfachte präparative RP18-Methode kann beispielsweise  $\alpha$ -Tocotrienol in zwei Fraktionen separiert werden. Eine massenspektroskopische Untersuchung der Fraktionen gibt erste Aufschlüsse darüber, daß es sich bei den isolierten Substanzen um Seitenkettenisomere handeln muß.

Die Silberionen-Phase ermöglicht ein isokratisches HPLC-Verfahren, bei dem 13 der insgesamt 16 *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere neben den Tocopherolen getrennt werden können.  $\alpha$ -Tocotrienol, das über die höchste Vitamin-E-Aktivität unter den Tocotrienolen verfügt, spaltet sich dabei in seine vier Seitenkettenisomere auf.

Es wurde eine weitere RP18-Methode entwickelt, die eine im Vergleich zur Multimethode verbesserte *cis/trans*-Isomerentrennung der Tocotrienole leistet. Durch einen modifizierten Gradienten kann ein Gemisch der Tocotrienol-Homologen in 10 Seitenkettenisomere getrennt werden.

Alternativ dazu können durch die semipräparative Diol-Phase isolierte Tocotrienole auch auf der analytischen permethylierten Cyclodextrin ( $\beta$ -PM)-Phase getrennt werden. Diese Methode ermöglicht die Separierung einzeln injizierter Tocotrienole in jeweils vier basisliniengetrennte *cis/trans*-Isomere. Die Elutionsreihenfolge dieser geometrischen Isomere wurde durch spektroskopische Untersuchungen festgelegt, nachdem die Substanzen im präparativen Maßstab isoliert worden sind.

Die Trennung von *cis/trans*-Tocotrienol-Isomeren auf der präparativen  $\beta$ -PM dient neben der spektroskopischen Charakterisierung auch dazu, die vier einzelnen Isomere für eine Trennung in ihre Enantiomere vorzubereiten. Nach der Derivatisierung zum Methylether erhält man auf der Cellulosecarbamat-Säule für jedes Tocotrienol-Seitenkettenisomer eine Auftrennung in zwei Peaks, die dem R- und S- Enantiomer entsprechen. Am Beispiel eines synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienols wird im folgenden gezeigt, wie durch die Kombination aus beiden Säulen ( $\beta$ -PM und Cellulosecarbamat-Phase) alle acht möglichen RS,*cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere getrennt werden können.

Die Cellulosecarbamat-Methode verlangt jedoch nicht unbedingt, daß die *cis/trans*-Isomere durch ein präparatives Verfahren vorgetrennt werden. Werden synthetische Tocotrienolpräparate als Gemisch ihrer acht Isomere derivatisiert, kommt es je nach Tocotrienol trotzdem zu einer Separierung von bis zu acht Isomeren ( $\beta$ - und  $\delta$ -Tocotrienol).  $\alpha$ -Tocopherol zeigt bei diesem Verfahren ebenfalls eine Unterscheidung seiner Stereoisomere.

Die folgende Abbildung 2-1 zeigt also alternative Wege auf, sich der Isomerentrennung von Tocotrienolen zu nähern. Ebenso liefert sie eine Kombination von Methoden, um in einer Art Trennungsgang alle acht RS,*cis/trans*-Isomere eines Tocotrienols aus komplexen Matrices bestimmen zu können. Analytische und dazu analoge präparative Methoden sind im Trennungsgang hintereinander aufgeführt, obwohl sie natürlich auch alternativ verwendbar sind. Diese Anordnung wurde so gewählt, weil üblicherweise Zusammensetzung und Analytgehalt einer Probelösung durch die wirtschaftlichere analytische Methode bestimmt wird, bevor das präparative Verfahren mit den höheren Betriebskosten zum Einsatz kommt.

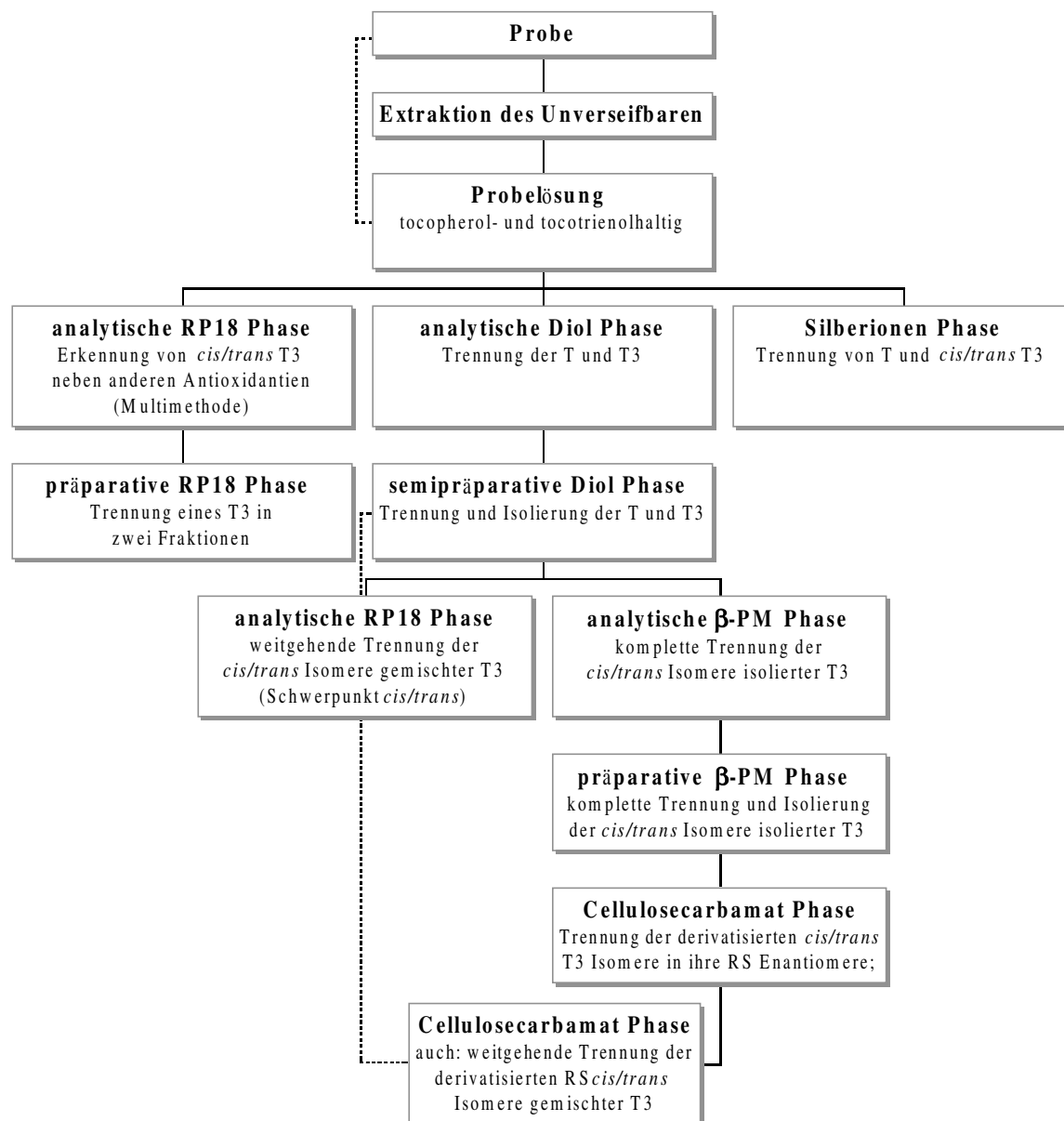


Abbildung 2-1 Trennungsgang der RS,cis/trans-Tocotrienole

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 HPLC-Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen

#### 3.1.1 Zielsetzung

Ein wichtiger Baustein der in dieser Arbeit beschriebenen Vitamin E Analytik ist die erfolgreiche HPLC-Trennung der vier Tocopherole und vier Tocotrienole. Eine analytische Methode wird allgemein benötigt, um die Gehalte an Vitaminen in verschiedenen Proben zu bestimmen. Eine semipräparative Trennung dient dazu, in komplexen Matrices interessierende Tocotrienole aus der Summe der anderen Vitamin-E-Homologe zu isolieren und dann einer speziellen Analytik zur Verfügung zu stellen. Zum Erreichen der beiden Ziele bietet sich eine Diol-Phase an, die sich für den Routineeinsatz in der Vitamin-E-Analytik bereits bewährt hat (siehe 1.4).

#### 3.1.2 Analytische Trennung auf einer Diol-Phase

Im wesentlichen entspricht die verwendete Methode der von Balz et al. [bal 92] beschriebenen. Die Trennung der Homologen gelingt mit einem isokratischen n-Hexan/tert-Butylmethylether-Eluenten auf einer stark polaren Diol-Säule und Fluoreszenz-Detektion. In Abwandlung wurde getrocknetes n-Hexan zur Herstellung des Eluenten verwendet, welches die Retentionszeit des Vitamerengemisches im Vergleich zu der ursprünglich von Balz et al. [bal 92] entwickelten Methode von über 50 min auf max. 20 min verkürzt. Die verkürzten Retentionszeiten sind wahrscheinlich auf eine verminderte Polarität der Analyten zurückzuführen, die durch die fehlende Wechselwirkung mit Wasserspuren im Eluenten verursacht wird. Alle Tocopherole und Tocotrienole erscheinen basisliniengetrennt neben Tocol als internem Standard (siehe Abbildung 3-1), so daß diese zeitsparende Variante gewählt wurde.

Die Gehalte an Tocotrienolen in Probelösungen wurden extern über Kalibriergeraden oder mit Hilfe des internen Standards Tocol bestimmt. Die selbst bestimmten Kalibriergeraden wiesen z. T. andere Steigungen oder Bereiche der Linearität als in der Literatur beschrieben (siehe 4.1.1.3) auf. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf Unterschiede in den verwendeten Fluoreszenz-Detektoren zurückzuführen. Balz et al. [bal 93] berichteten in diesem Zusammenhang, daß  $\alpha$ -Tocopherylacetat überhaupt nur bei bestimmten Fluoreszenz-Detektoren ein Signal erzeugte.

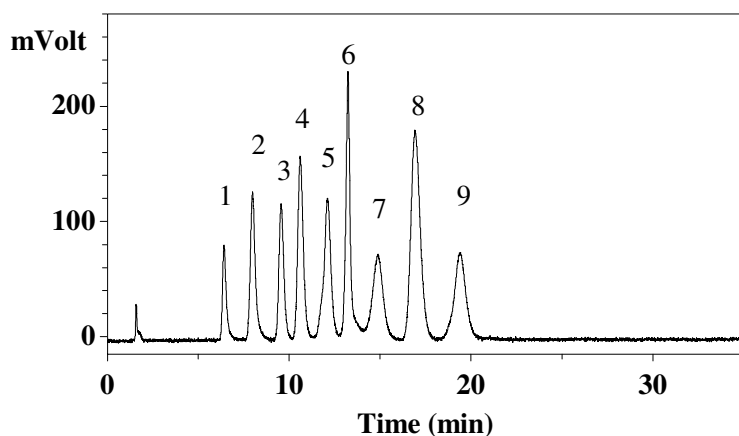


Abbildung 3-1 Chromatogramm eines Referenzgemisches aller acht Tocopherole und Tocotrienole mit Tocol als internem Standard; HPLC-Trennung mit analytischer Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion.

1 =  $\alpha$ -Tocopherol 1,33 mg/L (RT 6,24 min); 2 =  $\alpha$ -Tocotrienol 2,73 mg/L (RT 7,99 min); 3 =  $\beta$ -Tocopherol 1,57 mg/L (RT 9,56 min); 4 =  $\gamma$ -Tocopherol 1,85 mg/L (RT 10,60 min); 5 =  $\beta$ -Tocotrienol 2,13 mg/L (RT 12,11 min); 6 =  $\gamma$ -Tocotrienol 2,24 mg/L (RT 13,23 min); 7 =  $\delta$ -Tocopherol 1,97 mg/L (RT 14,88 min); 8 = Tocol 4,00 mg/L (RT 16,91 min); 9 =  $\delta$ -Tocotrienol 2,15 mg/L (RT 19,43 min)

### 3.1.3 Semipräparative Trennung auf einer Diol-Phase

Die analytische Methode wurde ohne wesentliche Änderungen auf eine semipräparative HPLC-Säule adaptiert (siehe Abbildung 3-2).

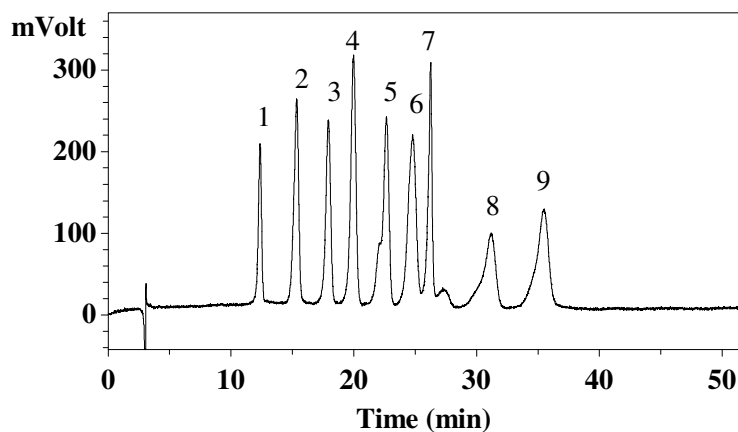


Abbildung 3-2 Chromatogramm eines Referenzgemisches aller acht Tocopherole und Tocotrienole, sowie Tocol; HPLC-Trennung auf der semipräparativen Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 =  $\alpha$ -Tocopherol 1,33 mg/L (RT 12,37 min); 2 =  $\alpha$ -Tocotrienol 2,73 mg/L (RT 15,35 min); 3 =  $\beta$ -Tocopherol 1,57 mg/L (RT 17,92 min); 4 =  $\gamma$ -Tocopherol 1,85 mg/L (RT 19,98 min); 5 =  $\beta$ -Tocotrienol 2,13 mg/L (RT 22,64 min); 6 =  $\gamma$ -Tocotrienol 2,24 mg/L (RT 24,80 min); 7 =  $\delta$ -Tocopherol 1,97 mg/L (RT 26,27 min); 8 = Tocol 1,75 mg/L (RT 31,19 min); 9 =  $\delta$ -Tocotrienol 2,15 mg/L (RT 35,49 min)

Konings et al. [kon 96] diskutierten Chromatogramme, die nach der Methode von Balz et al. [bal 92, bal 93] aufgenommen wurden und postulierten, daß am  $\beta$ - und  $\delta$ -Tocotrienol-Peak Schultern durch

*cis*-Isomere hervorgerufen werden. Bei dem hier verwendeten semipräparativen HPLC-System ist ebenfalls eine Schulter bei  $\beta$ -Tocotrienol zu beobachten, während bei der analytischen HPLC-Methode (siehe Abbildung 3-1) sich der entsprechende Peak eher symmetrisch darstellt. Eine Erklärung hierfür ist die kürzere Säulenlänge (insgesamt 254 mm) im Vergleich zur semipräparativen Anordnung (280 mm), während Konings et al. zwei kombinierte Säulen mit einer Gesamtlänge von 350 mm verwendeten.

## 3.2 HPLC-Trennung von *cis/trans*-Tocotrienolen

### 3.2.1 Zielsetzung

Es sollen Methoden entwickelt werden, die den Nachweis von *cis/trans*-Tocotrienol-Isomeren in synthetischen Präparaten und komplexen Matrices ermöglichen. Dazu kommen mehrere Trennmöglichkeiten in Frage, wie die HPLC-Trennung an einer RP18-Phase, einer Cyclodextrin oder Silberionen-Phase und nicht zuletzt auch einer Carbamatderivat-Phase, die zudem auch die Trennung der RS-Enantiomere erlaubt (siehe 3.8). Die Methoden sollen sich sowohl für die Analytik von Tocotrienol-Referenzsubstanzen eignen als auch sich bei der Untersuchung reeller Proben bewähren.

### 3.2.2 Analytische Trennung mit einer RP18-Phase (Multimethode)

#### 3.2.2.1 Vorüberlegung

Durch die gravierenden geometrischen Unterschiede in den Seitenketten von Tocotrienol-Isomeren kann auch auf konventionellen RP-Phasen eine Auftrennung von Tocotrienolen in *cis/trans*-Isomere erreicht werden. Obwohl die Isomere nicht in ihrer Polarität differieren, kommt es durch die sterische Beeinflussung der Seitenkette doch zu einer unterschiedlichen Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase, was wiederum unterschiedliche Retardierung bewirkt.

#### 3.2.2.2 Trennerfolg

Tocotrienole zeigen mit Gradientenelution (Wasser, Methanol, TEAOH, Citronensäure) auf einer RP18-Phase jeweils eine Auftrennung in zwei Peaks von *cis/trans*-Isomeren<sup>4</sup>. Die Methode ist darüber hinaus durch amperometrische Detektion (+0,800 V vs. Ag/AgCl) geeignet, Tocopherole und Tocotrienole gleichzeitig neben mehreren Antioxidantien chromatographisch zu trennen und quantitativ zu bestimmen. Dabei koeluiert jedoch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Homologe der Tocopherole und teilweise auch der Tocotrienole. Sowohl die antioxidativ wirksamen Substanzen p-Cymen-2,3-diol und Carvacrol aus Thymianextrakt, wie auch Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt sind gleichzeitig neben klassischen Antioxidationsmitteln wie BHA, Ascorbylpalmitat und Gallussäurelaurylester zu bestimmen. Unter gleichzeitiger Verwendung eines UV-Detektors ( $\lambda = 280$  nm) erhöht sich die Zahl zu detektierender Antioxidantien nochmals um zwei (Thymol und BHT). Thymol, das mit Carvacrol koeluiert, kann so störungsfrei nachgewiesen werden, da Carvacrol bei 280 nm praktisch keine Absorption zeigt. BHT dagegen ist unter den gewählten Bedingungen nur im UV-Detektor sichtbar, da es ein höheres Halbstufenpotential von +1,000 V (vs. Ag/AgCl) hat.

---

<sup>4</sup> Daß es sich bei den zwei Substanzen, in die sich jedes Tocotrienol trennt, um Seitenkettenisomere handelt, wird hier schon im Vorgriff auf die später beschriebene spektroskopische Untersuchung (siehe 3.3) festgestellt.



Für eine bessere Übersicht wird die Trennung aller Antioxidantien in zwei Chromatogrammen (Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4) statt in einem gezeigt und auch das simultan aufgenommene Chromatogramm mit UV-Detektion (siehe Abbildung 3-5) abgebildet.

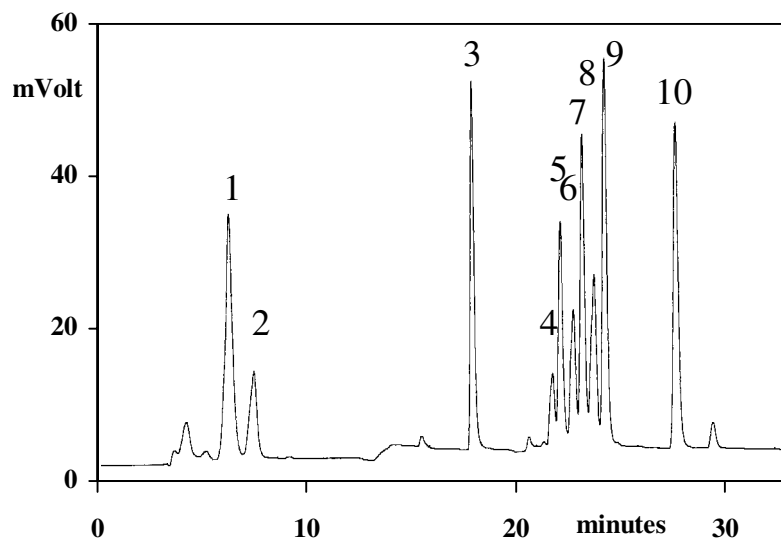


Abbildung 3-3 HPLC-Trennung von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Tocotrienol neben weiteren Antioxidantien auf der RP18-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,800 V vs. Ag/AgCl) (Multimethode).

1 = p-Cymen-2,3-diol (aus 14,91 mg Thymianextrakt/L, RT 6,16 min), 2 = Thymol koelueirend mit Carvacrol (aus 14,91 mg Thymianextrakt/L, RT 7,33 min), 3 = Ascorbylpalmitat (1,98 mg/L, RT 17,8 mg/L), 4 und 5 =  $\delta$ -Tocotrienol (0,82 mg/L, RT 20,35 und 22,00 min), 6 und 7 =  $\beta$ -Tocotrienol (0,99 mg/L, RT 22,76 und 23,06 min), 8 und 9 =  $\alpha$ -Tocotrienol (1,22 mg/L, RT 23,60 und 24,06 min) und 10 =  $\gamma$ -Tocopherol (0,79 mg/L, RT 27,46 min).

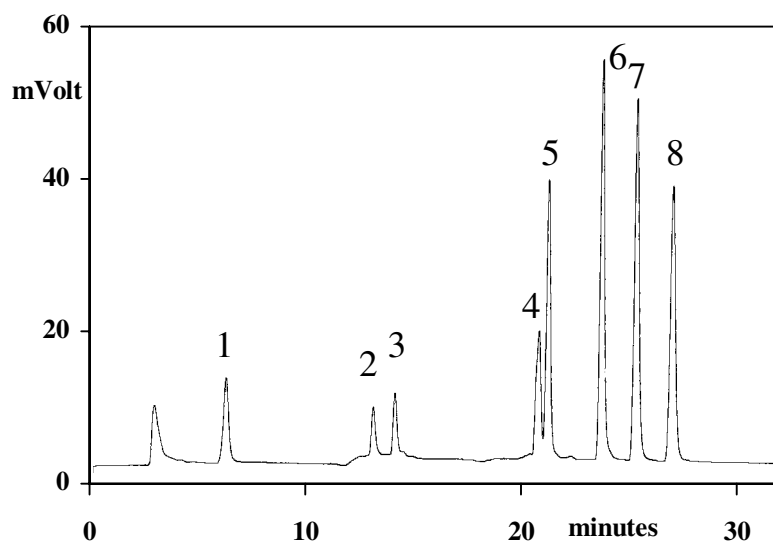


Abbildung 3-4 HPLC-Trennung von  $\gamma$ -Tocotrienol neben weiteren Antioxidantien auf der RP18-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,800 V vs. Ag/AgCl) (Multimethode).

1 = BHA (0,10 mg/L, RT 6,85 min), 2 = Carnosolsäure (aus 2,06 mg/L Rosmarinextrakt, RT 14,49 min), 3 = Gallussäure-laurylester (0,11 mg/L, RT 15,55 min), 4 und 5 =  $\gamma$ -Tocotrienol (1,20 mg/L, RT 22,95 und 23,42 min), 6 =  $\delta$ -Tocopherol (1,43 mg/L, RT 26,22 min), 7 =  $\beta$ -Tocopherol (1,24 mg/L, RT 27,95 min) und 8 =  $\alpha$ -Tocopherol (1,07 mg/L, RT 29,82 min)

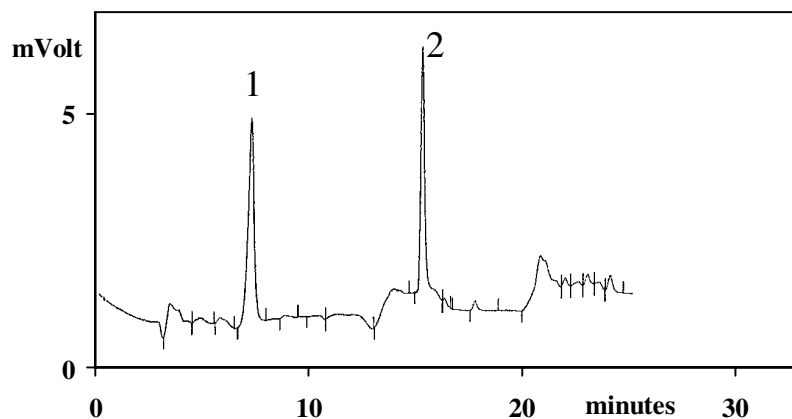


Abbildung 3-5 HPLC-Trennung von Thymol und BHT auf der RP18-Phase mit UV-Detektion (Multimethode).

1 = Thymol (aus 14,91 mg Thymianextrakt/L, RT 7,10 min), 2 = BHT (3,95 mg/L, RT 15,06 min); (gleichzeitig zu Abbildung 3-3) durch vorgeschalteten UV-Detektor ( $\lambda = 280$  nm) aufgenommen)

Diese Methode verschafft in nur einem Analysengang einen Überblick, welche der oben genannten Antioxidantien in einer Probe vorkommen und ob die Tocotrienole als *cis/trans*-Isomere vorliegen und damit synthetischen Ursprungs sind.

Am Beispiel von gekochten Mettbällchen, denen vor der Zubereitung ein Gemisch der angegebenen Antioxidantien zudosiert wurde, konnte nachgewiesen werden, daß sich diese Methode auch in der Praxis bewährt. Die Probenaufarbeitung beinhaltet eine Festphasenextraktion und sorgt dafür, daß keine Matrixeffekte die Chromatographie stören.

### 3.2.3 Analytische Trennung mit einer RP18-Phase (Schwerpunkt *cis/trans*-Isomere)

Ein Gradient, dessen Methanolanteil im Vergleich zur Multimethode langsamer anstieg, verbessert die Auftrennung der *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere (siehe Abbildung 3-6). Bereits zehn der insgesamt 16 Seitenkettenisomeren lassen sich in einem Lauf trennen. Die Trennung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol erweist sich nach wie vor als nicht realisierbar. Die Verbesserung gegenüber der Multimethode besteht jedoch darin, daß bei  $\delta$ -Tocotrienol alle vier Seitenkettenisomere erkennbar sind und bei  $\alpha$ -Tocotrienol das vierte Isomer bereits in einer Schulter am letzten Peak sichtbar wird. Die spezifischere Fluoreszenz-Detektion ( $\lambda_{Em.} = 330$  nm,  $\lambda_{Anr.} = 280$  nm) wurde hier der amperometrischen vorgezogen, da nicht die Erfassung von vielen antioxidativ wirksamen Substanzen intendiert wurde.

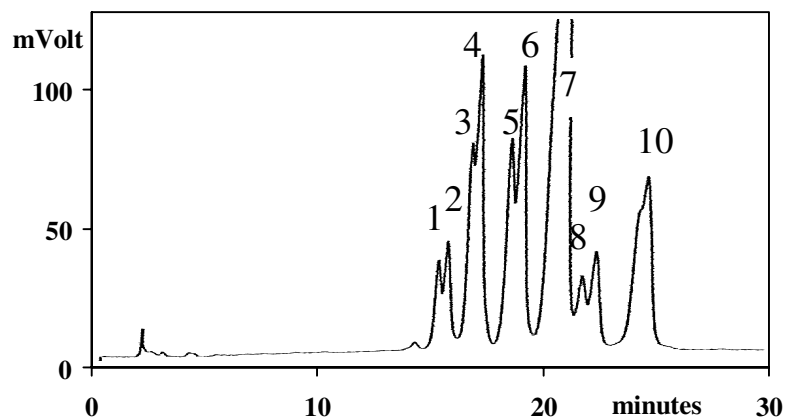


Abbildung 3-6 HPLC-Trennung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol auf der RP18-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 - 4 =  $\delta$ -Tocotrienol (2,0 mg/L, RT 14,98, 15,36, 16,36 und 16,68 min), 5 - 7 =  $\gamma$ - und  $\beta$ -Tocotrienol (jeweils 2,4 mg/L, RT 18,08, 18,55 und 20,16 min) und 8 - 10 =  $\alpha$ -Tocotrienol (3,8 mg/L, RT 21,25, 21,82 und 24,00 min).

### 3.2.4 Präparative Trennung mit einer RP18-Phase

Mit Hilfe der präparativen Trennung können Tocotrienole in jeweils zwei Fraktionen von *cis/trans*-Isomeren getrennt werden, wobei UV-Detektion ( $\lambda = 280$  nm) durch die verwendeten hohen Tocotrienol-Konzentrationen in der Probelösung ausreichend ist. Bei der ersten Fraktion des  $\alpha$ -Tocotrienols ist sogar durch die Kopplung von zwei Säulen (Länge insgesamt 500 mm) eine Antrennung in zwei Isomere zu erkennen. Die massenspektrometrische Untersuchung der beiden isolierten Fraktionen von  $\alpha$ -Tocotrienol zeigte identische Spektren und weist darauf hin, daß es sich bei der HPLC-Aufspaltung nicht um eine Trennung verschiedenartiger Substanzen handelt, wie in 3.3.2 ausgeführt ist. Vor der massenspektrometrischen Untersuchung der eingegangenen Fraktionen müssen die Eluentensalze durch Festphasenextraktion entfernt werden.

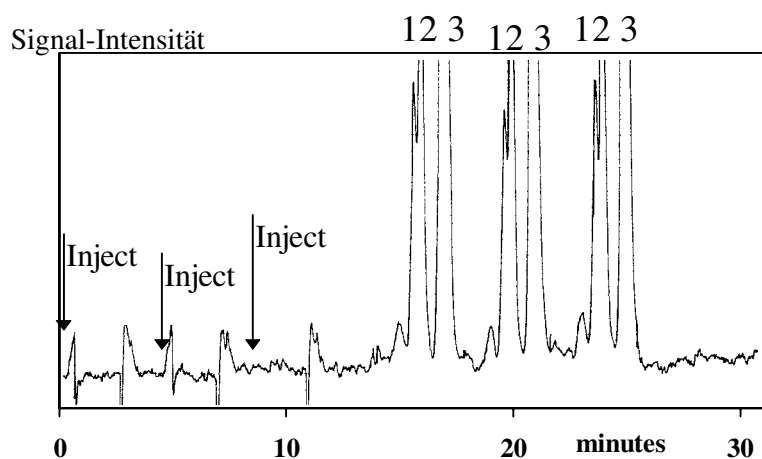


Abbildung 3-7 HPLC-Trennung von  $\alpha$ -Tocotrienol auf der präparativen RP18-Phase mit UV-Detektion ( $\lambda = 280$  nm).

Die Lösung (ca 500 mg/L) wurde in Abständen von ca. 4 min dreimal eingespritzt. 1 = RT 16,20 min und 2 = 16,56 min (zusammen Fraktion 1) und 3 = 17,60 min (Fraktion 2)

### 3.2.5 Analytische Trennung mit einer Silberionen-Phase

#### 3.2.5.1 Vorüberlegung

Silberionen-Phasen sind aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften geradezu prädestiniert für die Trennung lipophiler *cis/trans*-Isomere (siehe 1.5). Erfolgreich wird diese Art der Analytik schon

lange für die Fraktionierung (derivatisierter) Fettsäuren angewendet. Mit einem isokratischen-Hexan/Acetonitril-Eluenten gelang beispielsweise die Trennung von 15 der 16 Arachidonsäure-Isomere [adl 94]. Üblicherweise werden Fettsäuren vor der HPLC-Trennung in ihre Ester überführt. Die dabei notwendigen umständlichen Aufreinigungsschritte, wie eine präparative Dünnschichtchromatographie der Derivatisierungsprodukte, sind jedoch als Nachteil zu nennen [mom 98].

### 3.2.5.2 Trennerfolg

Die folgende Abbildung demonstriert die HPLC-Trennung von 13 der möglichen 16 Seitenkettenisomeren eines Referenzgemisches aus underivatisiertem  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol. Bei dieser Methode wurde ein n-Hexan/Acetonitril-Gradient (0,45 % - 1,5 % Acetonitril in n-Hexan) und Fluoreszenz-Detektion ( $\lambda_{Em.} = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Anr.} = 295 \text{ nm}$ ) verwendet.

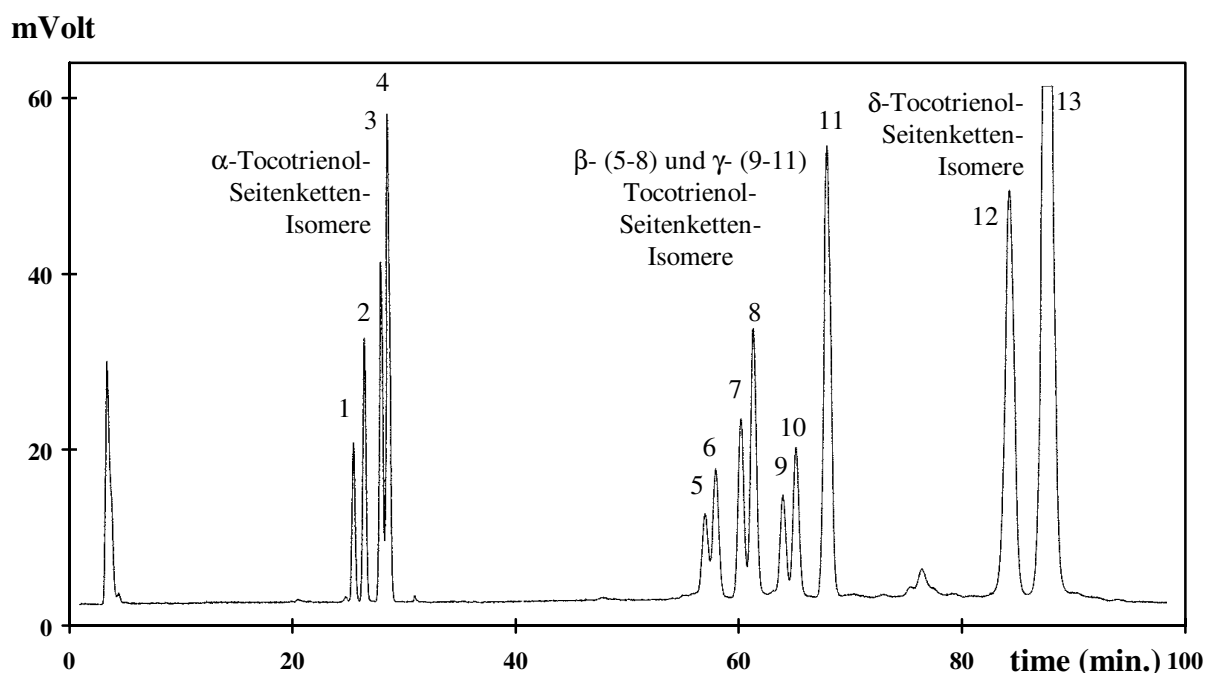


Abbildung 3-8 Trennung der Seitenkettenisomere von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol auf der Silberionen-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = RT 25,04 min, 2 = RT 26,01 min, 3 = RT 27,54 min, 4 = 28,20 min, 5 = 57,21 min, 6 = 58,20 min, 7 = 60,55 min, 8 = 61,68 min, 9 = 64,36 min, 10 = 65,54 min, 11 = 68,47 min, 12 = 85,16 min, 13 = 88,65 min; alle Tocotrienole ca. 12 mg/L.

Die Tocopherole sind mit dieser Methode ebenfalls von den Tocotrienolen abzutrennen (nicht abgebildet). Sie erscheinen, wie durch eine ergänzende Bestimmung mit einem Gemisch der acht Homologen ermittelt wurde, vor dem ersten Tocotrienol-Isomer ( $\alpha$ -Tocopherol, RT = 15 min), vor der

Gruppe der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocotrienole (vermutlich  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, RT = 35 - 47 min) und innerhalb dieser Gruppe zwischen Substanz 8 und 9 (vermutlich  $\delta$ -Tocopherol).

Daß die Tocopherole ebenfalls in bedeutendem Maße retardiert werden, läßt den Schluß zu, daß auch das Chromanolsystem Wechselwirkungen mit den Silberionen der stationären Phase eingeht. Für eine gleichzeitige Bestimmung von Tocopherolen neben den *cis/trans*-Isomeren der Tocotrienole ist diese Eigenschaft sehr vorteilhaft. Vielversprechend für eine weiter verbesserte Trennung der *Tocotrienol*-Isomere erscheint der Ansatz, durch eine geeignete Derivatisierung des Chromanol-OH die Wechselwirkung des Ringsystems mit den Silberionen zurückzudrängen und damit sowohl den Einfluß als auch die Beeinflußbarkeit der Seitenketten-Doppelbindungen zu erhöhen. So könnte ein Gradientensystem entwickelt werden, das bei niedrigen Acetonitril-Anteilen die vollständige Isomerentrennung der Tocotrienole verwirklicht und bei höheren Gehalten andere stark retardierende Matrix-Begleitsubstanzen eluiert.

### 3.2.5.3 Einfluß des Acetonitril-Anteils im Eluenten auf den Trennerfolg

Die genaue Rolle von Acetonitril als Eluent in der Silberionenchromatographie wurde noch nicht bestimmt, aber es wird vermutet, daß Acetonitril heftig mit den ungesättigten Analyten um die Bindungsstellen an den Silberionen konkurriert (Acetonitril ist ein gutes Lösungsmittel für Silbernitrat) [nik 96]. Mit niedrigerem Acetonitril-Anteil erhöhen sich dementsprechend die Retentionszeiten der Tocotrienol-Isomere. Bei isokratischer Elution mit 1 % Acetonitril in n-Hexan weisen die Vitamere (je ca. 20 mg/L) folgende Retentionszeiten bei zunehmender Peakbreite auf:

$\alpha$ -Tocotrienol:	15 - 18 min	(drei basisliniengetrennte Peaks, wovon der letzte eine geringe Antrennung in zwei Isomere zeigt (ähnlich Abbildung 3-8))
$\beta$ -Tocotrienol	40 - 52 min	(vier basisliniengetrennte Isomere)
$\gamma$ -Tocotrienol	52 - 69 min	(vier getrennte Isomere, wovon die letzten beiden nur fast basisliniengetrennt eluieren)
$\delta$ -Tocotrienol	86 - 115 min	(vier basisliniengetrennte, aber breite Peaks (bis zu 2 min Peakbreite auf halber Peakhöhe))

Gegenüber der eben skizzierten isokratischen Elution ergibt sich mit der Gradienten-Methode der Vorteil, daß das physiologisch relevantere  $\alpha$ -Tocotrienol fast basisliniengetrennt in seine vier Seitenkettenisomere getrennt werden kann. Die komplette Auftrennung der  $\delta$ -Tocotrienol-Isomere durch isokratische Elution wurde dafür, auch zugunsten einer um ca. 25 min kürzeren Analysenzeit, zurückgestellt.

## 3.2.6 HPLC-Trennung mit einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase

### 3.2.6.1 Vorüberlegung

Eine wichtiges Kriterium für die Wahl der geeigneten Cyclodextrin-Phase ist, daß das zu trennende Molekül optimal in den Cyclodextrin-Käfig paßt, wobei sowohl Größe als auch Form des Analyten

eine Rolle spielen. Eine  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase eignet sich besonders gut für die Trennung substituierter Phenyl-, Naphthyl- und Biphenylringe, wobei die *Breitseite* des Bicyklus Naphthalen beispielsweise noch von dem Cyclodextrin-Hohlkegelstumpf aufgenommen werden kann [ict 96]. Befindet sich das chirale Zentrum solcher Moleküle nahe am lipophilen Ringsystem, können sich in idealer Weise Wechselwirkungen mit den (derivatisierten) Hydroxylgruppen an der Öffnung des Hohlkegelstumpfes ausbilden und so eine Racemattrennung bewirken. Übertragen auf die Tocotrienole bedeutet das, daß sie durch ihr Chromanolsystem bezüglich Molekülgröße und -form ebenfalls als Analyten in Frage kommen, daß aber auch die geometrische Konfiguration der Tocotrienol-Seitenkette das Eindringen in den Cyclodextrin-Käfig beeinflussen kann. Wie die räumliche Animation (siehe Abbildung 1-4) verdeutlicht, könnte durch die stark geknickte Seitenkette des *cis-cis- $\alpha$ -Tocotrienols* die Wechselwirkung des Chromanolrings mit dem Hohlkegelstumpf deutlich verringert werden, da durch die sterische Hinderung das Ringsystem weniger tief eintauchen kann. Daraus sind kürzere Retentionszeiten für das *cis-cis*-Isomer vorherzusagen, was durch die spektroskopische Charakterisierung der eluierenden Substanzen auch nachgewiesen werden konnte (siehe 3.3).

### 3.2.6.2 Trennerfolg

Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 3-9 bis Abbildung 3-12) zeigen die analytische HPLC-Trennung der *cis/trans*-Seitenkettenisomere von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol auf einer chiralen permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase (zwei in Reihe geschaltete Säulen mit einer Länge von insgesamt 400 mm) mit Fluoreszenz-Detektion ( $\lambda_{\text{Em.}} = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Anr.}} = 295 \text{ nm}$ ) [dro 98]. Wie in Abschnitt 3.3 ausgeführt, wurde die Elutionsreihenfolge der Isomere am Beispiel von  $\alpha$ -Tocotrienol folgendermaßen bestimmt: *cis-cis*- als zuerst eluierendes Isomer, *cis-trans*- und *trans-cis*- als zweites und drittes, wobei die Reihenfolge der beiden letzteren nicht bestimmt ist, und *trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol* als zuletzt eluierendes Isomer. Prinzipiell ist die Trennung der *cis/trans*-Isomere in der halben Analysenzeit auch mit nur *einer* permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin Säule (200 mm) möglich, jedoch wird bei den beiden jeweils zuletzt eluierenden Tocotrienol-Isomeren keine Basislinientrennung erreicht.

Die Chromatogramme für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tocotrienol zeigen bei den am längsten retardierten *trans-trans*-Isomeren eine Antrennung in zwei Peaks. Hierbei handelt es sich vermutlich um die Aufspaltung in die R- und S- Enantiomere der *trans-trans*-Isomere.

Eine befriedigende Trennung der Racemate ist nach den durchgeführten Untersuchungen nicht zu erreichen. Das kann dadurch erklärt werden, daß der sterische Einfluß der unterschiedlich konfigurierten Tocotrienol-Seitenketten den Effekt einer Wechselwirkung an C2 mit dem chiralen Selektor zurückdrängt. Außerdem sollte in Erwägung gezogen werden, daß auch der lipophile

Phtylrest der Tocotrienole entsprechend seiner Konfiguration in den Cyclodextrinkäfig (siehe Abbildung 1-7) eindringen und so die Retention bestimmen kann.

Durch die eng beieinander liegenden Retentionszeiten läßt sich ein Gemisch von allen *cis/trans*-Tocotrienol-Isomeren nicht befriedigend trennen. Liegen nur die natürlichen *trans-trans*-Tocotrienol-Isomere nebeneinander vor, können die Vitamere in der Elutionsreihenfolge  $\delta$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocotrienol separiert werden.

Die abgebildeten Chromatogramme wurden mit neuen Säulen aufgenommen. Mit fortdauerndem Gebrauch kommt es naturgemäß zu einer nachlassenden Trennleistung, was sich in verbreiterten Peaks, verminderter Trennstufenzahl und verkürzter Retentionszeit ausdrückt. Da unter den angegebenen Bedingungen die Säulenordnung einen relativ hohen Rückdruck von ca. 19 MPa verursacht, kann diese Belastung zu einer zunehmenden Zerstörung der molekularen Trennkegel der stationären Phase führen und so die Trennleistung mit fortschreitender Betriebsdauer vermindern.

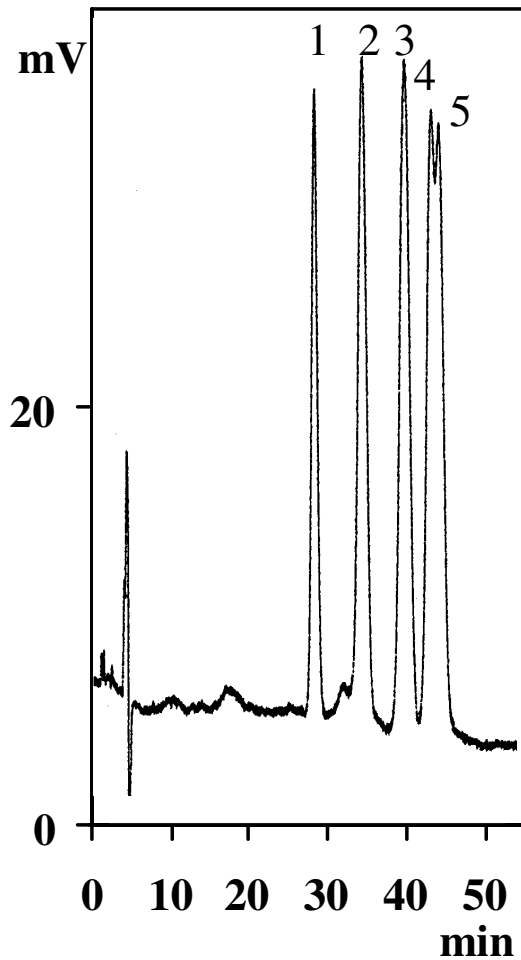


Abbildung 3-9  $\alpha$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der cis/trans-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\alpha$ -Tocotrienol 20 mg/L 1 = RT 28,35 min, 2 = RT 31,48 min, 3 = RT 39,85 min, 4 = RT 43,31 min, 5 = 44,28 min (Injektionsvolumen abweichend zu 4.3.4.2 10  $\mu$ L)

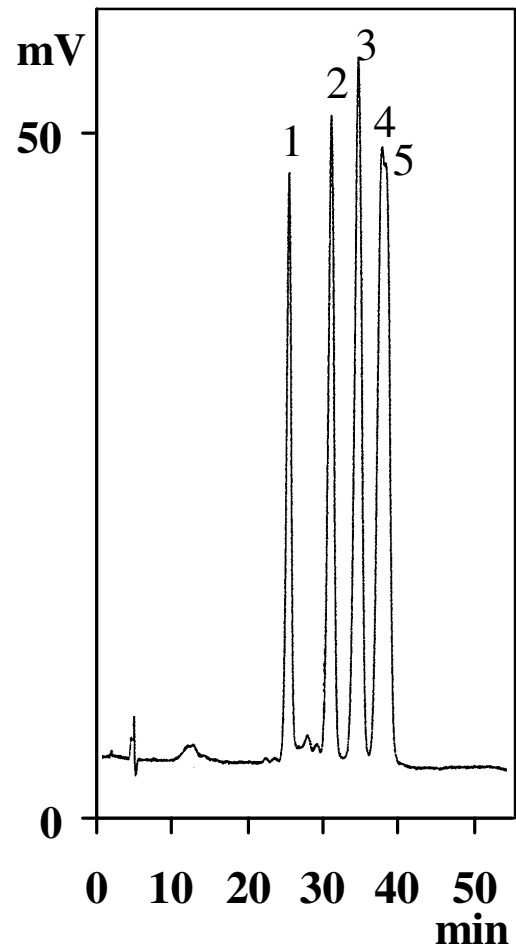


Abbildung 3-10  $\beta$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der cis/trans-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\beta$ -Tocotrienol 20 mg/L 1 = RT 25,04 min, 2 = RT 30,70 min, 3 = RT 34,34 min, 4 = RT 37,52 min, 5 = 38,29 min (Injektionsvolumen abweichend zu 4.3.4.2 10  $\mu$ L)



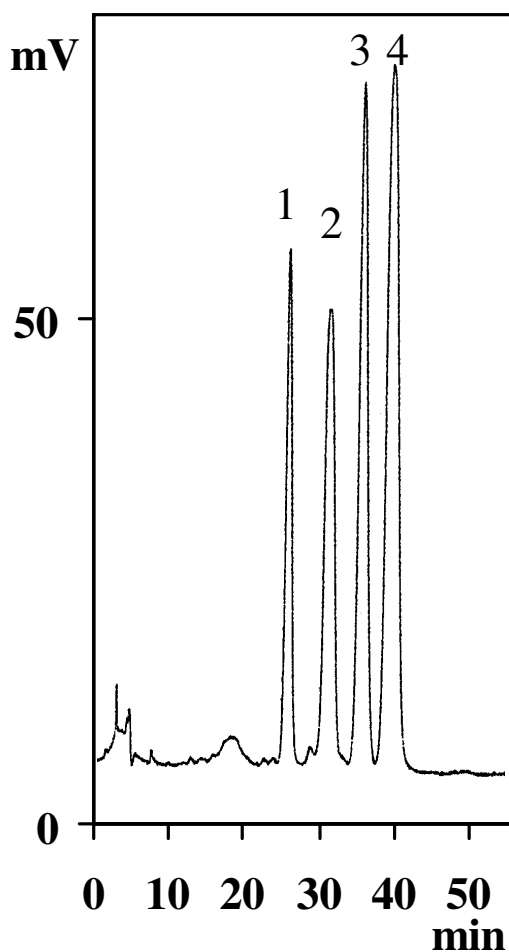


Abbildung 3-11  $\gamma$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der *cis/trans*-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\gamma$ -Tocotrienol 20 mg/L 1 = RT 25,18 min, 2 = RT 30,96 min, 3 = RT 35,31 min, 4 = RT 39,28 min (Injektionsvolumen abweichend zu 4.3.4.2 10  $\mu$ L)

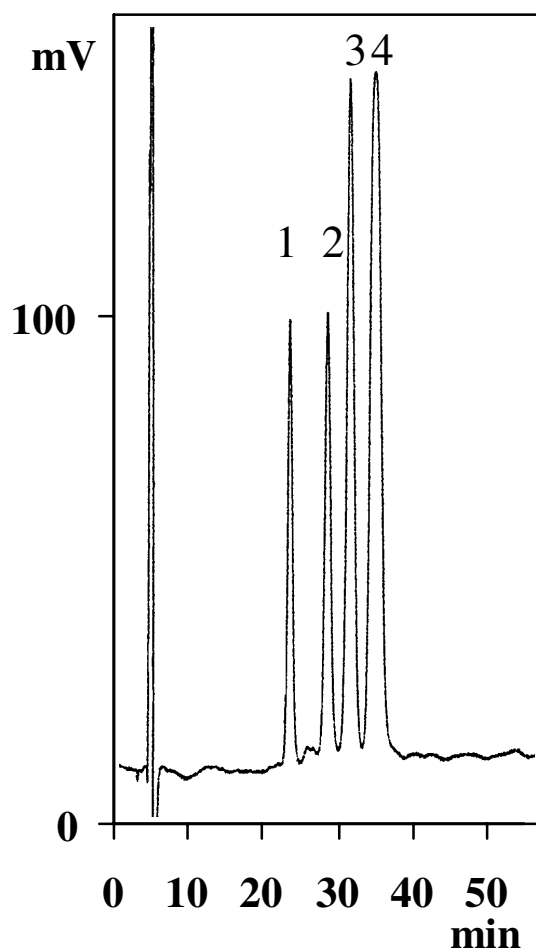


Abbildung 3-12  $\delta$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der *cis/trans*-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\delta$ -Tocotrienol 20 mg/L 1 = RT 22,36 min, 2 = RT 27,28 min, 3 = RT 30,26 min, 4 = RT 33,55 min (Injektionsvolumen abweichend zu 4.3.4.2 10  $\mu$ L)

### 3.2.6.3 Einfluß verschiedener Parameter auf die Trennung der *cis/trans*-Isomere

Im Zuge der Methodenentwicklung wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Trennung der *cis/trans*-Isomere an nur einer  $\beta$ -PM Cyclodextrin-Phase (Säulenlänge 200 mm) untersucht. Die Ergebnisse sollen stichpunktartig genannt werden:

**Acetonitril.** Mit abnehmendem Anteil von Acetonitril im Acetonitril/Wasser Eluenten erhöht sich die Retentionszeit und die Trennqualität der Isomere; mit der Zusammensetzung Acetonitril/Wasser (58:42, v/v) ist das Optimum erreicht.

**Methanol.** Wird Acetonitril im Eluenten gegen Methanol ausgetauscht, vermindert sich die Elutionskraft des Eluenten. So wird beispielsweise  $\alpha$ -Tocotrienol von einer mobilen Phase Methanol/Wasser (90:10, v/v) in drei Peaks aufgetrennt, während mit dem gleichen Anteil Acetonitril statt Methanol die Substanz nicht getrennt kurz nach dem Totvolumen eluiert. Trotzdem konnte mit einem Methanol/Wasser Eluenten keine komplette Trennung der Tocotrienol-Seitenkettenisomeren erreicht werden.

**Puffer.** Puffer sollen wie die Analyten in den Cyclodextrin-Käfig eingeschlossen werden können und so eine eluierende Wirkung besitzen [ict 96]. Beim Ersatz des Wasseranteils durch einen 20 mM TEAA-Puffer, wird die Trennleistung im pH-Bereich zwischen 6,9 und 3,0 nicht verbessert. Durch Erhöhung der Pufferkonzentration auf 0,1 M verlängern sich die Retentionszeiten sogar, ohne daß die Trennung davon profitiert. Mit 0,05 M TEANO<sub>3</sub>-Puffer ergibt sich kein wesentlich anderes Erscheinungsbild.

**Temperatur.** Eine auf 37 °C erhöhte Temperatur in Kombination mit erniedrigtem Acetonitril Anteil verbessert die Trennleistung im Vergleich zur Normaltemperatur nicht. Eine Erniedrigung der Temperatur auf 5 °C resultiert in einer Verlängerung der maximalen Retentionszeit um mehr als 1/3. Dabei nähern sich die beiden zuletzt eluierenden Peaks und zeigen gleichzeitig eine Antrennung in drei Substanzen. Zwar handelt es sich hierbei wahrscheinlich um eine Antrennung von RS-Enantiomeren, doch die langen Retentionszeiten und dementsprechend breiten Peaks lassen diese Alternative als nicht diskutabel erscheinen.

Als Optimum zur Trennung der *cis/trans*-Seitenkettenisomere hat sich daher eine denkbar einfache Methode erwiesen. Ein isokratisches Verfahren mit Acetonitril/Wasser-Eluenten (58:42, v/v), das nicht durch Puffersalze oder der Raumtemperatur abweichende Temperaturen kompliziert wird, konnte so etabliert werden.

### 3.2.7 Präparative Trennung mit einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase

Die Übertragung der analytischen Methode auf einen präparativen Maßstab ist mit nur wenigen Änderungen realisierbar. Es kommt dabei auf eine möglichst komplette Trennung der *cis/trans*-Isomere an, um bei einer Isolierung Fraktionen ohne gleichzeitig eluierende Nachbarsubstanzen zu erhalten.

Eine Säulenlänge von 250 mm (Durchmesser 10 mm) ist ausreichend, um die Seitenkettenisomere von  $\alpha$ -Tocotrienol praktisch basisliniengetrennt zu separieren (siehe Abbildung 3-13). Bei ca. 500  $\mu$ g der Referenzsubstanz pro Injektion ist die Säulenkapazität noch nicht überschritten.

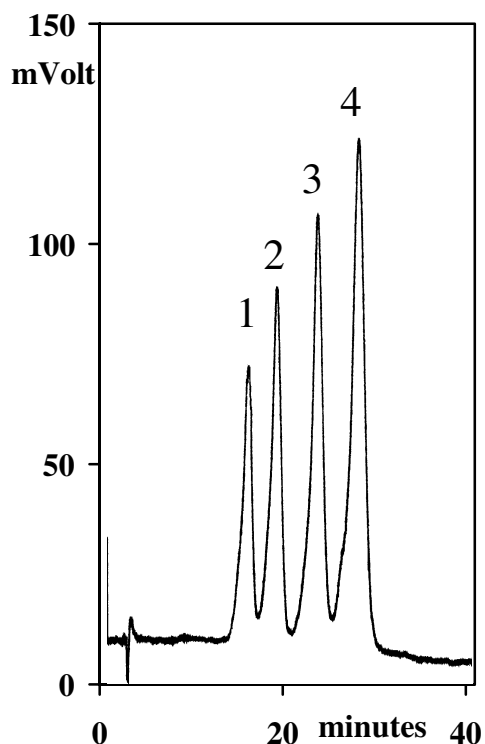


Abbildung 3-13 Präparative Trennung von  $\alpha$ -Tocotrienol auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit UV-Detektion.

$\alpha$ -Tocotrienol 2,0 g/L 1 = *cis-cis*- (RT 16,0 min); 2 = *cis/trans*- (RT 19,2 min); 3 = *cis/trans*- (RT 23,8 min); 4 = *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol (RT 28,4 min)

Die vier präparativ isolierten Fraktionen der  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere dienten für die spektroskopische Charakterisierung, so daß die Elutionsreihenfolge bestimmt werden konnte [dro 98]. Weiterhin wurden die Isolate nach der Derivatisierung zum Methylether dazu verwendet, die *cis/trans*-Isomere auf einem zweiten chiralen Säulensystem (Cellulosecarbamat-Phase) in ihre RS-Enantiomere zu trennen. Damit hat sich diese Methode als wichtiger Schritt zur kompletten Trennung der acht RS,*cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienole bewährt.

### 3.3 Spektroskopische Charakterisierung der *cis/trans*-Tocotrienole

#### 3.3.1 Zielsetzung

Eine Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden (MS,  $^1\text{H-NMR}$ , FTIR) soll die Konfiguration der  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere aufklären, so daß die Elutionsreihenfolge für die permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase bestimmt werden kann.

#### 3.3.2 Massenspektrometrie

Beide Fraktionen, die durch präparative HPLC auf der RP18-Phase (siehe 3.2.4) isoliert wurden, zeigen praktisch das gleiche EI-Massenspektrum mit dem intensiven Molekülionpeak  $\text{M}^+$  bei  $m/z$  424,2. Die Massenspektren sind charakteristisch für  $\alpha$ -Tocotrienol [may 67, gov 72]. Bei den beiden geschnittenen Fraktionen zeigen sowohl die Hauptfragmente bei  $m/z$  205,0 und 165,1 als auch die

weiteren Peaks im Massenspektrum das gleiche Fragmentierungsmuster. Damit ist gezeigt, daß es sich bei der einen Fraktion nicht um ein in der Molekülstruktur veränderndes Derivat oder Abbauprodukt der anderen handelt. Es können also geometrische Isomere oder Enantiomere vorliegen. Da eine RS-Trennung auf einer achiralen RP18-Phase nicht realisierbar ist, sprechen die Massenspektren für *cis/trans*-Isomere der  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkette. Bei der Masse  $m/z$  129,0, die in den Literatur-Massenspektren nicht vorkommt, handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um Tetraethylammonium, das durch die Festphasenextraktion nicht quantitativ eliminiert worden ist.

### 3.3.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektren

Abbildung 3-16 zeigt die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren von den verschiedenen Fraktionen, die durch präparative HPLC (permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase) aus  $\alpha$ -Tocotrienol isoliert und im folgenden als dessen Seitenkettenisomeren identifiziert wurden. Das Spektrum des zuletzt eluierenden Isomers, das auch durch Koinjektion in der HPLC als naturidentisches *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol identifiziert wurde (siehe **Abbildung 3-36**), stimmt mit dem Spektrum von natürlichem *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol überein [sch 63, may 67]. Vergleicht man die Intensitäten der Signale für die vinyllischen *trans*- $\text{CH}_3$ - ( $\delta = 1,58$  ppm) und *cis*- $\text{CH}_3$ -Gruppen ( $\delta = 1,68$  ppm) ergeben sich für die verschiedenen Isolate Unterschiede. *Trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol besitzt dabei den geringsten Anteil an der 1,68 ppm-Resonanz, die von einer endständigen  $\text{CH}_3$ -Gruppe (substituiert an C 13') hervorgerufen wird. Über den höchsten Anteil an Methylgruppen, die an *cis*-konfigurierten Doppelbindungen substituiert sind, verfügt die in der HPLC zuerst eluierende Fraktion. Sie wird dementsprechend zu *cis-cis*- $\alpha$ -Tocotrienol bestimmt. Für die beiden als mittlere eluierenden Substanzen ergibt sich ein Intensitätsverhältnis, das zwischen den beiden anderen liegt, so daß sie als die beiden möglichen *cis/trans*-Isomere erkannt wurden. Die absolute Elutionsreihenfolge der *cis-trans*- und *trans-cis*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere kann über die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren erwartungsgemäß nicht bestimmt werden.

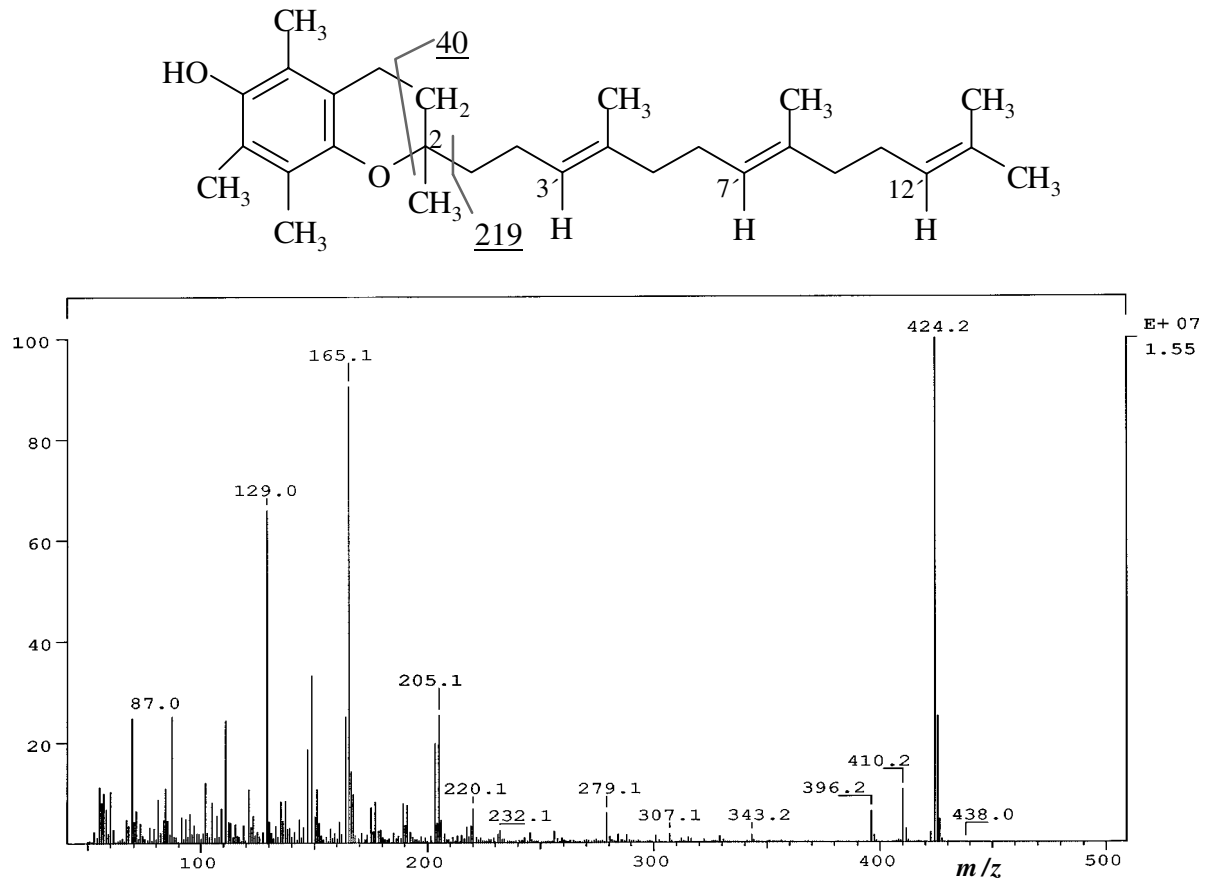


Abbildung 3-14 Massenspektrum der  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion 1, die durch präparative HPLC auf der RP18-Phase isoliert wurde; Molekülionpeak  $M^+$  bei  $m/z$  424,2 und den Hauptfragmenten bei  $m/z$  205,1 ( $M^+ - 219$ ) und bei  $m/z$  165,1 ( $M^+ - 219 - 40$ ).

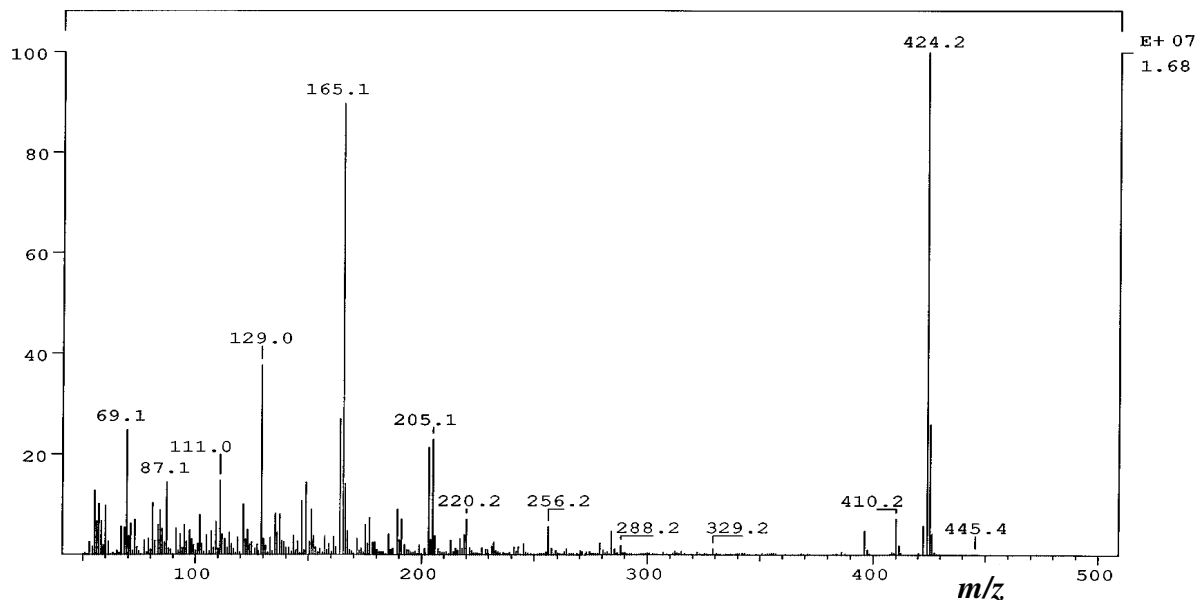


Abbildung 3-15 Massenspektrum der  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion 2, die durch präparative HPLC auf der RP18-Phase isoliert wurde; Molekülionpeak  $M^+$  bei  $m/z$  424,2 und den Hauptfragmenten bei  $m/z$  205,1 ( $M^+ - 219$ ) und bei  $m/z$  165,1 ( $M^+ - 219 - 40$ ).

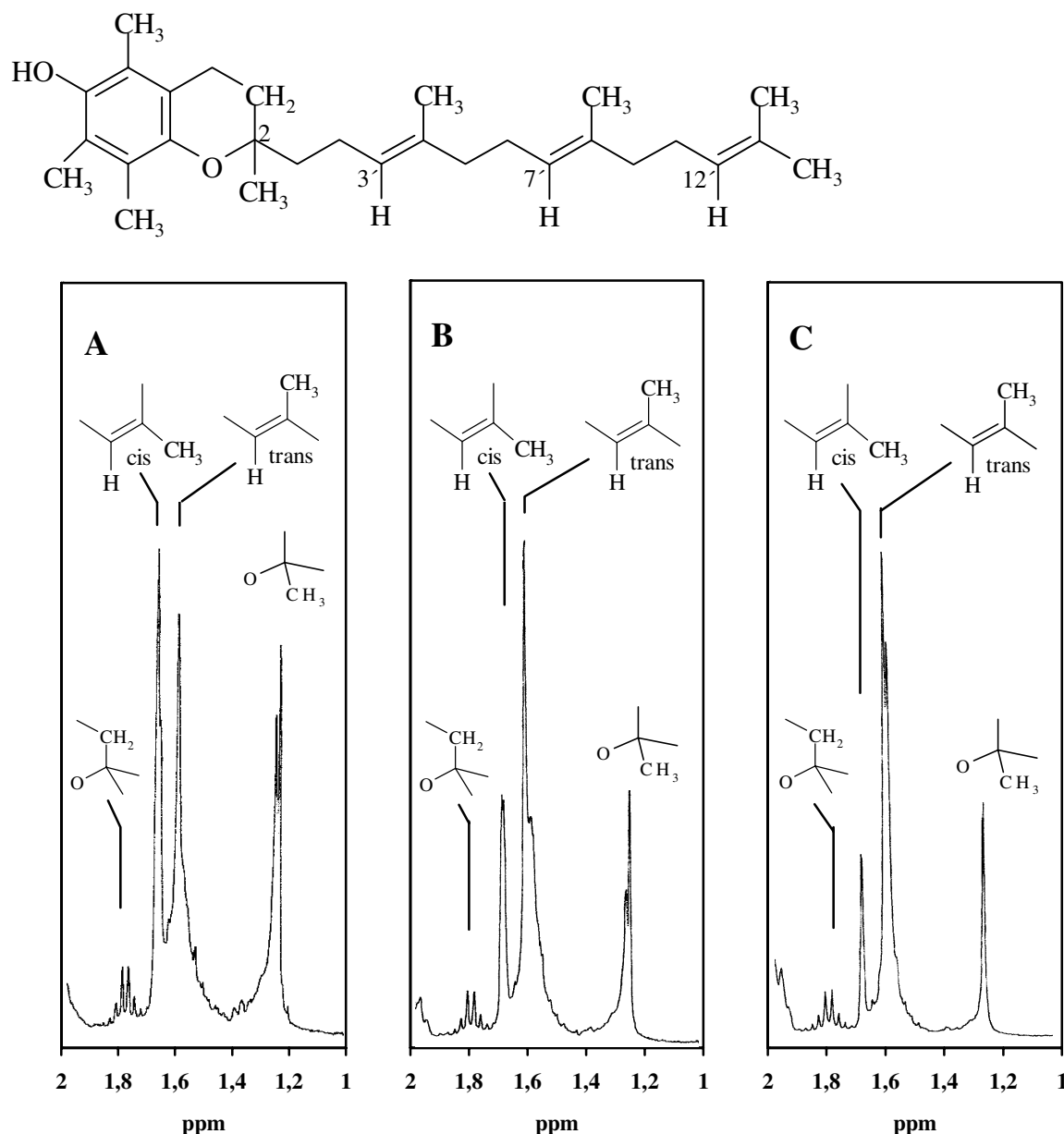


Abbildung 3-16 A-C Ausschnitte aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomeren, isoliert durch präparative HPLC auf der  $\beta$ -PM-Phase.

Die Konfiguration der Doppelbindungen in der Seitenkette ist aus den Resonanzen für die vinylicen  $\text{CH}_3$ -Gruppen abzulesen. Für Methylgruppen an *trans*-substituierte Doppelbindungen beträgt die chemische Verschiebung  $\delta = 1,58 \text{ ppm}$  und für *cis*-substituierte  $\delta = 1,68 \text{ ppm}$ <sup>a</sup>.

**A** Das in der präparativen HPLC zuerst eluierende Isomer: Es zeigt die größte Resonanz für vinyliche  $\text{CH}_3$ -Gruppen, die an einer *cis*-konfigurierten Doppelbindung substituiert sind.

**B** Das in der präparativen HPLC als zweites eluierende Isomer weist ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auf, das identisch ist mit dem des dritten Isomers (nicht abgebildet): Das Intensitätsverhältnis der Resonanzen von *trans*- zu *cis*-ständigen  $\text{CH}_3$ -Gruppen nimmt ab.

**C** Das zuletzt eluierende, naturidentische  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomer: Hier ist der größtmögliche Anteil der Resonanz erreicht, die von vinylicen  $\text{CH}_3$ -Gruppen an einer *trans*-konfigurierten Doppelbindung hervorgerufen wird.

<sup>a</sup>Chemische Verschiebungen in ppm, bezogen auf Tetramethylsilan (TMS = 0) als internem Standard.

### 3.3.4 FTIR

Die FTIR-Spektren zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Seitenkettenisomeren, die durch präparative HPLC (permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase) aus der synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Referenzsubstanz isoliert worden sind. Einige unauffällige Unterschiede können jedoch beobachtet werden, die dazu geeignet sind, die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten zu untermauern. Besonders der vierte Peak des  $\alpha$ -Tocotrienol-Vergleichs weist eine Absorption bei  $913\text{ cm}^{-1}$  auf, die auch von der *trans-trans*-Konfiguration des natürlichen  $\alpha$ -Tocotrienols hervorgerufen wird [sch 63]. Die drei anderen Isomere zeichnen sich im Vergleich zum *trans-trans*-Isomer durch eine stärker ausgeprägte Absorption bei  $926\text{ cm}^{-1}$  aus. Weiterhin kann festgestellt werden, daß im Spektrum des *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienols die  $=\text{C-H}$  „out of plane“-Deformationsschwingung bei  $857\text{ cm}^{-1}$  zugunsten einer anderen  $=\text{C-H}$ -Resonanz bei  $836\text{ cm}^{-1}$  abnimmt. Diese Resonanz gehört zu der zuerst eluierenden, als *cis-cis*-Isomer identifizierten, Substanz. Die FTIR-Spektren der in der HPLC als zweites und drittes eluierenden Komponenten sind identisch und besetzen bei den angesprochenen Resonanzen eine Mittelstellung zwischen den *cis-cis*- und *trans-trans*-Isomeren.

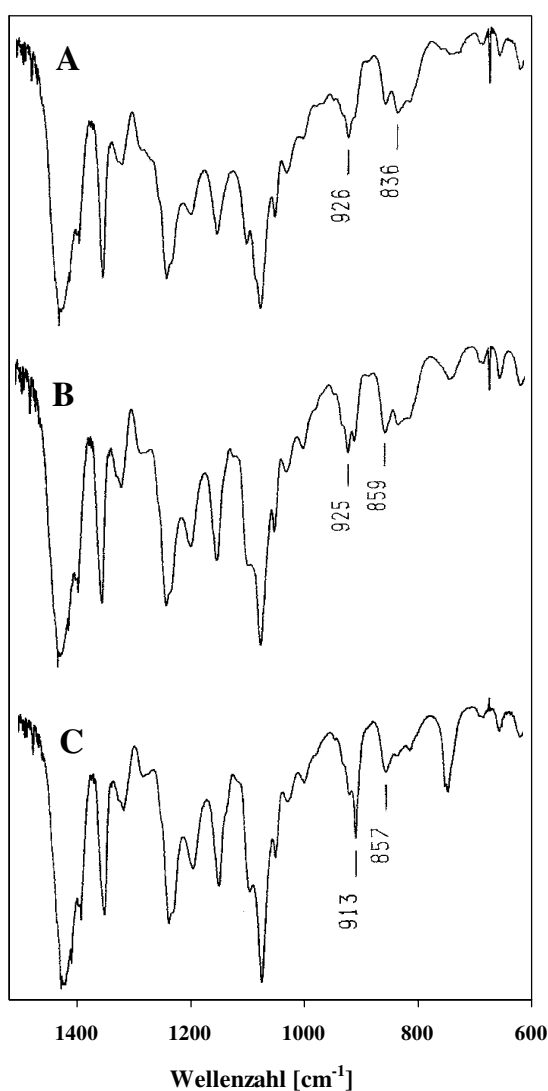


Abbildung 3-17 A-C Ausschnitte aus FTIR-Spektren von  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomeren, isoliert durch präparative HPLC.

**A** Das Spektrum der als erstes eluierenden Substanz korreliert mit den Ergebnissen aus der  $^1\text{H-NMR}$ -Messung und zeigt *cis-cis*- $\alpha$ -Tocotrienol.

**B** Das Spektrum des als zweites eluierenden Isomers gleicht dem des danach eluierenden (nicht abgebildet). Die Absorptionen bestätigen das Vorliegen von *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol.

**C** FTIR-Spektrum des in der HPLC am längsten retardierten Isomers. Die *trans-trans*-Konfiguration in der Seitenkette von  $\alpha$ -Tocotrienol wird durch die markierten Absorptionen bestätigt.

### 3.3.5 Bedeutung der Ergebnisse

Durch die spektroskopische Charakterisierung konnte gezeigt werden, daß es sich bei der HPLC-Trennung (permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase) eines kommerziellen  $\alpha$ -Tocotrienol-Präparats um eine Separierung der vier möglichen *cis/trans*-Seitenkettenisomere handelt [dro 98]. Die größte Bedeutung kommt dabei den  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen zu, da nur mit deren Hilfe konkrete Aussagen über die Konfiguration der isoprenoiden Seitenkette getroffen werden können, während MS- und FTIR-Spektren v. a. dazu dienen, die Molekülstruktur als Ganzes zu bestätigen.

Die Elutionsreihenfolge ist demnach wie folgt: *cis-cis- $\alpha$ -Tocotrienol* als zuerst eluierendes Isomer, *cis-trans-* und *trans-cis-* als zweites und drittes in unbestimmter Reihenfolge, gefolgt von *trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol* als am längsten retardiertes Seitenkettenisomer.

## 3.4 Bioverfügbarkeit von *cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomeren im Modell „Futter-Huhn-Ei“*

### 3.4.1 Zielsetzung

Die in Abschnitt 3.2.6 beschriebene HPLC-Methode mit der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase soll dazu verwendet werden, die Bioverfügbarkeit von *cis/trans*-Tocotrienol-Isomeren zu verfolgen. Legehennen wird mit synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol supplementiertes Futter verabreicht, das infolge einer nicht stereoselektiven Tocotrienol-Synthese Seitenkettenisomere enthält. Nach der Aufnahme der  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere in den Blutkreislauf werden die Substanzen bei der Eibildung in die Follikel eingelagert und verlassen den Organismus mit der Eiablage. Das Muster der lipophilen Tocotrienol-Isomere im Eigelb soll so Aufschluß über deren relative Bioverfügbarkeit am Beispiel des Huhns geben. In Verbindung mit der Verseifung der Triglyceridanteile und einer weiteren Probenaufreinigung durch semipräparative HPLC sollen so komplexe Matrices untersucht und charakterisiert werden können.

### 3.4.2 Erfolg

Für die Untersuchungen wurden Legehennen gewählt, deren Futter mit einem kommerziellen, synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Präparat supplementiert wurde. Das Präparat lag als ein Gemisch der vier verschiedenen Seitenkettenisomere vor.  $\alpha$ -Tocotrienol als Futterzusatz wurde gewählt, da dieses Vitamer im Vergleich zu den anderen Tocotrienolen die höchste Vitamin-E-Aktivität aufweist [gaß 95]. Während der Fütterungsperiode wurde mit einer analytischen HPLC-Methode (Diol-Phase) der lineare Anstieg des  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalts im Eigelb verfolgt, bis etwa ab dem achten bis zehnten Fütterungstag ein Sättigungswert auf dem dreifachen Niveau des Ausgangsgehaltes erreicht war



(siehe Abbildung 3-18). Die Abhängigkeit des  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalts im Ei von der Fütterungsdauer wurde ermittelt, indem der Gehalt an anderen Vitaminen im Ei als konstant betrachtet wurde und der Quotient aus der Peakfläche von  $\alpha$ -Tocotrienol und der Peakfläche von  $\beta$ -Tocotrienol als „innerer Standard“ aufgetragen wurde.

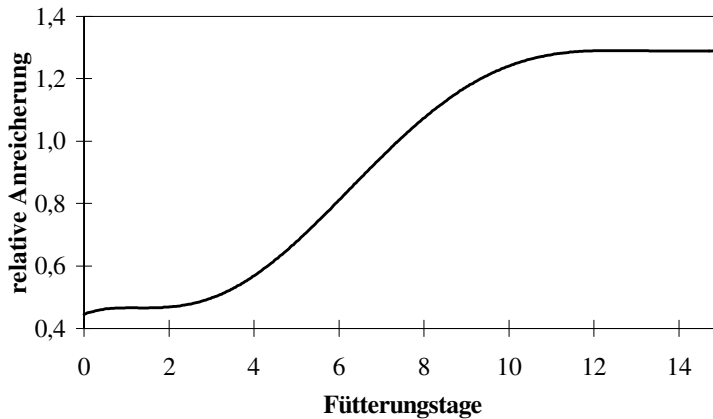


Abbildung 3-18 Relative Zunahme [ $\alpha$ -T<sub>3</sub>/ $\beta$ -T<sub>3</sub>] des  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalts im Eigelb in Abhängigkeit der Fütterungstage mit supplementiertem Futter.

Die Zunahme ist relativ zum jeweiligen  $\beta$ -Tocotrienol-Gehalt angegeben.

Diese Beobachtung ist vereinbar mit den Ergebnissen, die von Ternes et al. [Ter 95] und Qi und Sim [Qis 98] beschrieben wurden. Beide Arbeitsgruppen untersuchten die Anreicherung von verschiedenen Tocopherolen im Eigelb in Abhängigkeit der Fütterungsperiode, wobei Ternes et al. ihre Ergebnisse für Granula und Plasma des Eigelbs konkretisierten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Muster der  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere aus Eiern, die von  $\alpha$ -tocotrienol-supplementierten Hühnern stammen, mit den Eiern einer Kontrollgruppe, deren Futter keinen Zusatz von synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol enthielt, verglichen. Die Eier der Kontrollgruppe wiesen nach der Probenaufarbeitung und der HPLC-Bestimmung mit der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase keine *trans-cis*-, *cis-trans*- und *cis-cis*-Isomere, sondern nur das natürlich vorkommende *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomer auf. Abbildung 3-20 zeigt die  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion aus einem Ei, das 14 Tage nach dem Fütterungsbeginn mit synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol gelegt wurde. Ein Vergleich mit Abbildung 3-19 zeigt, daß alle vier  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere im Eigelb nachweisbar sind. Das heißt, daß neben dem auch natürlich vorkommenden *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomer ebenso die *trans-cis*-, *cis-trans*- und *cis-cis*-Isomere aus dem Futter aufgenommen und über die Blutbahn ins Ei eingelagert wurden. Die Bioverfügbarkeit aller Isomere konnte damit demonstriert werden.

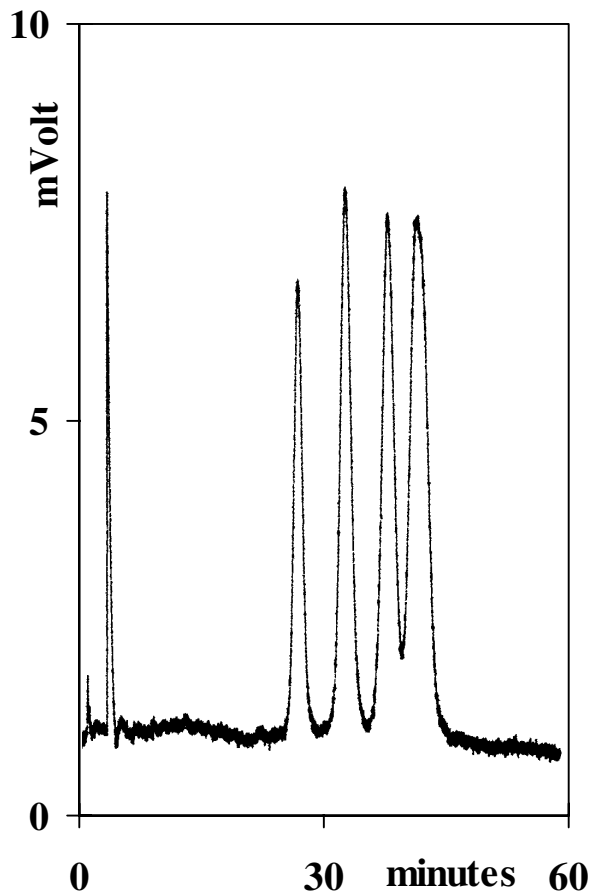


Abbildung 3-19 Die vier Seitenkettenisomere von synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol (20 mg/L) mit *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol als zuletzt eluierendem Isomer; HPLC-Trennung auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

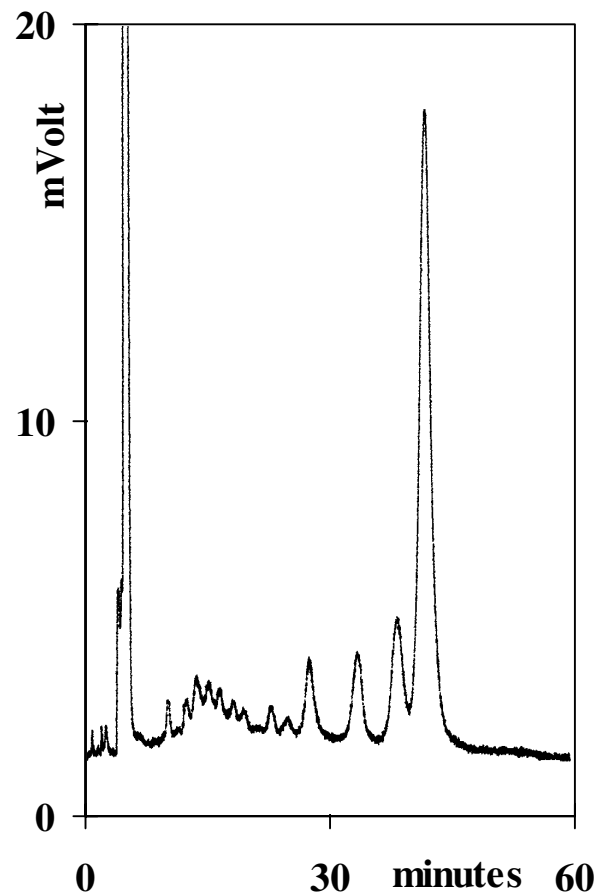


Abbildung 3-20 Die vier Seitenkettenisomere von  $\alpha$ -Tocotrienol aus Eigelb nach Fütterung des Huhns mit synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase nach Isolierung der  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion durch semi-präparative HPLC (Diol-Phase).

Aus den Peakhöhen in Abbildung 3-20 läßt sich schließen, daß das naturidentische *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomer favorisiert vom Organismus aufgenommen und in das Ei transferiert worden ist. Ausgegangen werden muß von einem Anteil  $\alpha$ -Tocotrienol, der sich auch ohne Zufütterung des synthetischen Präparats im Ei wiederfindet. Unter der Berücksichtigung, daß der Gesamt- $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt durch die Fütterung auf das Dreifache (siehe Abbildung 3-18) angestiegen ist und die Isomere im synthetischen Präparat im gleichen Verhältnis vorliegen, errechnet sich über die Peakhöhen eine Bevorzugung des *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienols gegenüber seinen anderen drei Seitenkettenisomeren um den Faktor 4.

### 3.4.3 Bedeutung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß im Modell Futter–Huhn–Ei die Bioverfügbarkeit der *trans-cis*-, *cis-trans*- und *cis-cis*-  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere im Vergleich zum naturidentischen *trans-trans*-Isomer relativ gering ist. Gerade deshalb sollte dieses Ergebnis in die Bewertung der synthetischen Tocotrienol-Präparate einfließen, wenn es um deren biologische Aktivität oder Unbedenklichkeit geht. In einer ähnlichen Studie untersuchten Piironen et al. [pii 91] den Transfer von  $\alpha$ -Tocopherol-Stereoisomeren vom Futter in das Hühnerei und konstatierten, daß im Ei signifikant mehr von dem Enantiomerenpaar RRR und SSS zu unbestimmten Anteilen enthalten ist als in den korrespondierenden Futtern. Keine Publikation berichtet bisher über die Existenz eines  $\alpha$ -Tocopherol-Bindeproteins in Geflügel, das diese Präferenz erklären könnte. Die Ergebnisse von Piironen et al. [pii 91] wurden jedoch durch andere Tierversuche [ing 87, ued 93, ris 94, kiy 95, wei 96] und Untersuchungen am Menschen [tra 88, fer 93] mit dem Ergebnis der Substratspezifität des Tocopherol-Bindeproteins für RRR- $\alpha$ -Tocopherol ergänzt. Durch die nun am Beispiel Huhn durchgeführte Arbeit können auch auf dem Gebiet der Tocotrienole allgemein übertragbare Ergebnisse erzielt worden sein. Da die Methode durch eine entsprechende Probenaufarbeitung auch für so komplexe Matrices wie Eigelb geeignet ist, sollte sie sich auch auf die Bestimmung von Tocotrienol-Isomeren in Geweben oder Plasma übertragen lassen. Der analytische Grundstein für eine umfassende Untersuchung der Bioverfügbarkeit von *cis/trans*-Tocotrienol-Isomeren ist damit gelegt.

## 3.5 Synthetisches $\gamma$ -Tocotrienol und humane Zellkulturen

### 3.5.1 Zielsetzung

Anknüpfend an die Versuche zur Bioverfügbarkeit der *cis/trans*-Tocotrienole sollen Effekte von einem synthetischen Tocotrienol-Präparat auf menschlichen Gewebezellen am Beispiel von  $\gamma$ -Tocotrienol untersucht werden. Die nachfolgend beschriebene Untersuchung soll außerdem die Leistungsfähigkeit der entwickelten HPLC-Methode (permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase) zur Trennung der *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere demonstrieren. Diese Untersuchung soll nicht mikrobiologischen Studien vorausgreifen, sondern vielmehr durch diese ersten Ergebnisse aus dem folgenden Beispiel dazu motivieren.

### 3.5.2 Erfolg

Zellkulturen von humanen Leber- (HepG2) und Magenzellen (HMO2) wurden in einem Medium, das synthetisches  $\gamma$ -Tocotrienol in verschiedenen Konzentrationen enthielt, inkubiert. Anschließend wurden die Muster der  $\gamma$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere im Medium, den Zellwandbestandteilen

und im Cytosol untersucht und miteinander verglichen. Bei dieser Bestimmung konnte auf eine präparative Vortrennung der Probelösung (Diol-Phase) verzichtet werden, da in den Proben außer dem zudotierten  $\gamma$ -Tocotrienol keine anderen Tocopherole und Tocotrienole vorhanden waren, die die Analytik auf der  $\beta$ -PM-Phase stören könnten. Nach der Extraktion mit n-Hexan und evtl. einem Konzentrierungs- oder Verdünnungsschritt wurden die  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere direkt auf der  $\beta$ -PM mit amperometrischer Detektion getrennt. Fluoreszenz-Detektion erwies sich bei dieser einfachen Probenaufarbeitung als weniger geeignet, da sich die  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere von ebenfalls stark fluoreszenzaktiven Begleitbestandteilen nicht befriedigend separierten.

In der Verdünnungsreihe wirkten  $\gamma$ -Tocotrienol-Konzentration im Medium von 26,4 mg/L noch nicht zytotoxisch auf die beiden Zelllinien (vgl. Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10), während höhere, zytotoxische Konzentrationen dazu führten, daß sich die sonst adhärennten Zellen vom Substrat kugelig ablösten (siehe Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8).

Azzi et al. [azz 92] bestimmten vergleichsweise die Zytotoxizität von natürlichem R- $\gamma$ -Tocotrienol an Glattmuskelzellen von Ratten zu 18,5 mg/L. 100.000 dieser Zellen nehmen außerdem nach deren Berechnung 1,06  $\mu$ g  $\gamma$ -Tocotrienol bei einer Mediumkonzentration von 10,26 mg/L auf. Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsbedingungen sind so gestaltet, daß im gerade noch nichttoxischen  $\gamma$ -Tocotrienol-Konzentrationsbereich von 26,4 mg/L diese Menge auch von den Magen- und Leberzellen aufgenommen werden könnte. Bei den Versuchsreihen, in denen die beiden Zelllinien mit niedrigeren Konzentrationen an synthetischem  $\gamma$ -Tocotrienol behandelt wurden, reicht das Angebot im Medium jedoch nicht aus, um die gleiche maximale Aufnahmemenge wie bei den Glattmuskelzellen zu erreichen. Voraussetzung für diese Betrachtung ist natürlich, daß für Magen- und Leberzellen Aufnahmemengen in etwa der gleichen Größenordnung wie bei den Glattmuskelzellen angesetzt werden.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die  $\gamma$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere nach direkter Extraktion aus den Magen- und Leberzellwänden.

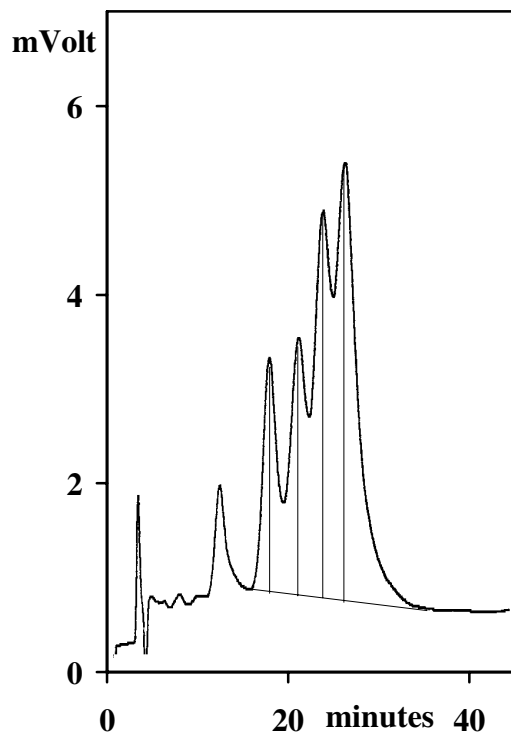


Abbildung 3-21  $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Magen-zellen HMO2; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,700 V vs. Ag/AgCl).

Probelösung Zellwand M10, nach Behandlung der Zellkultur mit synthetischem  $\gamma$ -Tocotrienol im Medium (1,8 mg/L).

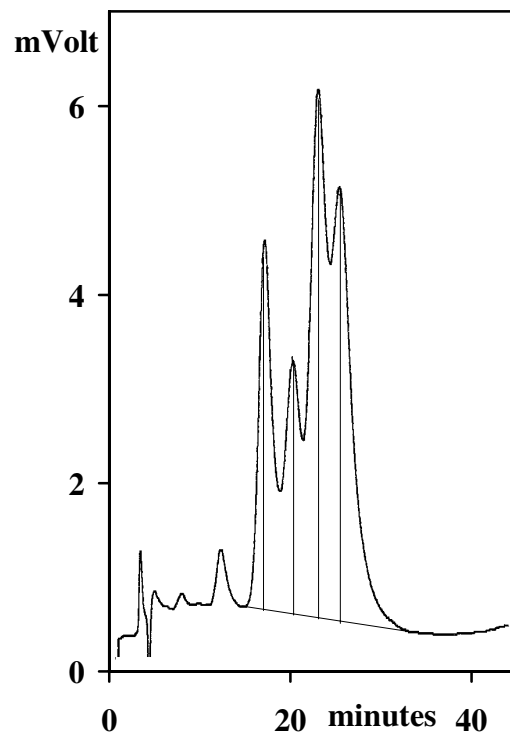


Abbildung 3-22  $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Leberzellen HepG2; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,700 V vs. Ag/AgCl).

Probelösung Zellwand M10, nach Behandlung der Zellkultur mit synthetischem  $\gamma$ -Tocotrienol im Medium (1,8 mg/L). Die Peakhöhen der vier cis/trans-Seitenkettenisomeren stehen im Vergleich zu Abbildung 3-21 in unterschiedlichem Verhältnis zueinander.

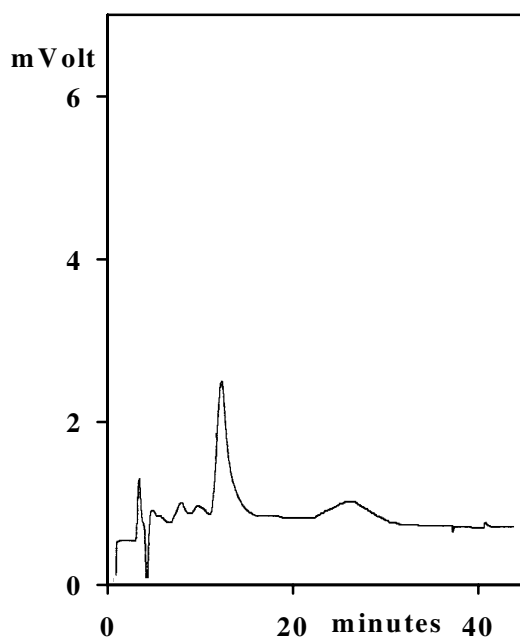


Abbildung 3-23 Beispiel für einen Extrakt aus Zellwänden, die nicht mit  $\gamma$ -Tocotrienol behandelt wurden; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,700 V vs. Ag/AgCl). Probelösung Zellwand M11

Zur Erstellung des Isomerenmusters wurde die Summe der Peakhöhen gleich 100 % gesetzt und der Prozentanteil eines jeden der vier Seitenkettenisomere von  $\gamma$ -Tocotrienol bestimmt. Die deutlichsten Unterschiede zeigten die Isomerenmuster aus den Zellwänden der Magenzellenkultur verglichen mit der Leberzellenkultur. Bei den zytotoxischen  $\gamma$ -Tocotrienol-Konzentrationen in den Medien wiesen beide Zelllinien die gleichen Prozentanteile der Isomere in den Zellwänden auf. Bei niedrigeren Konzentrationen jedoch nahmen die Anteile des *cis/trans*- (2. Peak in der Elutionsreihenfolge auf der  $\beta$ -PM-Phase) und des *trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Isomers in den Leberzellwänden drastisch ab, während die Anteile der anderen beiden Isomere dementsprechend in gleichem Maße stiegen (siehe Abbildung 3-24 und Abbildung 3-26). In den Magenzellwänden dagegen blieben die Anteile der verschiedenen Isomere stets auf gleichem Niveau (siehe Abbildung 3-25 und Abbildung 3-27).

Im Medium der Leberzellen wiederholte sich der Trend, der in den Zellwänden selbst zu beobachten war, v. a. für die Anteile des *cis/trans*- (2. Peak) und des *trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Isomers, während sich die Anteile der beiden anderen Isomere bei verschiedenen  $\gamma$ -Tocotrienol-Konzentrationen kaum veränderten (siehe Abbildung 3-29). Die Anteile der  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere im Medium der Magenzellen spiegeln die Verhältnisse in den Magenzellwänden wider (siehe Abbildung 3-28).

Die Werte für das Cytosol der Magen- und Leberzellen (siehe Abbildung 3-30 und Abbildung 3-31) sollten nur sehr vorsichtig interpretiert werden, da durch die geringen Probenmengen z. T. nur Einfachbestimmungen und bei den abgestorbenen Zellen keine Bestimmung möglich waren. Man kann aber beobachten, daß die Peakflächenanteile des *cis-cis*- und des *cis/trans*- (3. Peak)- $\gamma$ -Tocotrienols im Cytosol der Leberzellen tendenziell höher liegen als bei den Magenzellen.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus humanen Magenzellwänden HMO2**

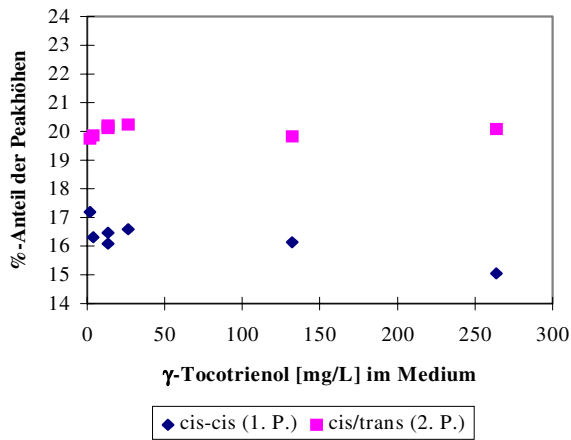


Abbildung 3-24 cis-cis- $\gamma$ -Tocotrienol und cis/trans-(2. Peak)- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Magenzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.

Der Anteil der Peakhöhen an der Gesamtpeakhöhe aller Seitenkettenisomere bleibt jeweils in Abhängigkeit vom  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt des Mediums im wesentlichen unverändert.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus humanen Leberzellwänden HepG2**

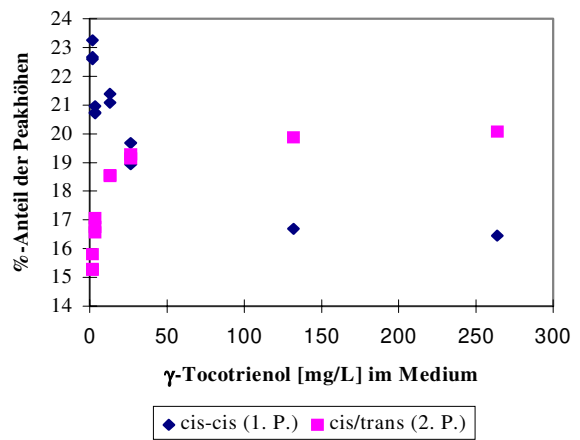


Abbildung 3-25 cis-cis- $\gamma$ -Tocotrienol und cis/trans-(2. Peak)- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Leberzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.

Der Anteil der Peakhöhen an der Gesamtpeakhöhe aller Seitenkettenisomere verändert sich jeweils in Abhängigkeit vom  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt des Mediums.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus humanen Magenzellwänden HMO2**

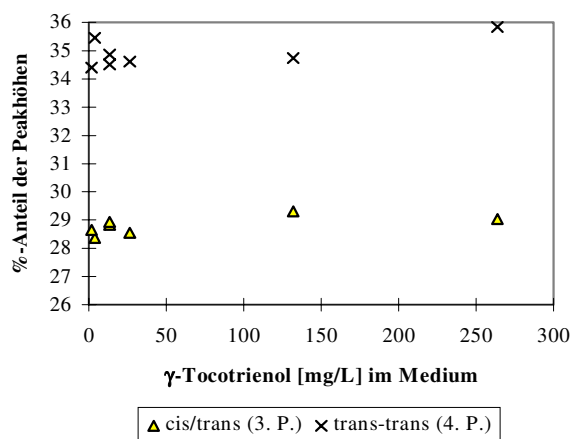


Abbildung 3-26 cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol (3. Peak) und trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Magenzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.

Auch bei diesen Isomeren bleibt der Anteil der Peakhöhen an der Gesamtpeakhöhe bei verschiedenen  $\gamma$ -Tocotrienol-Konzentrationen im Medium jeweils im wesentlichen unverändert.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus humanen Leberzellwänden HepG2**

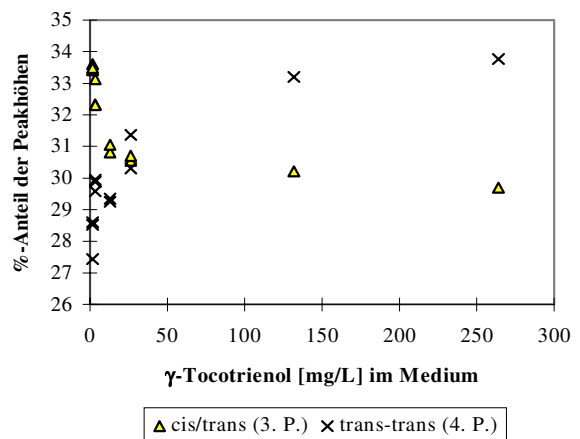


Abbildung 3-27 cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol (3. Peak) und trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Leberzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.

Auch bei diesen Isomeren verändert sich der Anteil der Peakhöhe an der Gesamtpeakhöhe jeweils in Abhängigkeit vom  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt des Mediums.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Medium für humane Magenzellen HMO2**

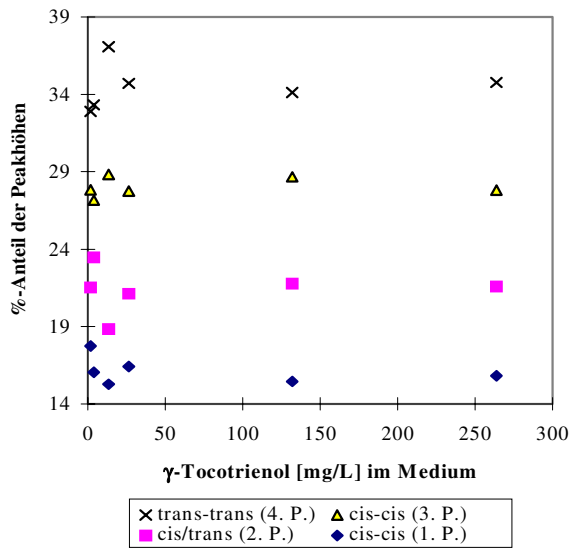


Abbildung 3-28  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Medium für humane Magenzellen HMO2; Prozentanteil der Peakhöhen.

Im Medium für humane Magenzellen bleiben bei allen Seitenkettenisomeren von  $\gamma$ -Tocotrienol die Anteile der Peakhöhen an der Gesamtpeakhöhe in Abhängigkeit vom  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt annähernd konstant.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Medium für humane Leberzellen HepG2**

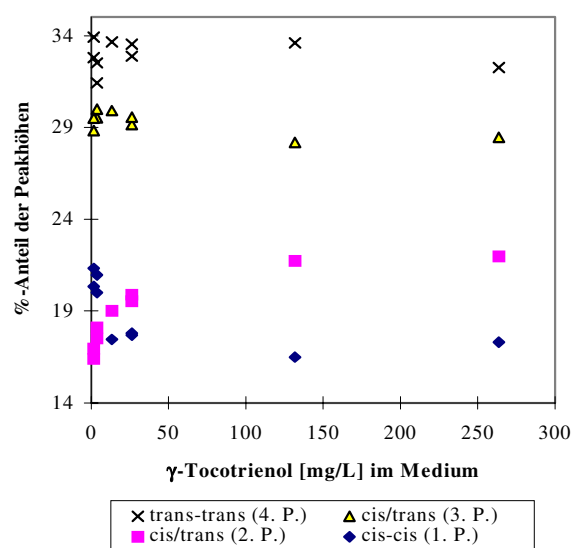


Abbildung 3-29  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Medium für humane Leberzellen HepG2; Prozentanteil der Peakhöhen.

Im Medium für humane Leberzellen gibt es in Abhängigkeit vom  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt für die Anteile der Peakhöhen an der Gesamtpeakhöhe bei cis/trans-(3. Peak)- und trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol kaum Veränderungen. Für cis-cis- $\gamma$ -Tocotrienol und cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol (2. Peak) ergeben sich Veränderungen, wie beim Extrakt aus den Zellwänden beobachtet (siehe Abbildung 3-25).

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Cytosol von humanen Magenzellen HMO2**

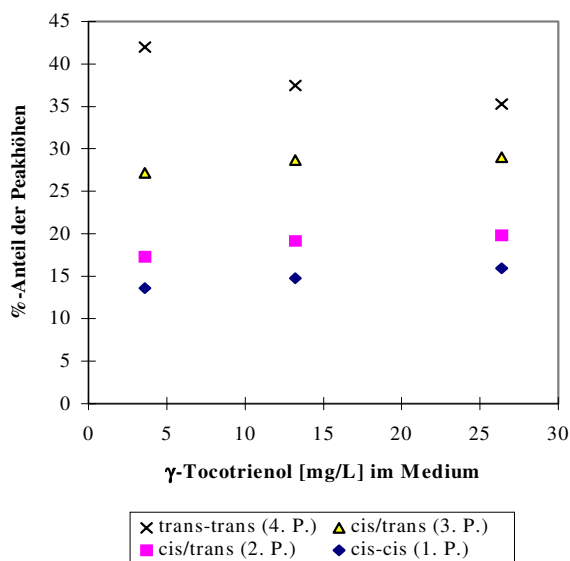


Abbildung 3-30  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Cytosol von humanen Magenzellen HMO2; Prozentanteil der Peakhöhen.

**$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Cytosol von humanen Leberzellen HepG2**

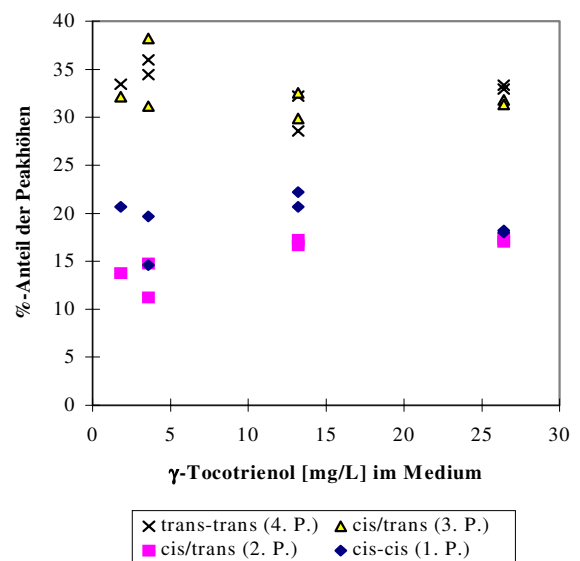


Abbildung 3-31  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Cytosol von humanen Leberzellen HepG2; Prozentanteil der Peakhöhen.



### 3.5.3 Bedeutung der Ergebnisse

Deutliche Unterschiede ergeben sich im  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomerenmuster der Magen- und Leberzellwände. Diese Unterschiede werden umso eindrucksvoller, je geringer der  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt im Zellmedium ist. Die gemessene Abhängigkeit legt, da eine zufällige Verschiebung der Isomeren-Verhältnisse nicht wahrscheinlich ist, den Schluß nahe, daß die verschiedenen Isomere in der Umgebung der Zellmembran diskriminiert werden. Die Anteile der *cis/trans*- (2. Peak) und *trans-trans*-Isomere nehmen in den Leberzellwänden zugunsten der anderen beiden Isomere ab. Diese Beobachtung kann drei hypothetische Gründe haben:

1. Ein  $\alpha$ -Tocopherol-Bindeprotein in der Zellmembran oder im Zellinneren kann, wenn sein eigentliches Substrat RRR- $\alpha$ -Tocopherol nicht angeboten wird, ersatzweise auch aktiv zwischen *cis/trans*-Tocotrienolen diskriminieren. Über die Rolle des  $\alpha$ -Tocopherol-Bindeproteins gegenüber anderen Vitaminen in Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol ist allerdings noch nichts berichtet worden.
2. Einzelne Isomere werden passiv, also nicht rezeptorvermittelt, bevorzugt in die Membran aufgenommen. Für diese Theorie spricht, daß die Isomerenverhältnisse im Medium teilweise dem Trend in den Zellwänden folgt.
3. Mit der gleichen Begründung kann auch postuliert werden, daß die beiden genannten Isomere *ohne* Bevorzugung passiv in die Zellmembran aufgenommen werden, aber dort durch Komplexbildung mit Proteinen oder durch Oxidationsreaktionen so modifiziert werden, daß sie nicht mehr in der Analytik erfasst werden können.

Es wurden grundlegende Studien zur Aufklärung der bis zu 60fach höheren antioxidativen Aktivität von R, $\alpha$ -Tocotrienol im Vergleich zu RRR, $\alpha$ -Tocopherol in Ratten-Lebermikrosomen durchgeführt [yam 90, ser 91]. Als einer der Gründe wurde vorgeschlagen, daß  $\alpha$ -Tocotrienol die Ordnung der Membranlipide mehr stören würde als  $\alpha$ -Tocopherol und deswegen eine effizientere Wechselwirkung des Chromanolanteils mit den Lipidradikalen möglich ist.  $\alpha$ -Tocopherol ist der allgemeinen Meinung nach mit dem Chromanolanteil an der polaren Wasser-Lipid-Grenzschicht lokalisiert [ser 91, gom 93], während die isoprenoide Seitenkette mit den Acylketten der Membranphospholipide wechselwirkt. Übertragen auf die Tocotrienole könnten geometrische Isomere durchaus die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran beeinflussen und so entsprechend ihres Einflusses diskriminiert werden, was besonders These 3 unterstützt.

Zusammenfassend wird festgehalten, daß auf eine im Rahmen dieser Arbeit nicht genau zu klärende Art und Weise in den Zellmembranen von humanen HepG2 Leberzellen *cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienole diskriminiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die entwickelte Analytik geeignet ist, physiologische Prozesse auf einer bisher nicht zugänglichen Ebene zu verfolgen.

### **3.6 Beeinflussung von $\gamma$ -Tocotrienol durch katalytischen Fetthärtungsprozeß**

#### **3.6.1 Zielsetzung**

Wie bereits einleitend angemerkt (siehe 2.1), kann der Hydrierprozeß während der Fetthärtung als Verursacher für mögliche *cis/trans*-Isomere aus natürlichen Tocotrienolen in Betracht gezogen werden. In der folgenden Studie soll nachgewiesen werden, ob dieser Prozeß als Quelle für *cis/trans*-Isomere gelten kann.

#### **3.6.2 Erfolg**

Die Untersuchung eines gehärteten Palmöls, das reich an natürlichem  $\gamma$ -Tocotrienol ist, ergab, daß keine *cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere nachweisbar sind. Die HPLC-Trennung mit der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase zeigte nur das *trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol (siehe Abbildung 3-33). Dieses Ergebnis konnte durch die empfindlichere amperometrische Detektion bestätigt werden.

Auf die gleiche Art und Weise wurde auch  $\alpha$ -Tocotrienol aus gehärtetem Palmöl untersucht. Auch in diesem Fall waren außer *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol keine anderen Seitenkettenisomere erkennbar. Die Zuordnung der Isomere wurde ebenfalls durch Koinjektion von  $\alpha$ -Tocotrienol aus gehärtetem Palmöl mit der synthetischen Referenzsubstanz bestätigt. Letztlich wurde der Versuch noch mit zwei tocotrienolhaltigen Margarinen, die aus z. T. gehärteten pflanzlichen Ölen bestehen, mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

#### **3.6.3 Bedeutung der Ergebnisse**

Die Bildung von *trans*- Fettsäuren aus *cis*-konfigurierten Doppelbindungen ist der eigentlich unerwünschte Nebeneffekt der katalytischen Hydrierung. Aber auch diese Isomerisierungsprodukte sind weiterer Isomerisierung und Hydrierung ausgeliefert [pat 94], so daß durch den technologischen Prozeß ein breites Spektrum von partiell hydrierten *cis/trans*-Fettsäuren aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren hervorgehen kann. Folglich könnte auch die *trans*-konfigurierte Doppelbindung der Tocotrienole von der Katalysatoroberfläche gebunden und unter den technologischen Bedingungen isomerisiert werden.

Natürliche Fettsäuren weisen isolierte 1,4-ungesättigte Doppelbindungen auf, die durch jeweils *eine* Methylengruppe unterbrochen sind, während die der Tocotrienole durch *zwei* Methylengruppen getrennt sind. In den Fettsäuren bilden sich während des Hydrierprozesses konjugierte Systeme und es wandern Doppelbindungen, worauf ein Gleichgewichtszustand erreicht wird, in dem nur ein Drittel der verbleibenden Doppelbindungen *cis*-konfiguriert sind. Diese Gleichgewichtseinstellung bleibt unverändert, bis alle Doppelbindungen gesättigt sind [pat 94]. Vor diesem Hintergrund könnte unter den gleichen Bedingungen auch eine Isomerisierung von Tocotrienolen ablaufen, jedoch ließ sich kein

bedeutender Anteil von *cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienolen neben einem intensiven Peak für *trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol nachweisen. Zwar werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren bevorzugt und stärker an die Katalysatoroberfläche gebunden als einfach ungesättigte; in dem Fall allerdings, daß mehrere –CH<sub>2</sub>–Gruppen die Doppelbindungen isolieren, verhält sich das gesamte ungesättigte System im Vergleich zur üblichen 1,4-ungesättigten Form weniger reaktiv gegen Isomerisierung und Hydrierung [pat 94]. Diese stabile Struktur ist auch in der Seitenkette der Tocotrienole anzutreffen und kann daher als Erklärung dienen, warum durch den Hydrierprozeß kein nachweisbarer Anteil *cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere entstehen.

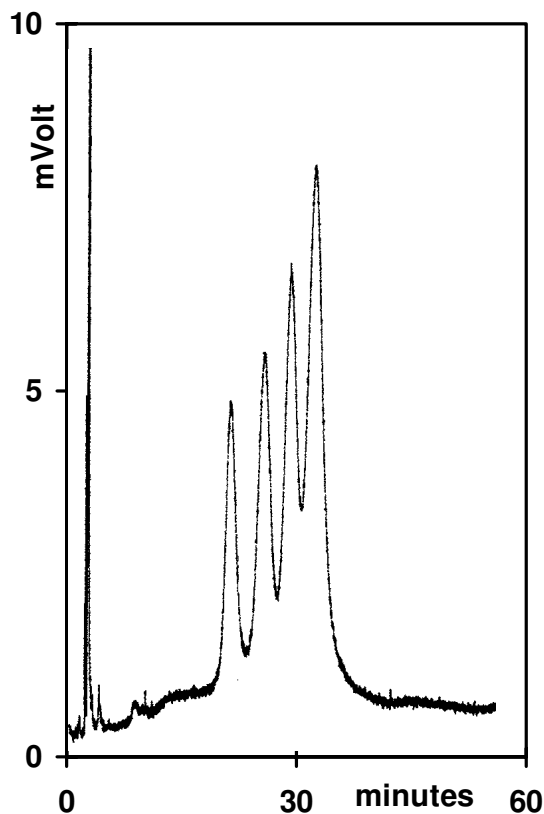


Abbildung 3-32 HPLC-Trennung einer  $\gamma$ -Tocotrienol-Referenzsubstanz auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Die vier Seitenkettenisomere von synthetischem  $\gamma$ -Tocotrienol (3,6 mg/L) mit *trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol als zuletzt eluierendem Isomer.

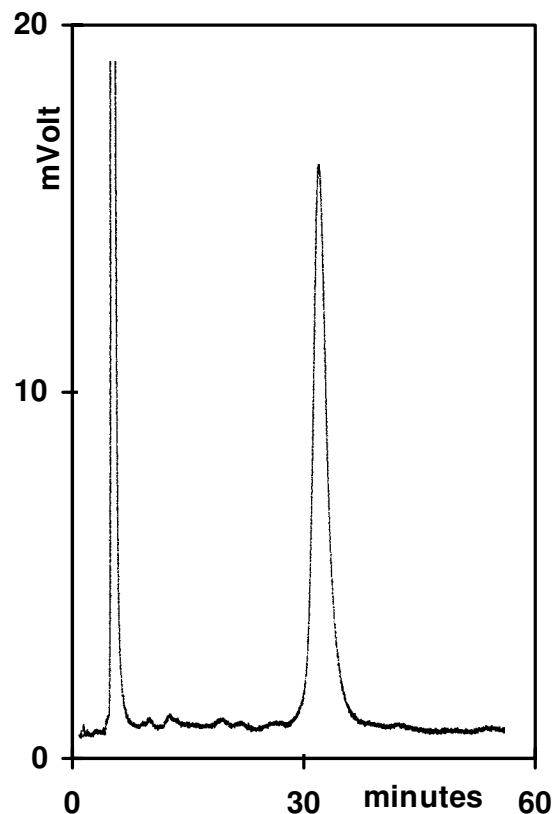


Abbildung 3-33  $\gamma$ -Tocotrienol aus gehärtetem Palmöl auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Ein signifikanter Anteil von  $\gamma$ -Tocotrienol mit *cis*-konfigurierten Doppelbindungen ist nicht zu erkennen. Koinjektion mit synthetischem  $\gamma$ -Tocotrienol bestätigte das Ergebnis (nicht abgebildet). HPLC-Trennung auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase nach Isolierung der  $\gamma$ -Tocotrienol-Fraktion durch semipräparative HPLC (Diol-Phase).

Rabascall und Riera [rab 87] berichten über den Abbau von Tocopherolen in Ölen während der Raffination und Hydrierung und zeigten, daß der Abbau während der Härtung einer Reaktion 1. Ordnung (gegen Zeit) folgt. Da die Tocotrienole die gleiche Chromanolstruktur aufweisen wie die Tocopherole, kann man darauf schließen, daß sie in ähnlicher Weise unter den Hydrierbedingungen zerstört werden, während die weniger reaktive ungesättigte Seitenkette in ihrer geometrischen Struktur noch unverändert bleibt. Spätere Modifikation der Seitenkette kann durch die angewendete Analytik nicht erfaßt werden, da für ein Signal im Fluoreszenz- oder amperometrischen Detektor ein unversehrter Chromanolanteil nötig ist.

**Abbildung 4-11** (Abschnitt 4.4.4.3) zeigt das HPLC-Chromatogramm von gehärtetem Palmöl auf einer Diol-Phase. Neben  $\alpha$ -Tocotrienol sind hier auch  $\alpha$ -Tocomoneol und  $\alpha$ -Tocodienol zu erkennen, wobei letztere über zwei bzw. eine Doppelbindung weniger in der Seitenkette verfügen als das Tocotrienol. Der Vollständigkeit halber könnte untersucht werden, ob die Sättigung in der Seitenkette in diesem Fall mit der Hydrierung  $\alpha$ -Tocotrienol-haltiger Öle in Verbindung steht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß durch den Prozeß der katalytischen Fetthärtung möglicherweise ein Abbau von  $\gamma$ -Tocotrienol bedingt ist, die Geometrie der *trans-trans*-konfigurierten Seitenkette jedoch nicht beeinflußt wird. Da bei dem Hydrierprozeß für Fette vergleichsweise drastische Bedingungen herrschen, ist nicht damit zu rechnen, daß bei anderen technologischen Maßnahmen der Lebensmittelindustrie Seitenkettenisomere der Tocotrienole generiert werden.

## **3.7 Beeinflussung von $\alpha$ -Tocotrienol durch Biohydrierung im Pansen**

### **3.7.1 Zielsetzung**

Mikroorganismen im Pansen von Wiederkäuern sind in der Lage ungesättigte, *cis*-konfigurierte Fettsäuren in *trans*-Fettsäuren umzuwandeln bzw. Doppelbindungen zu hydrieren [chr 81]. Welchen Effekt die Verdauung eines Wiederkäuers auf die Bildung von *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienolen aus dem natürlichen *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol hat, soll in der vorliegenden Arbeit am Beispiel eines Schafes untersucht werden.

### **3.7.2 Erfolg**

Einem Mutterschaf wurde  $\alpha$ - und  $\gamma$ -tocotrienolreiches Palmöl oral verabreicht, um die Nahrung mit natürlichen Tocotrienolen zu ergänzen und durch die daraus resultierende Erhöhung des Tocotrienolgehaltes der Milch die Analytik zu erleichtern. Innerhalb von fünf Tagen nach Beginn der Fütterung

mit Palmöl stieg der  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt der Milch um das Dreifache auf ca. 0,5 mg/kg und erreichte zwei Tage nach Fütterungsende wieder den Ausgangsgehalt (siehe Abbildung 3-34), während sich der  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt wegen der geringeren Bioverfügbarkeit kaum merklich erhöhte.

Die aus dem Milchfett isolierte  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion wies außer dem natürlich vorkommenden *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol keine erkennbaren weiteren Seitenkettenisomere auf (siehe Abbildung 3-35). Die Koinjektion mit der synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Referenzsubstanz bestätigt, daß es sich bei vor dem *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Peak eluierenden Substanzen (< 16 min) um Matrixbelastung und nicht um Seitenkettenisomere handelt (siehe Abbildung 3-36). Ob allerdings  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere, die sich nach dieser Methode unterhalb der Nachweisgrenze befinden, doch zu einem sehr geringen Anteil entstanden sind, könnte eine Wiederholung des Versuch mit einem wesentlich tocotrienolreicheren Futter zeigen. Bis dahin sind jedoch *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere in der Schafsmilch nicht nachweisbar.

An den beiden folgenden Chromatogrammen ist nebenbei auch noch zu beobachten, daß sich die Retentionszeiten der  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere mit dem fortschreitenden Gebrauch der Säule verkürzen, wie ein Vergleich mit Abbildung 3-9 deutlich macht. Auf dieses Phänomen wurde bereits einleitend hingewiesen (siehe Seite 39).

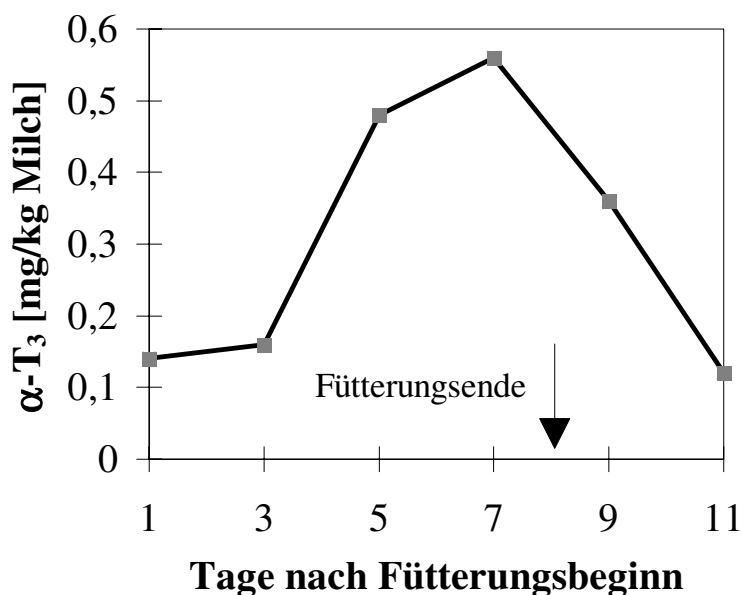


Abbildung 3-34  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt von Schafsmilch während und nach einer achttägigen Fütterungsperiode mit Palmöl.

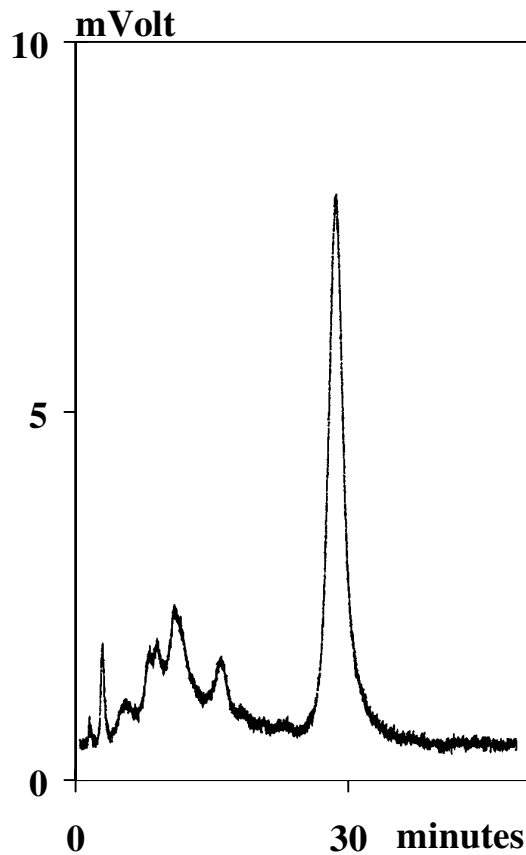


Abbildung 3-35  $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Ein signifikanter Anteil von  $\alpha$ -Tocotrienol mit *cis*-konfigurierten Doppelbindungen ist nicht zu erkennen. HPLC-Trennung nach Isolierung der  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion durch semipräparative HPLC (Diol-Phase).

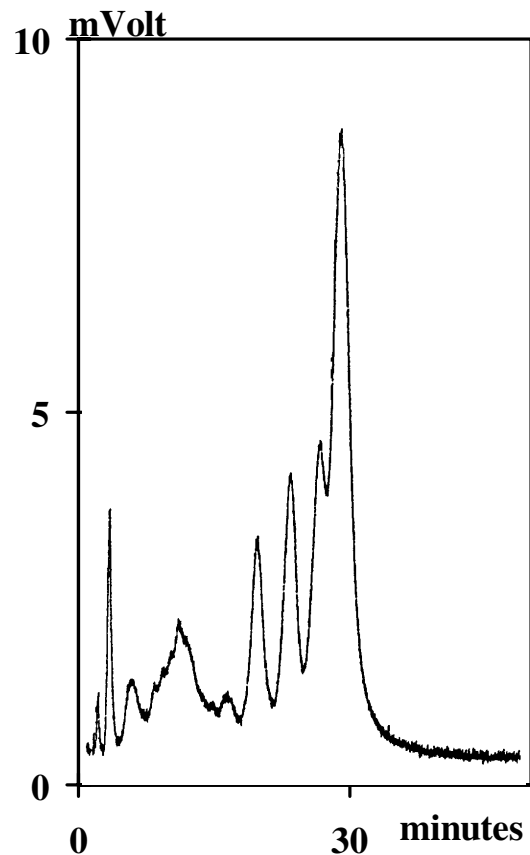


Abbildung 3-36 Koinjektion von synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol und  $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Synthetisches  $\alpha$ -Tocotrienol (21 mg/L)/ $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett 1:1 (v/v), mit *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol als zuletzt eluierendem Isomer.

Nach der oralen Aufnahme gelangen die Tocotrienole (und Tocopherole) durch den Magen-Darm-Trakt in den Dünndarm, wo sie als freie, underivatisierte Form absorbiert werden. Via lymphatisches System gehen sie als Lipoproteinkomplexe in den Kreislauf über [hid 94, kay 93, eic 97] und werden so anschließend Bestandteil der Milch. Pumfrey et al. [pum 93] untersuchte an Milchkühen die Absorption von  $\alpha$ -Tocopherol im Verdauungstrakt und den Transfer in die Milch. Nach der Verabreichung von emulgiertem RRR- $\alpha$ -Tocopherol, das als große Pille direkt in den Pansen eingebracht wurde, ließ die Wiederfindungsrate in der Milch nur auf einen Transfer von 0,75 % schließen, während im Blut immerhin 26 % wiedergefunden wurden. Wie beim Schaf beobachtet wurde, wird das Tocopherolmolekül, als freies Tocopherol in den Pansen appliziert, durch die dort herrschenden Bedingungen in seiner Struktur nicht verändert [ast 74]. Im Gegensatz dazu könnten die Tocotrienole durch ihre ungesättigte Seitenkette durchaus auf der Passage durch den Pansen

beeinflusst und durch den Metabolismus der Pansenmikroorganismen umgewandelt werden. So ist, wie eingangs erwähnt, die Bildung von *trans*-Fettsäuren durch die Biohydrierung im Pansen und ihr Übergang in die Milch und in das Fleisch ein bekanntes Problem [chr 81, jen 94, pre 97].

Es sind viele verschiedene Bakterienspecies an der Biohydrierung beteiligt, die in zwei Gruppen eingeteilt werden; die eine wandelt konjugierte Diene, ein Zwischenprodukt der Biohydrierung, in *trans*-Monoen-Fettsäuren um und die zweite Gruppe wandelt jene *trans*-Monoen-Fettsäuren in ungesättigte Fettsäuren um. Offensichtlich sind bei den Tocotrienolen ähnliche Zwischenstufen, die ein Angreifen der Mikroorganismen ermöglichen könnten, nicht existent. Außerdem darf nicht außer acht gelassen werden, daß die wirksamen Isomerase-Enzyme über eine absolute Spezifität verfügen und Kohlenstoffatome dementsprechend stereospezifisch protonieren können, wie für die Isomerisierung der *cis*-9,*cis*-12-Octadecensäure (Linolsäure) in die *cis*-9,*trans*-11-Octadecensäure nachgewiesen wurde [kep 71]. Das Substrat soll während der Umwandlung in einer hydrophoben Tasche des Enzyms gebunden sein, indem zum einen das aktive Zentrum des Enzyms mit den  $\pi$ -Elektronen der Doppelbindung an C9 des Substrats wechselwirkt und zum anderen eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem elektronegativen Bereich des Enzyms und der Carboxylgruppe des Substrats besteht. Beim Transfer der  $H^+$  spielt die Carboxylgruppe der Fettsäure eine Schlüsselrolle [har 81]. Das heißt, daß nicht nur die 1,4 Stellung der Doppelbindung im Substrat, sondern auch die Anwesenheit einer Carboxylgruppe ein wichtiges Kriterium für die Biohydrierung von Fettsäuren darstellt. In diesen beiden wichtigen Punkten unterscheiden sich jedoch Fettsäuren und Tocotrienole, so daß Tocotrienole, wie auch durch die hier durchgeführte Untersuchung gezeigt, nicht als Substrat für die Biohydrierung im Pansen zur Verfügung stehen.

### 3.7.3 Bedeutung der Ergebnisse

Ein Stoffwechselweg, der die Isomerisierung einer *trans*-Fettsäure in eine *cis*-konfigurierte im Pansen beinhaltet, ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Damit im Einklang steht auch das hier vorgestellte Ergebnis, daß keine *cis/trans*-Isomere von *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol, die durch Pansenmikroorganismen generiert worden sein können, in der Schafsmilch nachgewiesen werden konnten. Wenn im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus der Wiederkäuer eine Isomerisierung der Tocotrienole höchstens zu einem sehr geringen Prozentsatz stattfindet, erscheinen auch andere biologische Prozesse weniger relevant, die Ernährung des Menschen durch Tocotrienol-Isomere möglicherweise ungünstig zu beeinflussen.

## 3.8 HPLC-Trennung der *RS,cis/trans*-Tocotrienole

### 3.8.1 Zielsetzung

Neben einer geometrischen Isomerie in der Seitenkette können synthetische Tocotrienole auch Stereoisomerie am asymmetrischen C2 des Chromanolrings aufweisen. So sind für jedes Tocotrienol insgesamt acht *RS,cis/trans*-Isomere möglich. Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die verschiedenen Möglichkeiten zur Trennung der vier Seitenkettenisomere eines jeden Tocotrienols behandelt worden sind, soll nun die Methodik auf die Trennung der *RS*-Isomere erweitert werden. Isolierte *cis/trans*-Isomere von  $\alpha$ -Tocotrienol sollen nach geeigneter Derivatisierung in ihre Enantiomere separiert und das *R,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol durch Koinjektion mit  $\alpha$ -Tocotrienol natürlichen Ursprungs identifiziert werden. Es soll darüber hinaus untersucht werden, wie sich die derivatisierten synthetischen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol-Vergleichssubstanzen, sowie eine derivatisierte *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol-Vergleichssubstanz unter den Bedingungen der neu entwickelten HPLC-Methode verhalten. Ein Vergleich mit Vitameren aus natürlichen Quellen erlaubt auch hier, die Retentionszeit des jeweils naturidentischen Isomers zu bestimmen.

### 3.8.2 Trennerfolg

#### 3.8.2.1 Chromatogramme der *RS,cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienole

Die Trennung der *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienole gelingt nach ihrer Derivatisierung zum Methylether auf einer chiralen Cellulosecarbammat-Phase unter isokratischer Elution mit 0,05 % 2-Propanol in Isohexan. Im ersten Schritt dieser Methode werden die *cis/trans*-Isomere eines synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Präparats mit Hilfe der präparativen HPLC (permethylierte  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase) isoliert. Darauf folgt die Derivatisierung zum Methylether und anschließender chiraler Trennung. Abbildung 3-37 zeigt die Trennung von *cis-cis*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether in seine *RS*-Enantiomere. Die Retentionszeit der Enantiomere unterscheidet sich um mehr als sechs Minuten. Noch deutlicher (über sieben Minuten) fällt die Trennung für *RS,cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (erhalten aus 2. Peak bei  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase) aus (siehe Abbildung 3-38), während das Enantiomerenpaar des anderen *RS,cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (3. Peak) mit drei Minuten Unterschied eluiert (siehe Abbildung 3-39). Die *RS,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether eluieren im Abstand von knapp zwei Minuten und sind damit noch basisliniengetreunt (siehe Abbildung 3-40). Abbildung 3-41 macht deutlich, welche Isomere koelieren, wenn auf eine präparative Trennung der *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere verzichtet wird. Schließlich ist das Chromatogramm einer ohne Vortrennung derivatisierten synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Vergleichssubstanz abgebildet (siehe Abbildung 3-42). Die acht *RS,cis/trans*-Isomere trennen sich in fünf Peaks.



Bemerkenswert an den folgenden Chromatogrammen ist, daß vor allem in Abbildung 3-39 und Abbildung 3-40 eine dritte Substanz auftaucht. Im nachhinein wurden diese Substanzen als ein Abbauprodukt des jeweils davor eluierenden Enantiomers identifiziert, da das Signal erst mit fortschreitender Verwendungsdauer der Meßlösungen erschien und mit der Zeit an Intensität zunahm. Außerdem ergab die Summe der Peakflächen aus dem jenem Enantiomer und dem vermuteten Abbauprodukt zu jedem Zeitpunkt 50 % der Gesamtpeakfläche.

Wie aus der Synthese zu erwarten ist, entstehen die RS-Enantiomere zu jeweils gleichen Anteilen. Die Peakflächen der Enantiomerenpaare eines jeden *cis/trans*-Isomer teilen sich deshalb in zweimal fast genau 50 %.

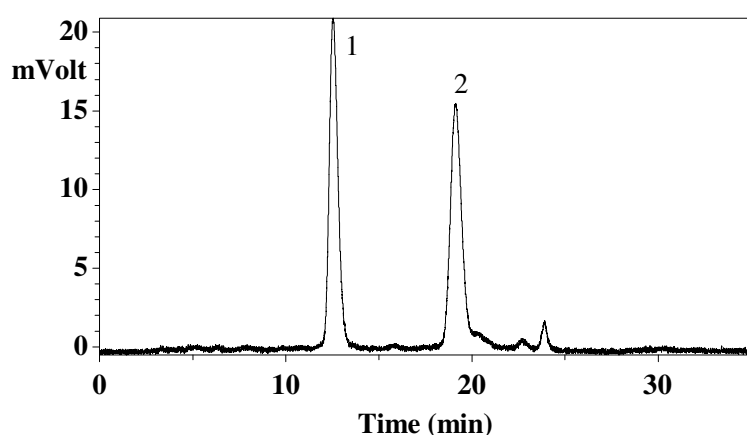


Abbildung 3-37 Das RS-Enantiomerenpaar von *cis-cis*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether<sup>5</sup>; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1: RT = 11,83 min, 2: RT = 18,00 min

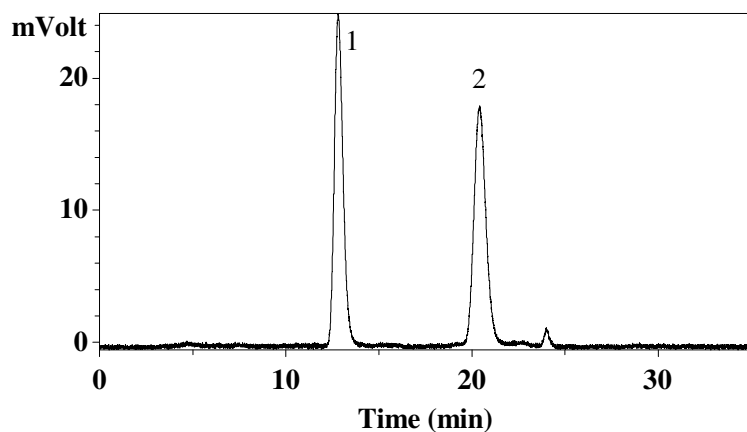


Abbildung 3-38 Das RS-Enantiomerenpaar von *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (erhalten aus 2. Peak bei  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase)<sup>5</sup>; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1: RT = 12,16 min, 2: RT = 19,21 min

<sup>5</sup> Das *cis/trans*-Isomer wurde durch semipräparative HPLC ( $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase) aus synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol isoliert und anschließend derivatisiert

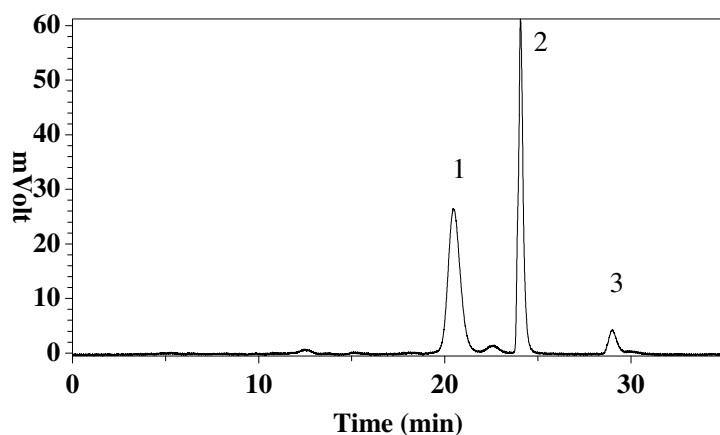


Abbildung 3-39 Das RS-Enantiomerenpaar von cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (entspr. 3. Peak bei  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase)<sup>5</sup>; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Bei der zuletzt eluierenden Substanz handelt es sich um ein Abbauprodukt von 2. 1: RT = 19,29 min, 2: RT = 23,11 min, 3: 27,89 min

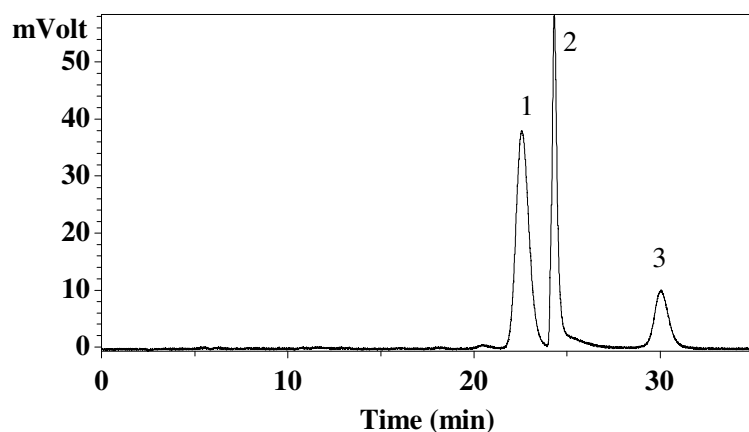


Abbildung 3-40 Das RS-Enantiomerenpaar von trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether<sup>5</sup>; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = S,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether, RT = 21,04 min; 2 = R,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether, RT = 22,98 min; 3 = Abbauprodukt des R-Enantiomers.

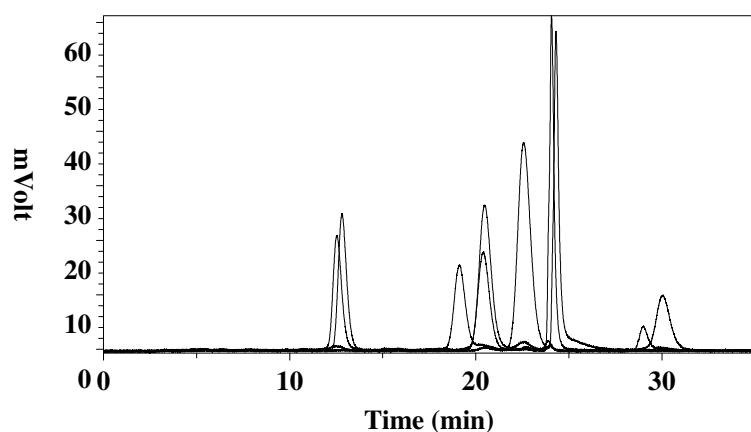


Abbildung 3-41 Die vorangegangenen vier Chromatogramme in übereinandergelegter Darstellung.

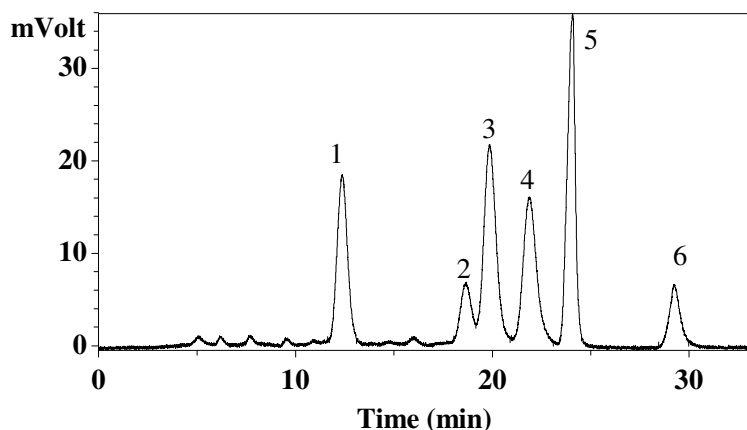


Abbildung 3-42 Methyletherderivat von kommerziell erhältlichem synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Die acht RS,*cis/trans*-Isomere trennen sich in fünf Peaks (1-5) und ein Abbauprodukt (6) aus 5. 1 = zwei Diastereomere von *cis-cis*- und *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-ME (letzteres entspr. 2. Peak bei  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase), RT

12,37 min; 2 = ein Enantiomer von *cis-cis*- $\alpha$ -Tocotrienol-ME, RT 18,68 min; 3 = zwei Diastereomere von *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-ME, (entspr. 2. und 3. Peak bei  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase) RT 19,86 min; 4 = *S,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-ME, RT 21,87 min; 5 = *R,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-ME koelulierend mit einem Diastereomer von *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-ME (letzteres entspr. 3. Peak bei  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase) RT 24,07.

Ein Vergleich des Chromatogramms des synthetischen  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylethers (Abbildung 3-42) mit der überlagerten Darstellung der einzelnen Enantiomerenpaare (Abbildung 3-41) belegt die getroffene Zuordnung und zeigt, daß die Trennung der  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere sehr gut nachvollziehbar ist.

### 3.8.2.2 Chromatogramme von RS, $\beta$ -, $\gamma$ und $\delta$ -Tocotrienol-Methylether sowie $\alpha$ -Tocopherol-Methylether

Um die Leistungsfähigkeit der beschriebenen Methode abzuschätzen, wurden ebenfalls die synthetischen  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol-Referenzsubstanzen, welche auch jeweils die acht möglichen RS,*cis/trans*-Isomere aufweisen, untersucht.

RS,*cis/trans*- $\beta$ -Tocotrienol-Methylether (siehe Abbildung 3-43) wies im Vergleich zu den anderen Vitameren eine besonders lange Retentionszeit von bis zu 42 min auf. Im Chromatogramm tauchen zudem neun Peaks auf, wovon der vierte jedoch wegen seiner geringen Intensität eher nicht als einer der acht möglichen Isomere anzusehen ist.

RS,*cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether (siehe Abbildung 3-44) dagegen wird viel schwächer retardiert und eluiert bereits innerhalb von 10 min. Wie in Abschnitt 3.8.3.3 ausgeführt, repräsentiert der letzte Peak das naturidentische *R,trans-trans*-Isomer. Obwohl der Peak sehr symmetrisch ist, kann eine Koelution mit einem weiteren Isomer aber nicht ganz ausgeschlossen werden, da nicht alle acht der theoretisch zu erwartenden Isomere in einer Antrennung erkennbar sind.

Im Chromatogramm des RS,*cis/trans*- $\delta$ -Tocotrienol-Methylethers (siehe Abbildung 3-45) ist bei einer maximalen Retentionszeit von unter 20 min die Trennung aller acht existierenden Isomere erkennbar.

Die sehr gut abgetrennte letzte Substanz wurde durch Koinjektion mit  $\delta$ -Tocotrienol-Methylether aus natürlicher Quelle als naturidentisches R,trans-trans-Isomer identifiziert (siehe 3.8.3.4).

Auch *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether ist mit der beschriebenen Methode in die 2R- und 2S-Diastereomere auftrennbar (siehe Abbildung 3-46). Das erhaltene Muster gleicht dem von Riss et al. (ris 94) publizierten, das die Arbeitsgruppe mit einem n-Hexan Eluenten ohne 2-Propanol-Zusatz erhalten hat. Die Elutionsreihenfolge der 2R-Diastereomere konnte durch Koinjektion mit  $\alpha$ -Tocopherol-Methylether aus natürlicher Quelle insoweit bestätigt werden, als daß RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether hier ebenfalls als vorletztes Diastereomer auftritt (siehe 3.8.3.5)

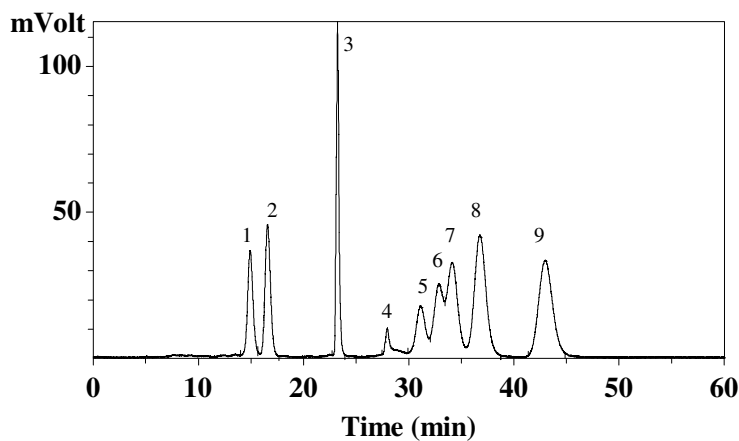


Abbildung 3-43 *RS,cis/trans*- $\beta$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1: RT = 14,95 min, 2: RT = 16,57 min, 3: RT = 23,23 min, 4: RT = 27,97 min, 5: RT = 31,14 min, 6: RT = 32,84 min, 7: RT = 34,12 min, 8: RT = 36,77 min, 9: RT = 42,99 min

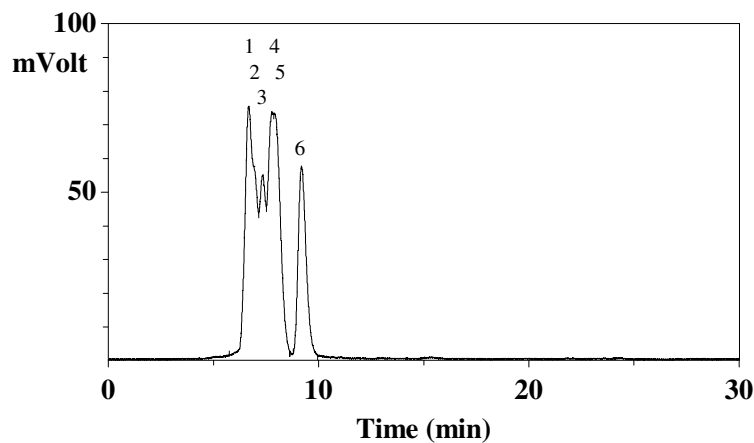


Abbildung 3-44 *RS,cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1: RT = 6,68 min, 2: Schulter, 3: RT = 7,35 min, 4: RT = 7,80 min, 5: RT = 7,89 min, 6 = naturidentischen R,trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol mit RT = 9,18 min (vgl. Abbildung 3-52).

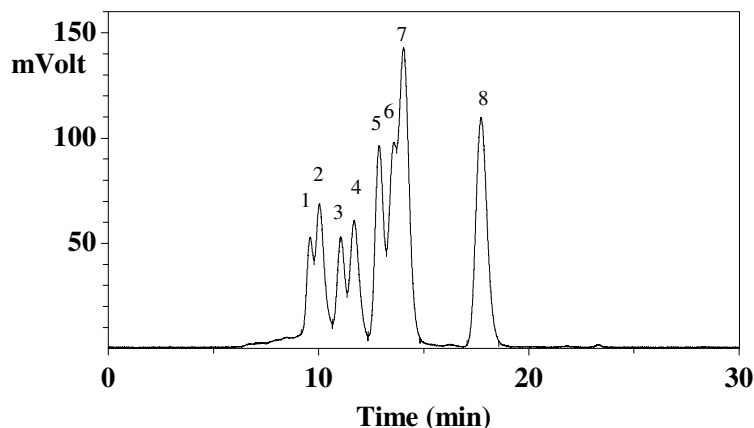


Abbildung 3-45 *RS,cis/trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether*; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1: RT = 9,64 min, 2: RT = 10,05 min, 3: RT = 11,06 min, 4: RT = 11,70 min, 5: RT = 12,88 min, 6: RT = 13,59 min, 7: RT = 14,04 min, 8 = naturidentischen *R,trans-trans- $\delta$ -Tocotrienol* mit RT = 17,71 min (vgl. Abbildung 3-54).

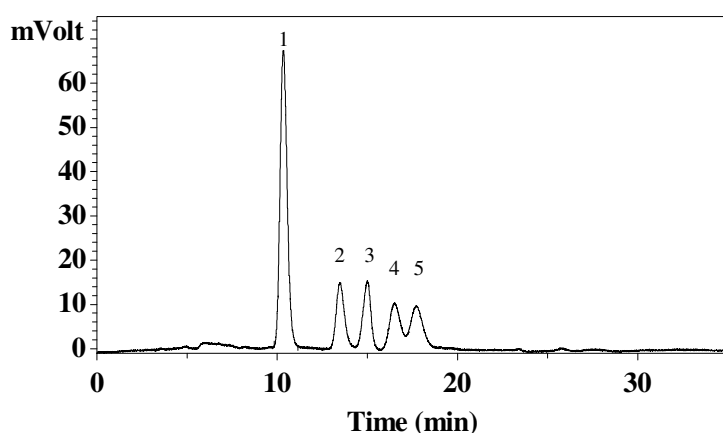


Abbildung 3-46 *all-rac- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether*; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = SSS, SSR, SRS und SRR<sup>a</sup> (RT 10,35 min), 2 = RSS<sup>a</sup> (RT 13,51 min), 3 = RRS<sup>a</sup> (RT 15,00 min), 4 = RRR (vgl. Abbildung 3-55) (RT 16,52 min), 5 = RSR<sup>a</sup> (RT 17,70 min)  
<sup>a</sup>nach [ris 94]

### 3.8.3 Untersuchung von Tocotrienolen und $\alpha$ -Tocopherol aus natürlichen Quellen

Tocotrienole und  $\alpha$ -Tocopherol wurden durch semipräparative HPLC aus natürlichen Quellen (Palmöl, Schafsmilchfett) isoliert und die derivatisierten Isolate mit der beschriebenen chiralen HPLC-Methode untersucht. Durch Vergleich der Retentionszeit von derivatisiertem natürlichem Vitamin E mit den synthetischen Derivaten läßt sich dem Referenzgemisch das naturidentische *2R,trans-trans*-Isomer bei Tocotrienolen bzw. das naturidentische *RRR- $\alpha$ -Tocopherol* zuordnen. Koinjektion der zu vergleichenden Proben ermöglicht eine sichere Zuordnung. Grundlage dieser Zuordnung ist die Beobachtung, daß in der Natur bisher nur *R,trans-trans*-Tocotrienole bzw. *RRR-Tocopherole* gefunden wurden [kas 80] und folglich der entsprechende Methylether als Derivat vorliegt.

#### 3.8.3.1 $\alpha$ -Tocotrienol aus Palmöl

Abbildung 3-47 zeigt ein Chromatogramm von aus Palmöl abgeleitetem  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (Probelösung 7). Außer dem als Abbauprodukt vermuteten letzten Peak ist nur *ein* weiterer Peak, das Derivat des natürlich vorkommenden *R,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienols*, prominent. Durch Koinjektion (siehe Abbildung 3-48) wird der zuerst eluierende der beiden *trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether*

Enantiomere als S- und der später eluierende als R-Enantiomer identifiziert. Bei genauer Betrachtung des Chromatogramms fällt vor dem R,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether eine leichte Erhebung der Grundlinie auf. Allerdings ist eine deutlich höhere Konzentration des Analyten erforderlich, um die Frage zu klären, ob doch ein unterhalb der Nachweisgrenze liegender Anteil des S-Enantiomers vorhanden ist. So könnte auch der Frage nachgegangen werden, ob die Biosynthese der Tocotrienole, wie angenommen wird, ganz und gar regiospezifisch abläuft [gree 72] oder doch auch das S-Enantiomer in einem bisher nicht bemerkten Anteil entsteht.

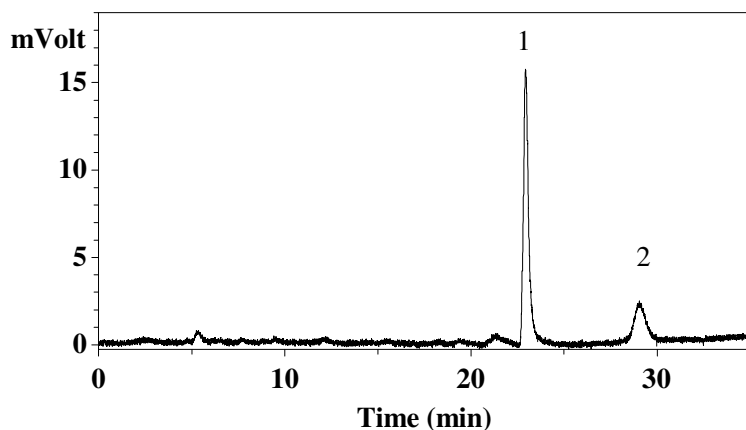


Abbildung 3-47  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\alpha$ -Tocotrienol wurde durch semipräparative HPLC (Diol-Phase) aus Palmöl isoliert und anschließend derivatisiert. 1 = R,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (RT 22,93 min), 2 = vermutlich Abbauprodukt von 1 (RT 29,04 min).

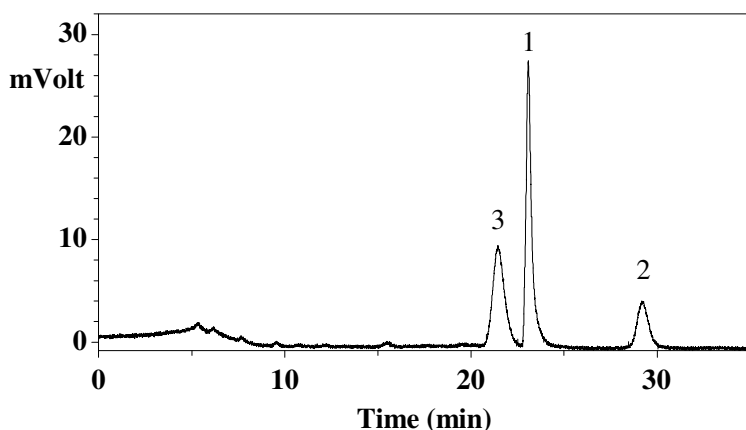


Abbildung 3-48 Koinjektion von  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl und RS,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = identifiziert als naturidentisches R,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (RT 23,08 min), 2 = vermutlich Abbauprodukt von 1 (RT 29,19 min), 3 = identifiziert als S,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (RT 21,44 min). (vgl. Abbildung 3-40).

### 3.8.3.2 $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafmilchfett

Entsprechend der Vorgehensweise wie bei  $\alpha$ -Tocotrienol aus Palmöl konnte der zuerst eluierende der beiden *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether-Enantiomere als S- und der später eluierende als R-Enantiomer bestimmt werden (siehe Abbildung 3-50). Aus Abbildung 3-49 ist ersichtlich, daß außer dem R,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether kein signifikanter Anteil des S-Enantiomers im Milchfett des Wiederkäuers Schaf festzustellen ist. Bei einem Vergleich des Chromatogramms mit Abbildung 3-47 wird allerdings deutlich, daß auch bei  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Schafmilchfett

die gleiche Erhebung der Grundlinie vor dem *R,trans-trans*-Isomer auftritt. Doch obwohl hier das *R,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether Signal ca. zehnmals intensiver ist als das bei Palmöl, separiert sich kein diskreter Peak eines *S*-Enantiomers, der sich deutlich aus der unruhigen Grundlinie erhebt. Desweiteren konnte während der Methodenentwicklung bei leicht modifizierten HPLC-Bedingungen beobachtet werden, daß dieselbe Probelösung wie für Abbildung 3-49 verwendet, zu einem früheren Zeitpunkt weder das vermutete Abbauprodukt *noch* die Erhebung der Grundlinie vor dem *R*-Enantiomer zeigt. Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß jene Erhebung eher auf eine Veränderung der Meßlösung zurückzuführen ist, als auf einen geringen Anteil von *S,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether.

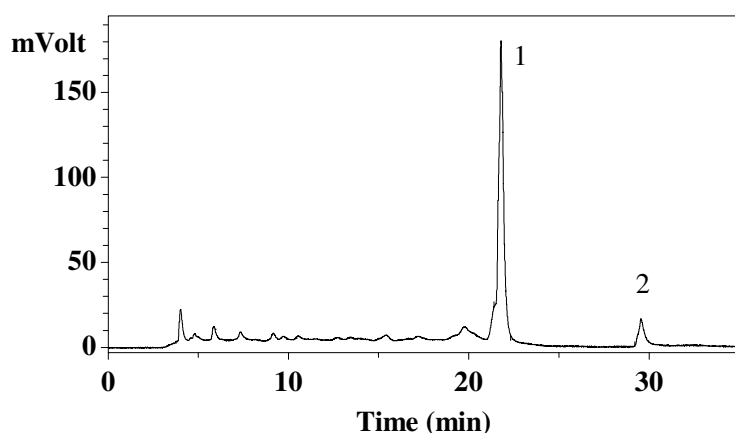


Abbildung 3-49  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Schafsmilchfett; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbammat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\alpha$ -Tocotrienol wurde durch semipräparative HPLC (Diol-Phase) aus Schafsmilchfett isoliert und anschließend derivatisiert. 1 = *R,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (RT 21,78 min), 2 = vermutlich Abbauprodukt von 1 (RT 29,56 min).

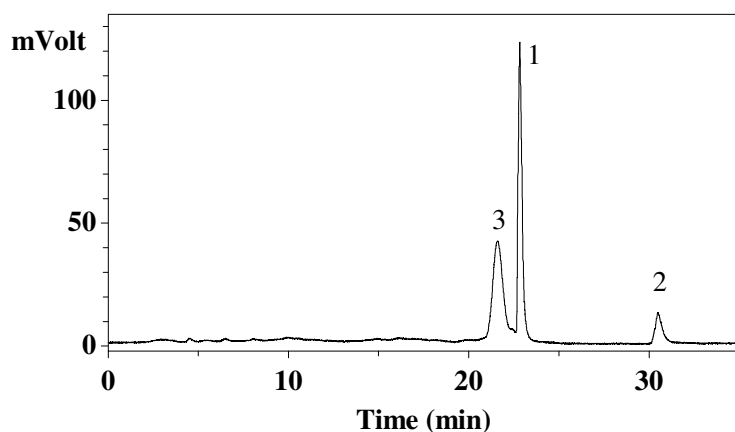


Abbildung 3-50 Koinjektion von  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Schafsmilchfett und *RS,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbammat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = identifiziert als naturidentisches *R,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (RT 22,83 min), 2 = vermutlich Abbauprodukt von 1 (RT 30,50 min), 3 = identifiziert als *S,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (RT 21,59 min). (vgl. Abbildung 3-40).

### 3.8.3.3 $\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl

Abbildung 3-51 zeigt nur einen symmetrischen Peak für das Derivat von  $\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl (Probelösung 10), wobei es sich um das Derivat des natürlich vorkommenden *R,trans-trans*-Isomer handeln muß. Koinjiziert mit dem Gemisch aller *RS,cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether (siehe

Abbildung 3-52) kann der Schluß gezogen werden, daß der im Gemisch zuletzt erscheinende Peak das *R,trans-trans*-Isomer repräsentiert. Aus der glatten Grundlinie ist nicht der geringste Ansatz für die Anwesenheit anderer  $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether-Isomere zu entnehmen. Da sich die vorher eluierende Gruppe von Substanzen nicht in zählbare sieben Isomere trennt, kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden, daß ein weiteres Isomer einschließlich des *S*-Enantiomers mit dem *R,trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether koeluiert.

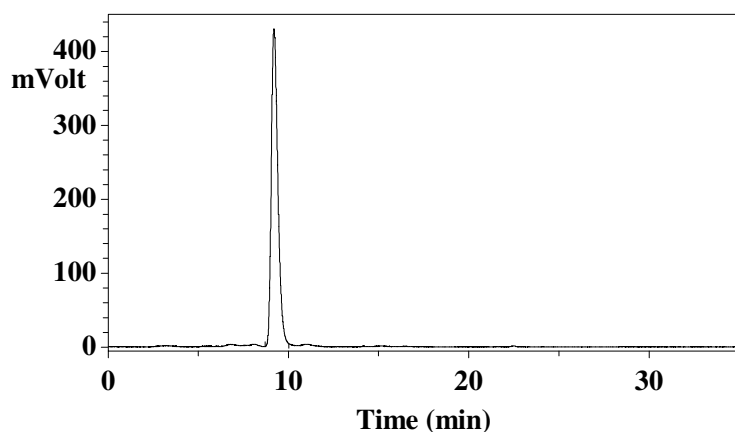


Abbildung 3-51 Chromatogramm von *R,trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

RT 9,20 min;  $\gamma$ -Tocotrienol wurde durch semipräparative HPLC (Diol-Phase) aus Palmöl isoliert und anschließend derivatisiert.

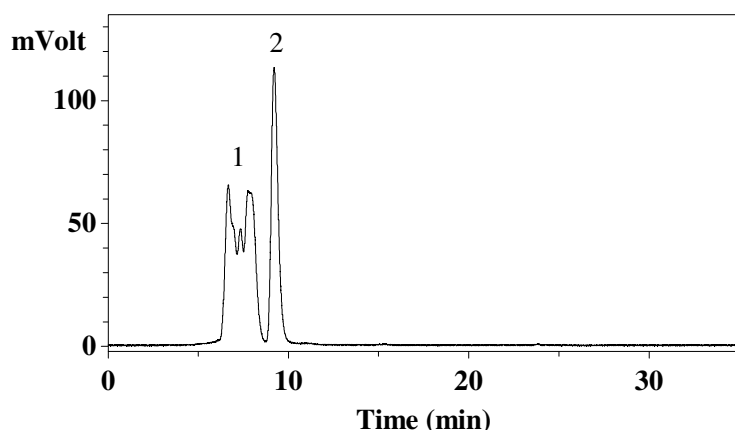


Abbildung 3-52 Koinjektion von  $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl und *RS,cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = Gruppe von *RS,cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether-Isomeren, 2 = repräsentiert das Derivat des naturidentischen *R,trans-trans*- $\gamma$ -Tocotrienols (RT 9,21 min). (vgl. Abbildung 3-44).

### 3.8.3.4 $\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl

Entsprechend dem Vorgehen bei  $\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl kann die am längsten retardierte Substanz (siehe Abbildung 3-53) durch Koinjektion als Derivat des naturidentischen *R,trans-trans*- $\delta$ -Tocotrienol-Methylethers identifiziert werden. Neben dem vom Palmöl abgeleiteten *R,trans-trans*- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether treten noch andere Substanzen auf, die in der Retentionszeit den anderen  $\delta$ -Tocotrienol-Methylether-Isomeren gleichen und die addiert immerhin 15 % der Gesamtpeakfläche ausmachen. In diesem Fall soll das Chromatogramm lediglich zur Bestimmung des *R,trans-trans*- $\delta$ -Tocotrienol-Methylethers in der derivatisierten Referenzsubstanz dienen und nicht weiter diskutiert werden, da im nachhinein nicht mehr ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei den verdächtigen Signalen auch um eine Verschleppung handeln könnte.



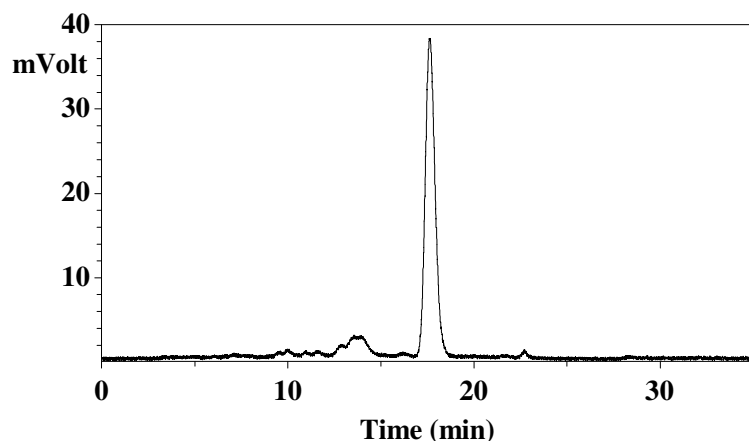


Abbildung 3-53 *R,trans-trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether*; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

RT 17,65 min;  $\delta$ -Tocotrienol wurde durch semipräparative HPLC (Diol-Phase) aus Palmöl isoliert und anschließend derivatisiert.

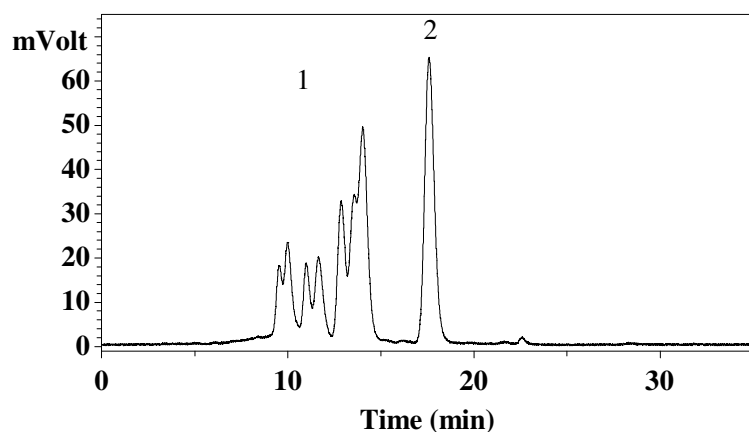


Abbildung 3-54 Koinjektion von  *$\delta$ -Tocotrienol-Methylether* aus Palmöl und *RS,cis/trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether*; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 = Gruppe von sieben *RS,cis/trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether*-Isomeren, 2 = identifiziert als Derivat des naturidentischen *R,trans-trans- $\delta$ -Tocotrienols* (RT 17,60 min). (vgl. Abbildung 3-45).

### 3.8.3.5 *$\alpha$ -Tocopherol aus Palmöl*

Die nachfolgende Abbildung 3-55 zeigt durch Koinjektion von aus Palmöl abgeleitetem *RRR, $\alpha$ -Tocopherol-Methylether* mit *all-rac- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether*, daß das als viertes eluierende Diastereomer *RRR, $\alpha$ -Tocopherol-Methylether* darstellt. Damit liegt das *RRR* Derivat in der Elutionsreihenfolge an gleicher Stelle wie Riss et al. bei einer leicht modifizierten HPLC-Methode bestimmt haben. Die Zuordnung der Diastereomere wird deshalb übernommen.

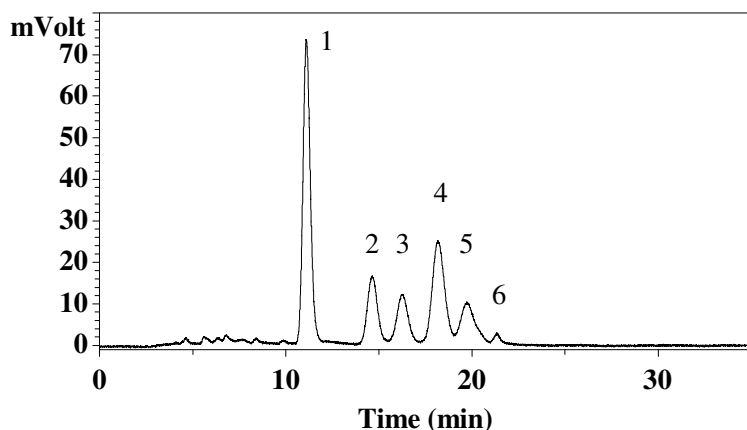


Abbildung 3-55 Koinjektion von *RRR*, $\alpha$ -Tocopherol-Methylether aus Palmöl und *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

$\alpha$ -Tocopherol wurde durch semipräparative HPLC (Diol-Phase) aus Palmöl isoliert und anschließend derivatisiert.

1 = SSS, SSR, SRS und SRR<sup>a</sup> (RT 11,09 min), 2 = RSS<sup>a</sup> (RT 14,63 min), 3 = RRS<sup>a</sup> (RT 16,28 min), 4 = Derivat des naturidentischen *RRR*-Diastomers (RT 18,19 min), 5 = RSR<sup>a</sup> (RT 19,72 min), 6 = nicht zuzuordnen (RT 21,32 min). (vgl. Abbildung 3-46).

<sup>a</sup>nach [ris 94]

### 3.8.4 Einfluß der Derivatisierung auf die Enantiomerentrennung

Vecchi et al. (vec 90) diskutierten bereits den Einfluß verschiedener O-substituierter *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherole auf die HPLC-Trennung mit einer selbst hergestellten chiralen Phase [Kieselgel belegt mit (+)-PTMA ((+)-Poly(triphenylmethacrylat)] und Acetonitril/Wasser (9:1, v/v) Eluent. Weder von dieser noch von einer anderen Arbeitsgruppe wurde bisher über eine HPLC-Trennung der Tocopherol-Stereoisomere ohne Derivatisierung berichtet [wei 96, kiy 95, ued 93]. 1991 wird zum ersten Mal über die Verwendung einer Cellulosecarbamat-Phase für die  $\alpha$ -Tocopherol-Stereoisomerentrennung berichtet [gli 91], worauf 1994 eine ausführliche Veröffentlichung folgte [ris 94], die die chirale Trennung der *Methylether*derivate beschreibt.

Daß man auf eine Derivatisierung auch im Falle der Tocotrienole nicht verzichten kann, hat sich durch eigene Versuche herausgestellt. Underivatisiertes synthetisches  $\alpha$ -Tocotrienol wurde beispielsweise kaum retardiert und verließ in einem breiten Peak mit sehr starkem Tailing (25 min) die Säule. Durch die Veretherung an der Hydroxygruppe des Chromanolrings entfällt die Fähigkeit der Tocotrienole, als Wasserstoff-Donor zu fungieren, wodurch die Wechselwirkungen des Analyten mit den funktionellen Gruppen der Carbamat-Phase eingeschränkt sind. Deshalb könnte durchaus eine Verkürzung der Retentionszeiten als Folge der Derivatisierung vorhergesagt werden und nicht eine Verlängerung. In diesem Zusammenhang soll nochmal auf Vecchi et al. [vec 90] hingewiesen werden. Der Gruppe erschienen die „relative Veränderungen der Retentionszeiten verschiedener Derivate ...

teilweise bizarr“, so daß sie „auf eine spekulative Interpretation der einzelnen Verschiebungen“ verzichten wollten.

### 3.8.5 Einfluß des 2-Propanol-Anteiles im Eluenten

Nach Herstellerangaben dürfen nur Hexan/2-Propanol- und Hexan/Ethanol-Gemische in beliebigen Anteilen für den Betrieb der Chiralphase Chiralcel OD-H verwendet werden. Dabei hat sich ausgehend von 100 % Isohexan erwiesen, daß das stärker polare 2-Propanol für die angestrebte Trennung der acht *RS,cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether-Isomere als starkes Elutionsmittel wirkt. Ohne Zusatz von 2-Propanol waren nach einer Laufzeit von 60 min sechs breite Peaks im Chromatogramm zu erkennen (siehe Abbildung 3-56). Bei einer mobilen Phase von Isohexan/2-Propanol im Verhältnis 90:10 (v/v) eluierten alle  $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether-Isomere praktisch ohne Retardierung (nicht abgebildet). Nach einer ausreichend langen Zeit der Äquilibration (4 h) konnte mit 0,1 % 2-Propanol in Isohexan eine Gruppe von 5 angetrennten Peaks von einem definierten, vorher eluierenden Peak abgetrennt werden (siehe Abbildung 3-57). Eine weitere Absenkung des 2-Propanol-Anteiles ergab eine insgesamt wesentlich bessere Trennung bei einer akzeptablen Erhöhung der Retentionszeiten. Dabei separierte sich der vorher nur als Schulter zu erkennende 2. Peak, und die beiden letzten Peaks in Abbildung 3-57 vereinigten sich zu *einem* Peak, der sich von den Nachbarpeaks in Basislinientrennung separierte. Wie in Abschnitt 3.8.3 ausgeführt, repräsentiert das Isomer mit der längsten Retentionszeit auch den *R,trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether, welcher ein Derivat des in der Natur vorkommenden  $\alpha$ -Tocotrienols darstellt. Dadurch, daß mit der Wahl des Eluenten 0,05 % 2-Propanol in Isohexan die *RS*-Enantiomere des natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomers getrennt werden konnten, ist sichergestellt, daß auch synthetische racemische  $\alpha$ -Tocotrienol-Präparate mit geometrisch naturidentischer Seitenkette (*RS,trans-trans*-) erkannt werden können.

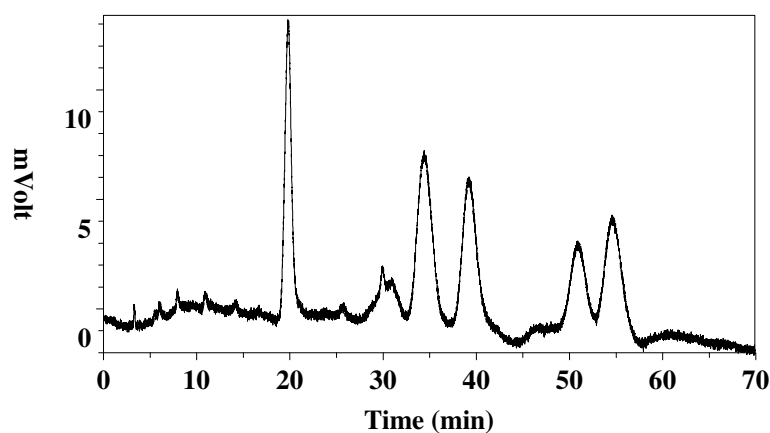


Abbildung 3-56 Die *RS,cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether-Isomere bei Elution mit 100 % Isohexan ohne Zusatz von 2-Propanol; HPLC-Trennung auf der Cellulose-carbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Die acht Isomere eluieren in sechs breiten Peaks.

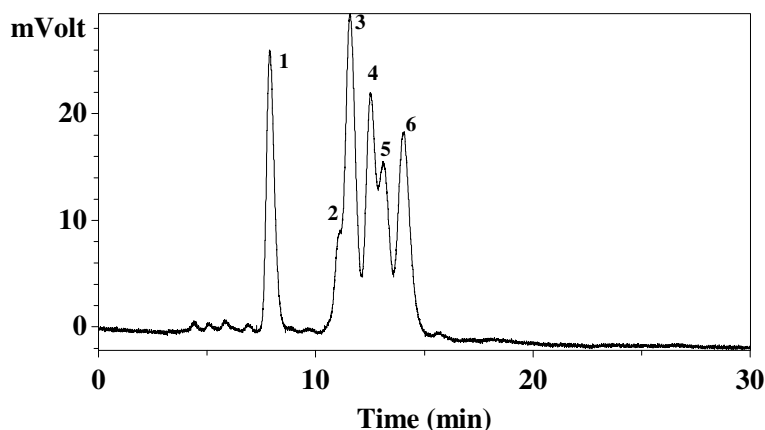


Abbildung 3-57 Erheblich verkürzte Retentionszeit der acht *RS,cis/trans-α-Tocotrienol-Methyl-ether-Isomere* bei einem Anteil von 0,1 % 2-Propanol in Isohexan als Eluent; HPLC-Trennung auf der Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Bei dem als Optimum gewählten Eluenten mit 0,05 % 2-Propanol separiert sich Peak 2, während Peak 5 und 6 koeluiieren (siehe Abbildung 3-42).

### 3.8.6 Prozentuale Verteilung der Enantiomere

Die nicht stereoselektive chemische Synthese der Tocotrienole läßt erwarten, daß das racemische Produkt zu gleichen Teilen aus dem S- und dem R-Enantiomer besteht. Mit der vorgestellten HPLC-Methode ist diese theoretische Überlegung nachvollziehbar. Der prozentuale Anteil eines jeden Enantiomers wurde über das Verhältnis der jeweiligen Peakflächen berechnet und liegt stets um 50 %.

	Prozentualer Anteil mit Standardabweichung des 1. Enantiomers	Prozentualer Anteil mit Standardabweichung des 2. Enantiomers	
cis-cis- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether	50,15 $\pm$ 0,71	49,85 $\pm$ 0,71	n = 7
cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (erhalten aus 2. Peak bei $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase)	50,56 $\pm$ 0,58	49,44 $\pm$ 0,58	n = 5
cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (erhalten aus 3. Peak bei $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase)	50,57 $\pm$ 0,98	49,43 $\pm$ 0,98	n = 5
trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol	50,84 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	49,16 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	n = 6

<sup>a</sup>identifiziert als S-Enantiomer

<sup>b</sup>identifiziert als R-Enantiomer

### 3.8.7 Abschätzung der Nachweisgrenze für *RS,cis/trans-α-Tocotrienol-Methylether*

Bei einer Konzentration von 1,2 mg/L *RS,cis/trans-α-Tocotrienol-Methylether* weist die in ihre Isomere getrennte Referenzsubstanz bei Fluoreszenz-Detektion noch Peakhöhen in der 3 - 5fachen Höhe des Grundrauschens auf. Für die einzelnen Isomere können Nachweisgrenzen von 1/4 bis 1/8 dessen, wie für die Vergleichssubstanz als Summe der Isomere bestimmt, angenommen werden. Im untersuchten Bereich von 1,2 - 12 mg/L *RS,cis/trans-α-Tocotrienol-Methylether* besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen Detektorsignal und Konzentration.

Geradengleichung:  $y = 6,061 x + 2,277$

mit:  $y =$  Summe der Peakflächen aller *RS,cis/trans-α-Tocotrienol-Methylether* Isomere

$x =$  Konzentration der  $\alpha$ -Tocotrienol-Referenzsubstanz in mg/L

Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9959$

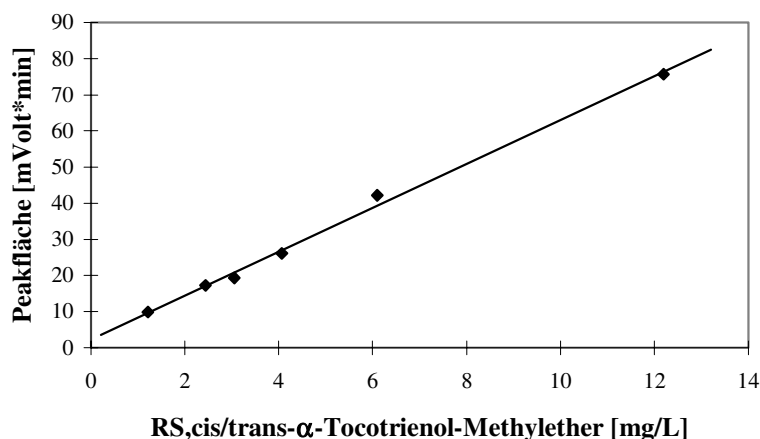


Abbildung 3-58 Kalibriergerade und Abschätzung der Nachweisgrenze für RS,cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether.

### 3.8.8 Bedeutung der Ergebnisse

Mit der hier vorgestellten Analytik wird erstmals die chirale HPLC-Trennung der möglichen Stereoisomere von synthetischen Tocotrienolen beschrieben. Am Beispiel von  $\alpha$ -Tocotrienol wurde demonstriert, daß alle *cis/trans*-Isomere sich sehr deutlich in ihre Enantiomere trennen lassen. In einem Gemisch der acht möglichen Isomere ist durch ein Vergleich mit Tocotrienolen natürlichen Ursprungs das Derivat des *R,trans-trans*-Isomers identifiziert worden.

Für komplexe Matrices ist Voraussetzung, die Tocotrienole zuerst durch semipräparative HPLC (Diol-Phase) aus der Lipidfraktion bzw. aus dem Extrakt des Unverseifbaren zu isolieren. Daran schließt sich je nach Anspruch eine präparative HPLC-Trennung (permethylierte Cyclodextrin-Phase) der Tocotrienole in ihre *cis/trans*-Isomere an. Verzichtet man nicht auf das zweite HPLC-Säulensystem, dann kann jedes einzelne der acht RS,*cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere letztlich mit Hilfe der Cellulosecarbammat-Phase bestimmt werden. Das könnte z. B. dazu benutzt werden, die Bioverfügbarkeit und den Transport synthetischer Tocotrienolpräparate im Organismus detailliert zu verfolgen, so daß physiologische Studien nach dem Vorbild der *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherole möglich werden. Werden die Tocotrienole vor der chiralen Trennung nicht in ihre geometrischen Seitenkettenisomere separiert, so ist doch zumindest aus der Anzahl der Peaks auf der Cellulosecarbammat-Phase zu entnehmen, daß es sich um ein synthetisches Präparat handelt, das mehr als die vier möglichen Seitenkettenisomere aufweist. Für eine Antwort auf die Frage, ob RS,*cis/trans*-Isomere in einer Probe enthalten sind, kann diese zeitsparende Variante gewählt werden. Auch als synthesebegleitende Analytik bei der Herstellung stereospezifischer Tocotrienole ist diese Methode anwendbar.

## 4 Experimenteller Teil

### *Allgemeine Angaben*

**Referenzsubstanzen.** DL- $\alpha$ -Tocotrienol, DL- $\beta$ -Tocotrienol, DL- $\gamma$ -Tocotrienol, DL- $\delta$ -Tocotrienol, mit einer zertifizierten Reinheit von jeweils 100 % (HPLC), (Tocotrienol-Kit mit je 50 mg, Merck, Nr. 1.108524); DL- $\alpha$ -Tocopherol, DL- $\beta$ -Tocopherol, DL- $\gamma$ -Tocopherol, DL- $\delta$ -Tocopherol (Tocopherol-Kit mit je 50 mg, Merck, Nr. 1.15496)

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden die Referenzsubstanzen zuerst in 2-Propanol p.a. (Merck, Nr. 109634) gelöst und dann mit 2-Propanol p.a. zur Marke aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurden weitere Verdünnungen in Acetonitril gradient grade (Merck, Nr. 100030) oder n-Hexan LiChrosolv (Merck, Nr. 104391) hergestellt, je nachdem für welche HPLC-Methode die Verdünnung gebraucht wurde. Tocol (freundlicherweise überlassen von Eisai Co., Ltd., Tokyo) wurde als interner Standard benutzt.

Referenz- und Probelösungen wurden bei -18 °C unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt. Während der Lagerung und bei Verwendung der Lösungen wurden sie vor Licht geschützt, indem Braunglas- oder mit Alufolie umwickelte Gefäße benutzt oder bei größtmöglicher Dunkelheit mit ihnen hantiert wurden.

In regelmäßigen Abständen wurden die Konzentrationen der Stammlösungen nach einer Verdünnung von ca. 1:5 mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Dazu wurden die Angaben nach Tabelle 1-3 benutzt, wobei jedoch in 2-propanolischer Lösung mit 0,5 cm Küvetten gemessen wurde. Die Lösungen waren unter den angegebenen Bedingungen mindestens sechs Monate stabil.

Bei der Probenaufarbeitung unter Verwendung des Rotationsverdampfers wurde die evakuierte Apparatur mit Stickstoff belüftet und Lösungsmittelreste bei Bedarf im Stickstoffstrom entfernt.

Das benutzte Wasser hatte Millipore 18 M $\Omega$  Qualität.

HPLC-Eluenten wurden nach dem Mischen im Ultraschallbad unter Vakuum entgast.

## 4.1 HPLC-Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen

### 4.1.1 Analytische Trennung auf der Diol-Phase

#### 4.1.1.1 Chemikalien

n-Hexan ROTISOLV HPLC (Carl Roth GmbH + Co, Nr. 7339.1), über Nacht über Natriumsulfat getrocknet und abfiltriert; tert-Butylmethylether für die HPLC (Fluka, Nr. 20247), BHT (Sigma, Nr. B1378), Natriumsulfat gegläht (2 h bei 500 °C)

#### 4.1.1.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	Knauer, Typ 6400 30 VA
Autosampler	Spark 125
Injektionsvolumen:	20 µL
Eluent:	n-Hexan/tert-Butylmethylether (96:4 v/v) mit 20 mg/L BHT, isokratisch
Flußrate:	1,3 mL/min
HPLC-Kartusche:	LiChrospher-100 Diol 5 µm (Partikelgröße 5 µm) in Kartusche LiChroCART 250-4 (250 × 4 mm ID, Merck, Nr. 50836) mit Vorkartusche LiChroCART 4-4 (4 × 4 mm ID, Merck, Nr. 50960)
Detektor:	Fluorescence Detector LC 240 (Perkin Elmer)
Detektion:	Emissionswellenlänge: 330 nm Anregungswellenlänge : 295 nm Messung: Faktor 1024
HPLC-Software:	Knauer, EuroChrom 2000, edition v1.2
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 3 mg/L in n-Hexan

#### 4.1.1.3 Kalibriergeraden der Tocopherole und Tocotrienole

Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurde eine Mischung mit bekannten Konzentrationen aller acht Tocopherole und Tocotrienole hergestellt und entsprechend mit n-Hexan verdünnt. Alle Verdünnungsstufen enthielten den internen Standard Tocol in der immer gleichbleibenden Konzentration von 4,0 mg/L. Dieser Zusatz wird später bei der Methode des internen Standard berücksichtigt.

Für die unten dargestellten Kalibrierkurven ist der Detektor-Response jeweils linear (siehe Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2). Die Werte für  $\delta$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocotrienol verlassen jedoch im Vergleich zu den anderen Vitaminen schon bei niedrigeren Konzentrationen den Bereich der Linearität (2 mg/L bzw. 6 mg/l). Den Graphiken ist auch zu entnehmen, daß sich die Fluoreszenz-Detektor-Response für die verschiedenen Vitamere z. T. beträchtlich unterscheiden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem von Thompsen und Hatina [tho 79], wonach die verschiedenen Formen von Vitamin E ähnliche Response gegeben haben. Viele nachfolgenden Untersuchungen haben sich auf dieses Ergebnis berufen [tho 79, tay 81, leh 82, cor 83, pii 84, gut 84, ram 85, poc 88, hog 89, bud 95]. In letzter Zeit

wurde allerdings in einzelnen Publikation von Unterschieden sowohl im Fluoreszenz-Detektor- [cha 94, kra 97], als auch im Evaporative Light-Scattering-Detektor-Response [war 90] für die verschiedenen Tocopherole berichtet. Abweichend von Kramer et al. [kra 97] erhöht sich nach der vorliegenden Arbeit die Steigung der jeweiligen Kalibriergeraden nicht in der Reihenfolge  $\alpha$ -T <  $\beta$ -T <  $\gamma$ -T <  $\alpha$ -T<sub>3</sub> <  $\delta$ -T, sondern wie aus Tabelle X abzulesen ist. Ebenfalls nach [kra 97] ist die Linearität der Kalibrierkurve für die Tocopherole und für  $\alpha$ -Tocotrienol im Bereich von 10 - 100 ng gegeben, das entspricht auf die hier verwendete Methode übertragen einer Konzentration von 0,5 - 5 mg/L. Von  $\delta$ -Tocopherol wurde dieser Bereich hier unterschritten, während die übrigen Vitamere, außer  $\gamma$ -Tocotrienol, bis zur höchsten verwendeten Kalibrierkonzentration Linearität aufwiesen.

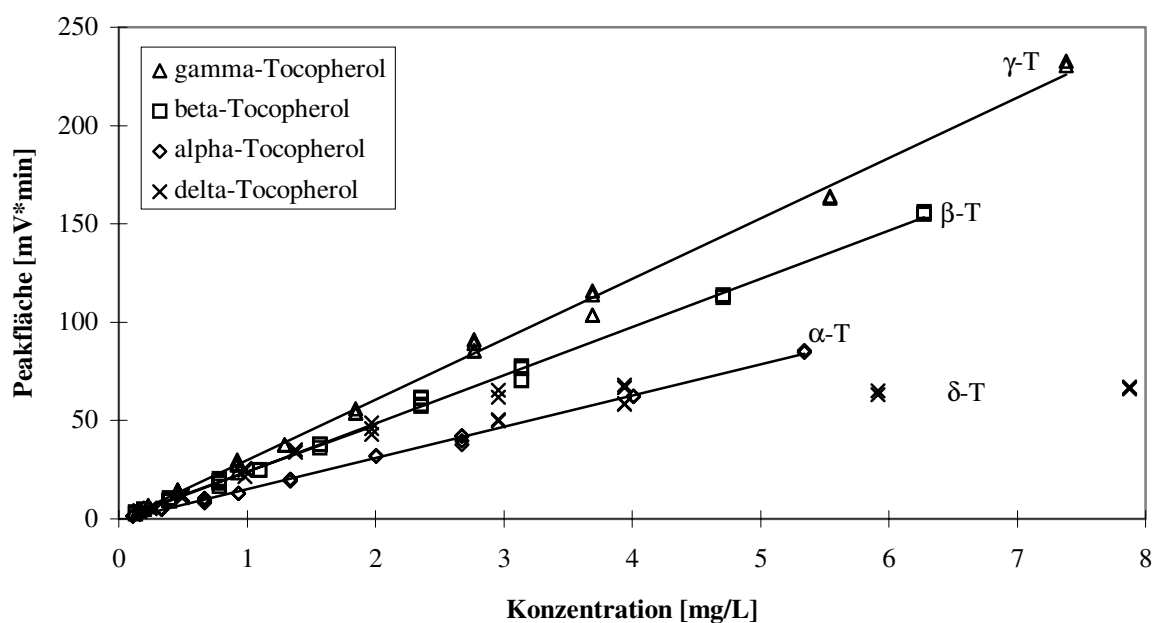


Abbildung 4-1 Graphische Darstellung der Kalibriergeraden der Tocopherole; analytische HPLC-Trennung auf der Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.



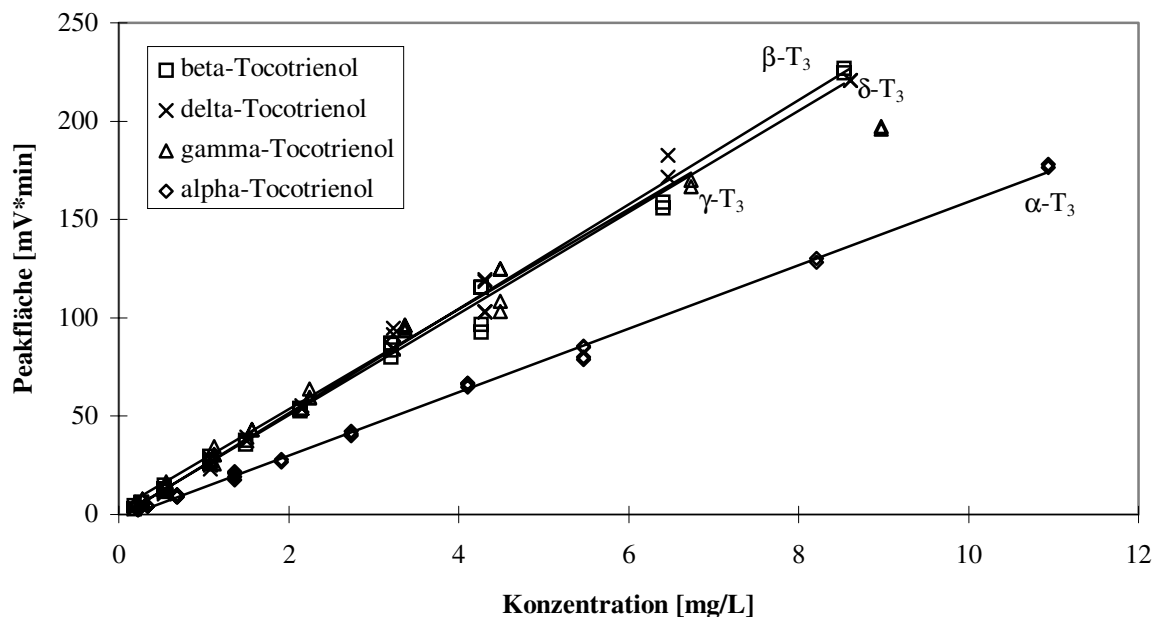


Abbildung 4-2 Graphische Darstellung der Kalibriergeraden der Tocotrienole; analytische HPLC-Trennung auf der Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Tabelle 4-1 Formeln der Kalibriergeraden der Tocopherole und Tocotrienole; HPLC-Trennung mit der analytischen Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion

Substanz	Kalibriergerade, mit $y = \text{Peakfläche [mV} \times \text{min]}$ , $x = \text{Konzentration [mg/L]}$		Bestimmtheits- maß $R^2$	oberer Bereich der Linearität
	Steigung	Schnittpunkt y-Achse		
$\alpha$ -Tocopherol	$y = 15,86 x$	- 0,827	0,9978	5 mg/L
$\beta$ -Tocopherol	$y = 24,51 x$	- 0,479	0,9972	6 mg/L
$\gamma$ -Tocopherol	$y = 30,76 x$	- 0,945	0,9963	7 mg/L
$\delta$ -Tocopherol	$y = 23,68 x$	+ 0,287	0,9894	2 mg/L
$\alpha$ -Tocotrienol	$y = 16,14 x$	- 2,266	0,9978	10 mg/L
$\beta$ -Tocotrienol	$y = 25,79 x$	- 1,042	0,9929	8 mg/L
$\gamma$ -Tocotrienol	$y = 25,39 x$	+ 2,679	0,9887	6 mg/L
$\delta$ -Tocotrienol	$y = 26,51 x$	- 1,518	0,9941	8 mg/L

Bei den angegebenen Bedingungen liegen die Nachweisgrenzen für alle Vitamin E Homologen bei ca. 0,1 mg/L (2 ng/20  $\mu$ L Injektionsvolumen) (dreifache Höhe des Grundrauschens) und die Bestimmungsgrenze bei ca 0,2 mg/L (4 ng/20  $\mu$ L Injektionsvolumen) (fünffache Höhe des Grundrauschens). Balz et al. ermittelten die gleichen Nachweisgrenzen [bal 93].

#### 4.1.1.4 Formeln zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des internen Standards Tocol

Wegen der größeren Ähnlichkeit mit den zu bestimmenden Substanzen wurde auch rac-5,7-Dimethyl-tocol (Matreya, Inc., Nr. 1074) als interner Standard getestet. Jedoch koeluierten bei einem Versuch  $\alpha$ -Tocotrienol und rac-5,7-Dimethyltocol partiell und ließen sich auch durch einen verminderten Anteil an tert-Butylmethylether im Eluenten nicht vollständig trennen. Ferner wurde auch über Sesamol [run 89] und Betulin [loz 93] als internem Standard, letzteres in Kombination mit refraktometrischem HPLC-Detektor, berichtet.

Tocol unterscheidet sich von den Tocotrienolen darin, daß es wie die Tocopherole keine Doppelbindungen in der Seitenkette und an 5,7,8-Stellung im Chromanring keine Methylgruppen aufweist. Im HPLC-Chromatogramm trennt es sich von den Tocopherolen und Tocotrienolen vollständig ab. Bereits 1987 stellten Ueda und Igarashi [ued 87] allerdings fest, daß Tocol als interner Standard ungeeignet ist, wenn er bei der Probenaufarbeitung vor der Verseifung zugegeben wird, da er sich bei der anschließenden Extraktion der Tocopherole anders verhält. Die unten aufgeführten Formeln für Kalibriergeraden gehen deshalb davon aus, daß Tocol in der Meßlösung in der immer gleich bleibenden Konzentration von 4,0 mg/L eingesetzt wird. Zur Erstellung von Kalibriergeraden wurde Tocol zusammen mit verschiedenen bekannten Konzentrationen aller acht Tocopherole und

Tocotrienole eingespritzt und für jedes Vitamin der Quotient 
$$\frac{\text{Peakfläche [mVolt} \times \text{min]}_{T/T_3\text{-Standard}}}{\text{Peakfläche [mVolt} \times \text{min]}_{\text{Tocol (4mg/L)}}$$

errechnet. Im angegebenen Konzentrationsbereich des zu bestimmenden Analyten ergibt sich daraus ein linearer Zusammenhang zwischen Quotient und Konzentration.

Tabelle 4-2 Formeln der Kalibriergeraden für Tocopherole und Tocotrienole zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des internen Standards; HPLC-Trennung mit der analytischen Diol-Phase

Substanz	Kalibriergerade, mit		Bestimmtheitsmaß $R^2$	oberer Bereich der Linearität
	$y = \frac{\text{Peakfläche [mVolt} \times \text{min]}_{T/T_3\text{-Standard}}}{\text{Peakfläche [mVolt} \times \text{min]}_{\text{Tocol (4mg/L)}}$ $x = \text{Konzentration [mg/L]}$			
	Steigung	Schnittpunkt y-Achse		
$\alpha$ -Tocopherol	y = 0,151 x	- 0,010	0,9849+	4 mg/L
$\beta$ -Tocopherol	y = 0,244 x	- 0,021	0,9919	5 mg/L
$\gamma$ -Tocopherol	y = 0,303 x	- 0,029	0,9939	6 mg/L
$\delta$ -Tocopherol	y = 0,223 x	- 0,002	0,9919	2 mg/L
$\alpha$ -Tocotrienol	y = 0,159 x	- 0,035	0,9924	8 mg/L
$\beta$ -Tocotrienol	y = 0,230 x	+ 0,001	0,9940	5 mg/L
$\gamma$ -Tocotrienol	y = 0,265 x	- 0,0162	0,9956	7 mg/L
$\delta$ -Tocotrienol	y = 0,249 x	- 0,022	0,9951	6 mg/L

## 4.1.2 Semipräparative Trennung mit der Diol-Phase

### 4.1.2.1 Chemikalien

n-Hexan ROTISOLV HPLC (Carl Roth GmbH + Co, Nr. 7339.1), destilliert; tert-Butylmethylether für die HPLC (Fluka, Nr. 20247), frisch destilliert.

Die Destillation dieser als Eluent verwendeten Lösungsmittel ist wichtig, um fluoreszenzaktive Stoffe im Eluenten zu vermeiden. Sie werden zusammen mit den semipräparativ isolierten Komponenten beim Abrotieren des Lösungsmittels konzentriert und stören empfindlich die nachfolgende analytische HPLC-Methode mit der  $\beta$ -PM Cyclodextrin-Phase.

### 4.1.2.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	Knauer, Typ 6400 30 VA
Injektionsvolumen:	100 $\mu$ L
Eluent:	n-Hexan/tert-Butylmethylether (92:8 v/v, wenn nicht anders angegeben), isokratisch
Flußrate:	3,5 mL/min
HPLC-Säule:	LiChrospher-100 Diol 250-8 5 $\mu$ m (Partikelgröße 5 $\mu$ m, 250 $\times$ 8 mm ID; Knauer, Nr. B23Y277) mit Vorsäule LiChrospher-100 Diol 30-8 5 $\mu$ m (Partikelgröße 5 $\mu$ m, 30 $\times$ 8 mm ID; Knauer, Nr. B26Y277)
Detektor:	Fluorescence Detector LC 240 (Perkin Elmer)
Detektion:	Emissionswellenlänge: 330 nm Anregungswellenlänge : 295 nm Messung: Faktor 1024
HPLC-Software:	Knauer, EuroChrom 2000, edition v1.2
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 5 mg/L in n-Hexan

In der Auslaßkapillare des Fluoreszenz-Detektors wurde ca. 10 cm hinter der Detektorzelle ein Drei-Wege-Hahn eingebaut, um die entsprechenden getrennten Fraktionen entnehmen zu können.

## 4.2 HPLC-Trennung der *cis/trans*-Tocotrienole

### 4.2.1 Analytische Trennung mit der RP18-Phase (Multimethode)

#### 4.2.1.1 Chemikalien

LiChrosolv Methanol gradient grade für die Chromatographie (Merck, Nr. 106007), Citronensäure (Sigma, Nr. C 0759), TEAOH (als 20 %ige wäßrige Lösung, Sigma, Nr. T 6393)

#### 4.2.1.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	LaChrom pump L-7100 (Merck Hitachi)			
Injektionsvolumen:	20 µL			
Eluent A:	Methanol/Wasser/ 2 mol/L Citronensäure/ TEAOH 20 %ig (50:50:0,5:0,5, v/v/v/v)			
Eluent B:	Methanol/ 2 mol/L Citronensäure/ TEAOH 20 %ig (100:1,0:0,2, v/v/v)			
Gradientenprogramm mit jeweils linearem Anstieg:	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Flußrate [ml/min]
	0	40	60	0,7
	0,5	37	63	0,7
	0,6	33	67	0,7
	7,5	33	67	0,7
	7,6	10	90	0,7
	16,0	10	90	0,7
	16,1	0	100	1,0
	30,0	0	100	1,0
	35,0	40	60	0,7
HPLC-Kartusche:	LiChroCart 250 ×4 mm ID, gefüllt mit Superspher 100 RP-18, (Partikelgröße 4 µm, Merck, Nr. 1.16056) mit Vorkartusche LiChroCart 25 × 4 mm ID, gefüllt mit Superspher 100 RP-18, (Partikelgröße 4 µm, Merck, Nr. 1.16039)			
Detektor:	Amperometric Detector L-3500 A (Merck Recipe)			
Detektion:	Potential: + 0,800 V vs. Ag/AgCl Filter: 5 sec., dBOct: 60 Range out: 5,0 nA			
Integrator:	C-R1A Chromatopac (Shimadzu)			
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 0,25 mg/L in Eluent B			

### 4.2.2 Analytische Trennung mit der RP18-Phase (Schwerpunkt *cis/trans*-Isomere)

#### 4.2.2.1 Chemikalien

LiChrosolv Methanol gradient grade für die Chromatographie (Merck, Nr. 106007), Citronensäure (Sigma, Nr. C 0759), TEAOH (als 20 %ige wäßrige Lösung, Sigma, Nr. T 6393)

#### 4.2.2.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	LaChrom pump L-7100 (Merck Hitachi)		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Stamm-Eluent	Methanol/2 mol/L Citronensäure/ TEAOH 20 %ig (100:1,0:0,2, v/v/v)		
Eluent A:	Stamm-Eluent/Wasser 96:4 (v/v)		
Eluent B:	Stamm-Eluent/Wasser 90:10 (v/v)		
Gradientenprogramm mit jeweils linearem Anstieg:	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	10	90
	10	60	40
	30	60	40
Flußrate:	1,0 mL/min		
HPLC-Kartusche:	LiChroCart 250 ×4 mm ID, gefüllt mit Superspher RP-18, (Partikelgröße 4 µm, Merck, Nr. 1.16056) mit Vorkartusche LiChroCart 25 × 4 mm ID, gefüllt mit Superspher RP-18, (Partikelgröße 4 µm, Merck, Nr. 1.16039)		
Detektor:	Fluoreszenz Detektor LaChrom FL-detector L-7480 (Merck Hitachi)		
Detektion:	Emissionswellenlänge: 330 nm Anregungswellenlänge : 280nm		
Integrator:	Typ D-7500 (Merck Hitachi)		
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 2-4 mg/L in Methanol		

#### 4.2.2.3 Probenaufarbeitung

Mit Antioxidantien (Tocopherolen und Tocotrienolen, Ascorbylpalmitat, Gallussäurelaurylester, BHA, BHT) und antioxidativ wirksamen Gewürzextrakten (Thymian- und Rosmarinextrakt) dotierte Mettbällchen werden in heißem Wasser gegart und nach dem Abkühlen gefriergetrocknet. 500 mg der homogenisierten gefriergetrockneten Probe werden mehrmals mit Methanol extrahiert und die vereinigten Extrakte auf ein Volumen von 25 mL gebracht. Diese Probelösung wird durch Festphasenextraktion für die HPLC vorbereitet.

Festphasenkartusche: LiChrolut RP-18 (500 mg) (Merck, Nr. 1.02023)

Konditionieren der Kartusche: 5 mL Methanol, dann 2 × 5 mL Wasser

Probenaufgabe: 2 mL Probelösung mit 6 mL Wasser mischen und langsam durch die Säule drücken

Elution: mit 4 mL Methanol in einen 5 mL Meßkolben, dann mit Methanol zur Marke auffüllen

Die Lösung kann direkt für die HPLC-Bestimmung eingesetzt werden.

Die Wiederfindungsrate der Tocopherole und Tocotrienole nach der Extraktion aus der Probenmatrix liegt nach dieser Methode nur bei 22 %, während die der Gewürzextraktinhaltsstoffe bei 92-98 % liegt. Für eine quantitative Bestimmung des Vitamin E sollte deshalb ein weniger polares Extraktionsmittel gewählt werden.

Die Wiederfindungsrate der Tocopherole und Tocotrienole mittels Festphasenextraktion liegt dagegen für alle Vitamere bei  $\geq 96\%$ .

### 4.2.3 Präparative Trennung mit der RP18-Phase

#### 4.2.3.1 Chemikalien

LiChrosolv Methanol gradient grade für die Chromatographie (Merck, Nr. 106007), Citronensäure (Sigma, Nr. C 0759), TEAOH (als 20 %ige wäßrige Lösung, Sigma, Nr. T 6393)

#### 4.2.3.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	Typ 364.00 (Knauer) mit präparativem Pumpenkopf
Injektionsvolumen:	250 $\mu\text{L}$
Eluent:	Methanol/2 mol/L Citronensäure/TEAOH 20 % (100:1:0,2, v/v/v), isokratisch
Flußrate:	4,4 mL/min
HPLC-Säulen:	Zwei Superspher RP-18 (250 $\times$ 10 mm ID. Partikelgröße 4 $\mu\text{m}$ , Merck) über kurzes Kapillärstück gekoppelt
Detektor:	UV Variable Wavelength Monitor (Knauer)
Detektion:	280 nm absorbance range: 0,02
Peak-Detektor:	3 Valves Peak Detector (Knauer)
Schreiber:	z. B. Linseis
Konzentration der $\alpha$ -Tocotrienol-Referenzsubstanz::	ca. 500 mg/L Eluent

### 4.2.4 Analytische Trennung mit der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase

#### 4.2.4.1 Chemikalien

Acetone SupraSolv (Merck, Nr. 100012); Acetonitril gradient grade (Merck, Nr. 100030)

#### 4.2.4.2 Chromatographische Bedingungen

siehe auch [dro 98]

HPLC-Pumpe:	LaChrom pump L-7100 (Merck Hitachi)
Injektionsvolumen:	20 $\mu\text{L}$ , wenn nicht anders angegeben
Eluent:	Acetonitril/Water (58:42 v/v), isokratisch
Flußrate:	0,8 mL/min
HPLC-Säulen:	Zwei in Reihe geschaltete ET 200/4 NUCLEODEX $\beta$ -PM (je 200 $\times$ 4 mm ID., gefüllt mit einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase, Macherey-Nagel, Nr. 720125)

**4.2.4.3 Fluoreszenz-Detektion**

Detektor:	Fluoreszenz Detektor LaChrom FL-detector L-7480 (Merck Hitachi)
Detektion:	Emissionswellenlänge: 330 nm Anregungswellenlänge: 295 nm
Integrator	Typ D-7500 (Merck Hitachi)
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 20 mg/L in Acetonitril.

**4.2.4.4 Amperometrische Detektion**

Detektor:	Amperometric Detector L-3500 A (Merck Recipe)
Detektion:	Potential: + 0,700 V vs. Ag/AgCl Filter: 2 sec., dBOct: 60 Range out: 1,0 nA, wenn nicht anders angegeben
Integrator	C-R1A Chromatopac (Shimadzu)
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 1 mg/l in Acetonitril

**4.2.4.5 Ermittlung des geeigneten Potentials für die elektrochemische Detektion**

$\alpha$ -Tocotrienol in immer gleichbleibender Konzentration von 2,1 mg/L wurde mit dem beschriebenen System in die vier Seitenkettenisomere getrennt und der Response in Abhängigkeit verschiedener angelegter Potentiale ermittelt (siehe Abbildung 4-3). Dabei ergab sich, daß der Response des *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomers stärker vom angelegten Potential abhängt, als die anderen Isomere und ein deutliches Maximum bei + 0,700 V (vs. Ag/AgCl) aufweist.

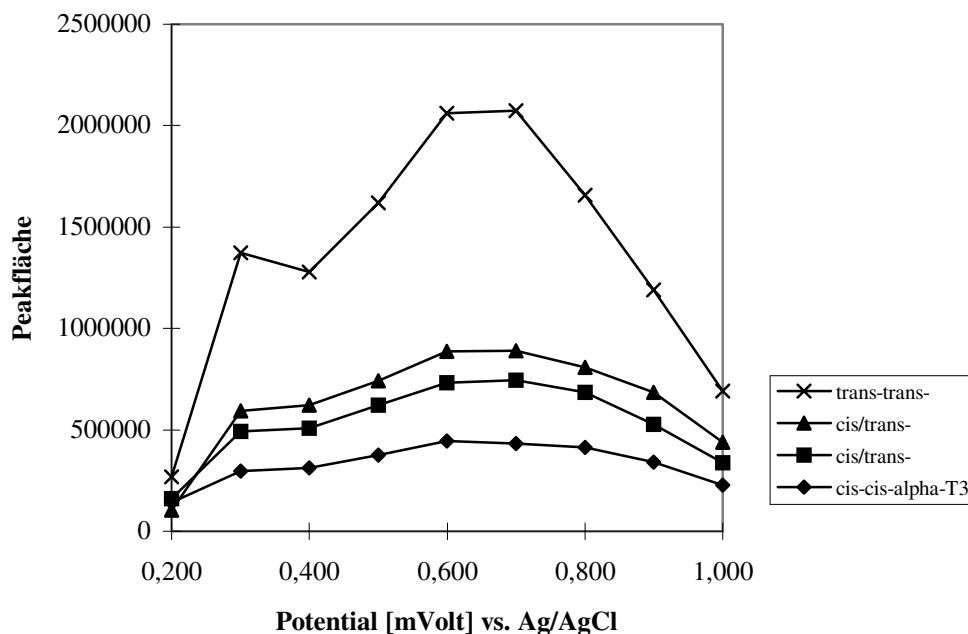


Abbildung 4-3 Abhängigkeit des Detektor-Responses vom angelegten Potential für die vier Seitenkettenisomere von  $\alpha$ -Tocotrienol (2,1 mg/L)

#### 4.2.4.6 Kalibriergeraden für $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere und Abschätzung ihrer Nachweisgrenze

Da sich die automatische Peakflächenbestimmung mit dem zur Aufzeichnung verwendeten Integrator als problematisch erwiesen hat, wurden für die nachfolgende Bestimmung die Peakhöhen zugrundegelegt und je nach Integratorabschwächung passend für 4 mV/FullScale multipliziert. Im Bereich von 1 - 22 mg/L besteht unter den beschriebenen HPLC-Bedingungen eine lineare Abhängigkeit zwischen Detektorresponse und Peakhöhe. Die Nachweisgrenze für  $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere liegt bei ca. 0,08 mg/L (1,6 ng/20  $\mu$ L Injektionsvolumen) mit Peakhöhen vom Dreifachen des Grundrauschens, die Bestimmungsgrenze bei ca. 0,5 mg/L (10 ng/20  $\mu$ L) mit Beginn der Linearität. Bis zur untersuchten  $\alpha$ -Tocotrienol-Konzentration von 22 mg/L ist die Linearität gegeben.

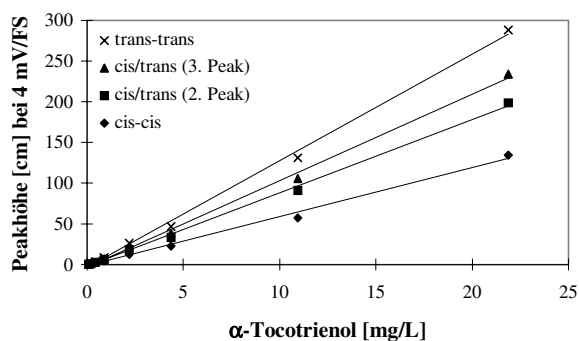


Abbildung 4-4 Kalibriergeraden für  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere bei amperometrischer Detektion bei + 0,700 V (vs. Ag/AgCl).

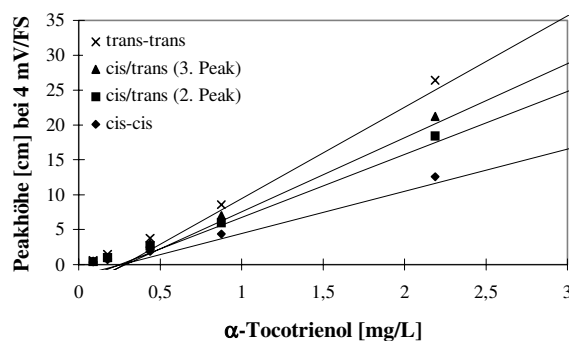


Abbildung 4-5 Ausschnitt aus Abbildung 4-4



## 4.2.5 Präparative Trennung mit der $\beta$ -Cyclodextrin-Phase

### 4.2.5.1 Chemikalien

Acetonitril zur Analyse (Merck, Nr. 100003)

### 4.2.5.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	Typ 364.00 (Knauer) mit präparativem Pumpenkopf
Injektionsvolumen:	250 $\mu$ L
Eluent:	Acetonitril/Wasser (60:40 v/v), isokratisch
Flußrate:	6,5 mL/min
HPLC-Säule:	VP 250/10 NUCLEODEX $\beta$ -PM (250 $\times$ 10 mm ID, gefüllt mit einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase, Macherey-Nagel, Nr. 715845)
UV-Detektor:	Variable Wavelength Monitor (Knauer)
UV-Detektion:	230 nm absorbance range: 0,005
Peak-Detektor:	3 Valves Peak Detector (Knauer)
Schreiber:	Kompensograph III (Siemens)
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 2,0 g/L in 2-Propanol

Die vier eluierenden *cis/trans*-Isomere wurden getrennt gesammelt. Die korrespondierenden Eluate wurden in einem Braunglas-Spitzkolben vereinigt und nach Erreichen der benötigten Substanzmenge im Rotationsverdampfer (max. 75 °C Wasserbadtemperatur) bis fast zur Trockne einrotiert.

## 4.2.6 HPLC-Trennung mit der Silberionen-Phase

### 4.2.6.1 Chemikalien

n-Hexan, 2  $\times$  destilliert; Acetonitril ROTISOLV (Carl Roth, Nr. 7330.2)

n-Hexan wurde aus wirtschaftlichen Gründen destilliert und nicht, weil es für die Chromatographie nötig erscheint.

### 4.2.6.2 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	LaChrom pump L-7100 (Merck Hitachi)
Injektionsvolumen:	20 $\mu$ L
Eluent A:	n-Hexan
Eluent B:	1,5 % Acetonitril in n-Hexan <sup>a</sup> , täglich frisch hergestellt

<sup>a</sup>Mischung der Phasen kann durch sorgfältiges Schütteln und Ultraschallbehandlung erreicht werden. Nach Adlof [adl 94] ist bei einem Anteil von über 1,5 % Acetonitril in n-Hexan die Löslichkeitsgrenze erreicht.

Gradientenprogramm mit jeweils linearem Anstieg:	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	70	30
	10	60	40
	25	60	40
	60	30	70
	100	30	70
Flußrate:	1,5 mL/min		
HPLC-Säule:	Chromspher 5 Lipids 250 × 4,6 mm ID (Partikelgröße 5 µm, Silberionen-Phase; Chrompack, Nr. 28313)		
Detektor:	Fluoreszenz Detektor LaChrom FL-detector L-7480 (Merck Hitachi)		
Detektion:	Emissionswellenlänge: 330 nm Anregungswellenlänge: 295 nm		
Integrator:	Typ D-7500 (Merck Hitachi)		
Konzentration der Tocotrienol-Referenzsubstanzen:	ca. 12 mg/L		

### 4.3 Spektroskopische Charakterisierung der *cis/trans*-Tocotrienole

#### 4.3.1 Massenspektrometrie

##### 4.3.1.1 Meßlösung

Nach der Methode „Präparative Trennung mit der RP18-Phase“ (siehe 4.2.3) wurden insgesamt ca. 350 µg  $\alpha$ -Tocotrienol in zwei Fraktionen getrennt: die erste in der präparativen HPLC als Doppelpeak und die zweite als größerer Peak erscheinende Fraktion. Die Fraktionen wurden jeweils auf ca. 3 mL am Rotationsverdampfer eingengt (Wasserbadtemperatur max. 55 °C). Die Eluenten-Salze (präparative HPLC) wurden aus den Fraktionen folgendermaßen durch Festphasenextraktion entfernt:

Kartusche: LiChrolut RP-18 (500 mg, Merck, Nr. 1.02023)  
 Konditionierung 2 mL Methanol zur Analyse (Merck, Nr. 1.06009), danach 5 mL Wasser  
 :  
 Probenaufgabe: Probelösung mit der dreifachen Menge Wasser versetzen und langsam durch die Kartusche drücken  
 Waschen: mit 5 mL Wasser  
 Elution: mit 3 mL Methanol

Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer einrotiert (Wasserbadtemperatur max. 55 °C) und in 100 µL Methanol gradient grade aufgenommen.

##### 4.3.1.2 Geräteparameter

Die EI-Massenspektren wurden auf einem Massenspektrometer (Spectrometer SSQ 710, Finnigan MAT) mit Particle Beam Interface bei 70 eV im Direkteinlaß aufgenommen.

## 4.3.2 $^1\text{H-NMR}$

### 4.3.2.1 *Meßlösung*

Nach der Methode „Präparative Trennung mit der permethylierten Cyclodextrin Phase“ (siehe 4.2.5) wurden insgesamt ca. 3500  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Tocotrienol in die vier Fraktionen getrennt. Die Fraktionen wurden jeweils am Rotationsverdampfer eingeeengt (Wasserbadtemperatur max. 60 °C) und Lösungsmittelreste im Stickstoffstrom verflüchtigt. Der Rückstand wurde in 2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit TMS als internem Standard (Uvasol Chloroform-d1, Merck, Nr. 103420) aufgenommen.

### 4.3.2.2 *Geräteparameter*

Die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren wurden auf einem Bruker AM-300 Spectrometer bei 300 MHz aufgenommen.

## 4.3.3 FTIR

### 4.3.3.1 *Meßlösung*

Nach der Aufnahme der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurde die gesamte  $\text{CDCl}_3$ -Lösung für die FTIR-Messung verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Lösungen tropfenweise auf eine NaCl-Platte gebracht, im Stickstoffstrom sukzessive vom Lösungsmittel befreit und anschließend als Film gemessen.

### 4.3.3.2 *Geräteparameter*

Die FTIR-Spektren wurden auf einem Bruker IFS 88 FTIR Spectrophotometer aufgenommen.

## **4.4 *cis/trans-Tocotrienol-Isomere in komplexen Matrices – Anwendung der $\beta$ -PM Cyclodextrin HPLC-Methode***

### 4.4.1 **Material und Chemikalien**

Für Verseifung der fetthaltigen Matrices und Isolierung der  $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion wurden Materialien folgender Spezifikation verwendet: Kaliumhydroxid-Lösung (37,5 %): 60 g Kaliumhydroxid (Merck, Nr. 105033) zu 100 mL Wasser geben und lösen; L-Ascorbinsäure (Sigma, Nr. A 0278), Methanol, destilliert; n-Hexan destilliert, Essigsäure 100 % p. a. (Merck, Nr. 100063); tert-Butylmethylether Chromasolv (Riedel-de Haën, Nr. 34875); Dikaliumoxalat (Riedel-de Haën, Nr. 25413); BHT (Sigma, Nr. B 1378); Ethanol 96 %, destilliert; Aceton SupraSolv (Merck, Nr. 100012).

100 mL Laborflasche (Schott, Vertrieb durch LAT, Nr. 11 21 80524) und Schraubdeckel mit PTFE-Dichtung (Schott, Vertrieb durch LAT, Nr. 11 29 24028).

Für die Zellkulturversuche diene folgendes Material: Magenzellen (HMO2) und Leberzellen (HepG2) stammen aus Beständen von Frau Prof. Dr. Meier, Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover und waren bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren; Zellmedium MEM (Minimum Essential Medium) Eagle; PBS (Phosphate Buffered Saline); Dimethylsulfoxid (Sigma, Nr. D 5879); n-Hexan, zweimal destilliert; Acetonitril Rotisolv HPLC (Roth, Nr. 7330.2); Gewebekulturflaschen mit Schraubverschluß, Nutzfläche  $75\text{ cm}^2$  (z. B. von LAT, Nr. 29 47 65817)

Tabelle 4-3 Zusammensetzung des Zellkulturmediums MEM und von PBS

	MEM Eagle [mg/L]	PBS [g/L]
<b>Salze</b>		
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	265,00	
KCl	400,00	1,0
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	200,00	
NaCl	6.800,00	40,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	140,00	7,2
NaHCO <sub>3</sub>	3.700,00 Z	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1,0
<b>Essentielle Aminosäuren</b>		
L-Isoleucin	52,50	
L-Leucin	52,50	
L-Lysin	73,06	
L-Methionin	14,90	
L-Phenylalanin	32,02	
L-Threonin	47,64	
L-Tryptophan	10,20	
L-Valin	46,90	
<b>Nicht-Essentielle Aminosäuren</b>		
L-Arginin	126,40	
L-Cystin H <sub>2</sub> O	31,30	
L-Glutamin	292,30	
L-Histidin	41,90	
L-Tyrosin	36,22	
<b>Vitamine</b>		
Ca-D (+)-panthotenat	1,00	
Cholinchlorid	1,00	
Folsäure	1,00	
Myo-Inosit	2,00	
Nicotinamid	1,00	
Pyridoxin HCl	1,00	
Riboflavin	0,10	
Thiamin HCl	1,00	
<b>Sonstige Substanzen</b>		
D(+)-Glucose H <sub>2</sub> O	1100,00	
D(+)-Glucose H <sub>2</sub> O	3400,00 Z	
Phenol-Rot (Na)	10,60	
Pyruvat (Na)	110,00 Z	

## 4.4.2 Bioverfügbarkeit von synthetischem $\alpha$ -Tocotrienol im Modell „Futter–Huhn–Ei“

### 4.4.2.1 Fütterung der Hühner

Zwei 25 Wochen alte „Braune Leghorn“ Hühner wurden einzeln in überdachte Batterie-Käfige ( $35 \times 38 \times 43$  cm) eingestellt. Die tägliche Raumbelichtung war auf einen üblichen Wert von 14 h zu 1000 Lux geregelt. Zur Herstellung der beiden Test-Futter wurde normales Hühnerfutter auf Mais-Soja-Basis (Bela-Mühle) verwendet, dem statt des werkseitig üblichen Anteils von 3,5 % Fett der gleiche Anteil an  $\alpha$ -Tocotrienol-freiem Schweineschmalz zugesetzt wurde. Bei einem der beiden Futter wurde Schmalz, das mit synthetischem  $\alpha$ -Tocotrienol (*cis/trans*-Isomerengemisch) supplementiert war, zugemischt, um im fertigen Futter eine Konzentration von 15 mg  $\alpha$ -Tocotrienol pro kg Futter zu erreichen. Die täglichen Futterportionen (120 g) wurden jeweils luftdicht und lichtgeschützt in Plastikbeutel abgepackt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die während und nach der 13tägigen Fütterungsperiode gesammelten Eier wurden bis zur Untersuchung bei +5 °C gelagert. Für die Bestimmung der *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomere wurden die zwischen dem zehnten und 23. Tag nach Fütterungsbeginn gelegten Eier verwendet.

Für die Untersuchungen wurde nur das Eigelb herangezogen, da durch die lipophilen Eigenschaften des Vitamin E nicht mit einem nennenswerten Anteil im Eiweiß gerechnet werden muß.

### 4.4.2.2 Verseifung des Eigelbs und Extraktion der unverseifbaren Lipide

Das Eigelb wurde mit einem Elektrospatel homogenisiert. In eine 100 mL Laborflasche wurden der Reihe nach 8 mL Kaliumhydroxid-Lösung (37,5 %), 1,5 g L-Ascorbinsäure, 3 g Eigelbprobe und 4 mL Methanol eingebracht. Durch Spülen mit Stickstoff wurde die Luft aus dem Flaschenvolumen verdrängt und die Flaschen mit einem Schraubdeckel dicht verschlossen. Der Ansatz wurde geschüttelt und anschließend unter Lichtausschluß 60 min lang bei 80 °C verseift, wobei wiederum etwa alle 10 min manuell geschüttelt wurde. Die Lösung wurde rasch auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 100 %iger Essigsäure auf pH 6 - 7 eingestellt und, falls nötig, mit Wasser auf ein Volumen von 20 mL gebracht. Diese Probelösung wurde auf eine Extrelut 20 Flüssig/Flüssig-Extraktionssäule (Merck, Nr. 11737) überführt. Nach einer Einwirkzeit von 10 - 15 min wurde mit 50 mL n-Hexan (mit 0,05 % BHT-Zusatz) extrahiert und der Extrakt in einem 50 mL Braunglas-Rundkolben gesammelt. Je nach Bedarf wurde das Aufziehen der Probelösung auf die stationäre Phase und die Extraktion durch ein schwaches Vakuum unterstützt, das mit Hilfe einer LiChrolut Absaugeinheit (Merck, Nr. 1.19851) am Säulenausgang angelegt wurde.

Der organische Extrakt wurde zur Trockne einrotiert und der Rückstand in 5 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde in einem 10 mL Zentrifugenröhrchen über Nacht bei -18 °C stengelassen, die ausgefrorenen Bestandteile bei -18 °C und  $1360 \times g$  abzentrifugiert und die überstehende Lösung in einen 10 mL Braunglas-Spitzkolben abgehoben. Der methanolische Extrakt wurde einrotiert und der ölige

Rückstand mit n-Hexan in einen 1 mL Meßkolben überführt. Nach der Zugabe von 20 µL Tocol-Lösung (200 mg/L in n-Hexan) wurde mit n-Hexan zur Marke aufgefüllt.

#### 4.4.2.3 Chromatographische Trennung der cis/trans-Isomere von $\alpha$ -Tocotrienol

Um den Gehalt an  $\alpha$ -Tocotrienol zu bestimmen, wurde die Lösung nach der Methode des internen Standards auf der analytischen Diol-Phase (siehe 4.1.1.4) untersucht. Anschließend wurden 100 µL-Portionen der Probelösung auf der semipräparativen Diol-Phase getrennt (siehe Abbildung 4-6) und die  $\alpha$ -Tocotrienol-Fractionen gesammelt, bis eine Menge von 1 - 2 µg  $\alpha$ -Tocotrienol erreicht war. Die vereinigten Eluate wurden einrotiert, in 100 µL n-Hexan gelöst und ein zweites Mal über die semipräparative HPLC-Säule gereinigt. Dazu wurde ein modifizierter Eluent von n-Hexan/tert-Butylmethylether (96:4 v/v) verwendet, um durch längere Retentionszeiten die Abtrennung von  $\alpha$ -Tocopherol zu verbessern. Abschließend wurde das gesammelte  $\alpha$ -Tocotrienol-Eluat einrotiert, in 100 µL Aceton gelöst und für die Bestimmung mit der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase verwendet.

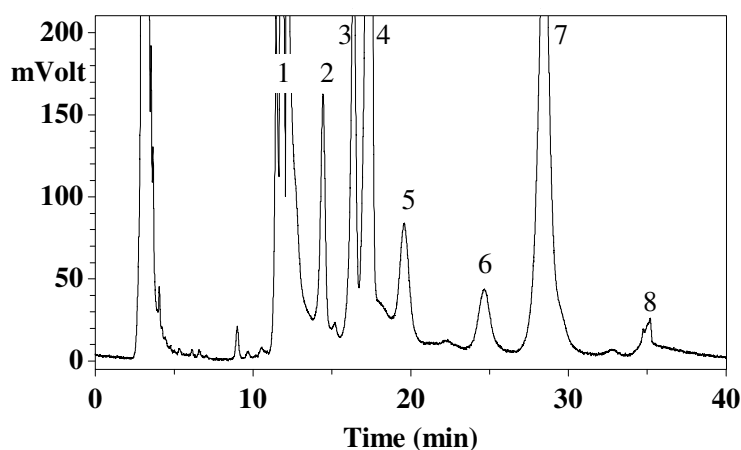


Abbildung 4-6 Tocopherole und Tocotrienole aus dem Unverseifbaren des Eigelbs; HPLC-Trennung mit der semipräparativen Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion.

1 =  $\alpha$ -Tocopherol (Peakform durch Detektor-Auto-Range verursacht), 2 =  $\alpha$ -Tocotrienol (zur weiteren Bestimmung isoliert), 3 =  $\beta$ -Tocopherol, 4 =  $\gamma$ -Tocopherol, 5 =  $\beta$ -Tocotrienol, 6 =  $\delta$ -Tocopherol, 7 = Tocol, 8 =  $\delta$ -Tocotrienol.

### 4.4.3 Synthetisches $\gamma$ -Tocotrienol und humane Zellkulturen

#### 4.4.3.1 Ansetzen der Zellkulturen

*Probelösungen:* Referenzlösungen von synthetischem  $\gamma$ -Tocotrienol werden unter einem Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt und der Rückstand im Zellmedium, dem als Lösungsvermittler 1 % Dimethylsulfoxid zugesetzt worden ist, gelöst. So wurden Lösungen mit einem  $\gamma$ -Tocotrienol-Gehalt von 263,8 mg/L, 3,59 mg/L und 1,79 mg/L erhalten. Die höchstkonzentrierte Lösung wurde mit Medium auf Gehalte von 131,9 mg/L, 26,38 mg/L und 13,19 mg/L verdünnt.

Eine Magenzellensuspension wurde auf einen Gehalt von 200.000 Zellen/mL gebracht, eine Leberzellensuspension auf einen Gehalt von 300.000 Zellen/mL. Pro Zelllinie wurden in 11 Zellkulturflaschen

je 10 mL der Suspensionen eingebracht, das ergibt eine Anzahl von 2.000.000 Magenzellen, bzw. 3.000.000 Leberzellen pro Flasche. Die Kulturen wurden 48 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Während dieser Zeit befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, um 24 h später die optimale Zelldichte (Konfluenz) zu erreichen. Nach der Inkubation wurde das Medium über den adhären Zellen jeweils gegen 5 mL einer Probelösung (s. o.), bzw. 5 mL Medium ohne  $\gamma$ -Tocotrienol-Zusatz ausgetauscht.

Tabelle 4-4 Übersicht zur Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an  $\gamma$ -Tocotrienol-haltigem Medium

Magenzellen HMO2 eingesäte Anzahl: 2 Mio. Zellen/Flasche nach 48 h Inkubation: Exposition gegen 5 mL $\gamma$ -Tocotrienol-haltigem Medium			Leberzellen HepG2 eingesäte Anzahl: 3 Mio. Zellen/Flasche nach 48 h Inkubation: Exposition gegen 5 mL $\gamma$ -Tocotrienol-haltigem Medium:		
Flasche	Konzentration $\gamma$ -Tocotrienol /Medium	Gehalt $\gamma$ -Tocotrienol pro Flasche	Flasche	Konzentration $\gamma$ -Tocotrienol /Medium	Gehalt $\gamma$ -Tocotrienol pro Flasche
M1	263,8 mg/L	1319 $\mu$ g	L1	263,8 mg/L	1319 $\mu$ g
M2	131,9 mg/L	659,5 $\mu$ g	L2	131,9 mg/L	659,5 $\mu$ g
M3	26,4 mg/L	132 $\mu$ g	L3	26,4 mg/L	132 $\mu$ g
M4	13,2 mg/L	66 $\mu$ g	L4	13,2 mg/L	66 $\mu$ g
M5	3,6 mg/L	18 $\mu$ g	L5	3,6 mg/L	18 $\mu$ g
M6	3,6 mg/L	18 $\mu$ g	L6	3,6 mg/L	18 $\mu$ g
M7	1,8 mg/L	9 $\mu$ g	L7	1,8 mg/L	9 $\mu$ g
M8	1,8 mg/L	9 $\mu$ g	L8	1,8 mg/L	9 $\mu$ g
M9	1,8 mg/L	9 $\mu$ g	L9	1,8 mg/L	9 $\mu$ g
M10	1,8 mg/L	9 $\mu$ g	L10	1,8 mg/L	9 $\mu$ g
M11	ohne Zusatz	ohne Zusatz	L11	ohne Zusatz	ohne Zusatz

Nach weiteren 24 h Inkubation mit dem  $\gamma$ -Tocotrienol-haltigen Medium wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und die Konfluenz beurteilt. Abgestorbene Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie sich von der Substratoberfläche ablösen, eine kugelige Gestalt und stark angegriffene Zellwände aufweisen, während optimal konfluente (dichte) Zellen einen sogenannten Monolayer sich berührender backsteinförmiger Zellen bilden. Die optimale Zelldichte liegt für Magenzellen bei 100 % (das gesamte zur Verfügung stehende Substrat ist bewachsen) und für Leberzellen selten über 90 % (10 % unbewachsenes Substrat). Auch in Kulturen adhären Zellen kann man immer einen kleinen Anteil nicht angehefteter Zellen finden, die gerade aus einer Teilung hervorgegangen sind und sich noch nicht anheften konnten. Bei der Beurteilung einer Kultur ist es daher sinnvoll, den nicht adhären Zellen eine der beiden Möglichkeiten zuzuordnen, indem die toten Zellen z. B. mit Trypanblau angefärbt werden [mei 96]. Auf diese Maßnahme zur Unterscheidung von den lebenden

Zellen wurde verzichtet und die Beurteilung durch Augenschein vorgenommen, um die nachfolgende HPLC-Analytik nicht zu stören: Mit Ausnahme der Flaschen 1 und 2 für beide Zelllinien stellten sich sowohl die adhärennten wie auch die abgekugelten Zellen für alle Konzentrationsstufen als intakt und lebend dar.

Tabelle 4-5 Übersicht zur Beurteilung der Konfluenz nach 24stündiger Behandlung der Zellen mit  $\gamma$ -Tocotrienol-haltigem Medium.

Magenzellen HMO2		Leberzellen HepG2	
Flasche	Konfluenz nach 24 h Inkubation mit $\gamma$ -Tocotrienol-haltigem Medium	Flasche	Konfluenz nach 24 h Inkubation mit $\gamma$ -Tocotrienol-haltigem Medium
M1	0 % <sup>a</sup>	L1	0 % <sup>a</sup>
M2	30 % <sup>b</sup>	L2	0 % <sup>a</sup>
M3	100 %	L3	80-90 %
M4	100 %	L4	80-90 %
M5	100 %	L5	80-90 %
M6	100 %	L6	80 %
M7	70-80 %	L7	80 %
M8	70-80 %	L8	70-80 %
M9	70-80 %	L9	70-80 %
M10	70-80 %	L10	80 %
M11	100 %	L11	95 %

<sup>a</sup>alle Zellen tot und vom Substrat abgelöst    <sup>b</sup>adhärente Zellen stark angegriffen und durch Schwenken ablösbar



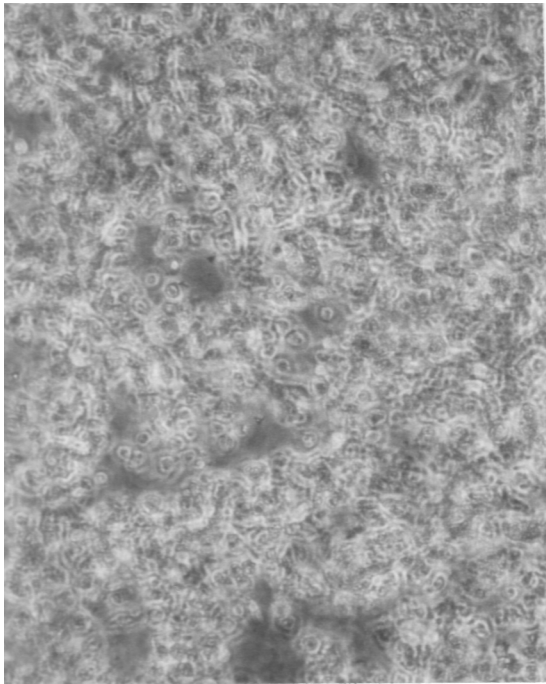


Abbildung 4-7 Mikroskopische Aufnahme der Flasche M2.

Durch  $\gamma$ -Tocotrienol-Behandlung (131,9 mg/L) grÖsstenteils abgestorbene humane Magenzellen HMO2 (50fache VergrÖBerung).

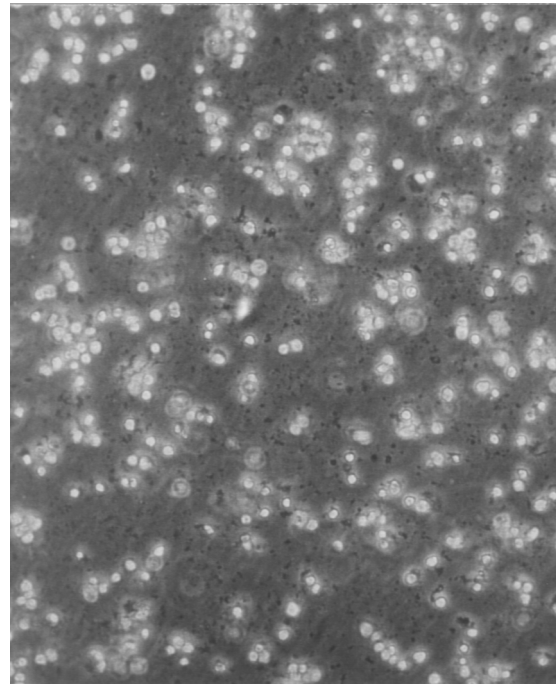


Abbildung 4-8 Mikroskopische Aufnahme der Flasche L1.

Durch  $\gamma$ -Tocotrienol-Behandlung (263,8 mg/L) abgestorbene humane Leberzellen HepG2 (50fache VergrÖBerung).

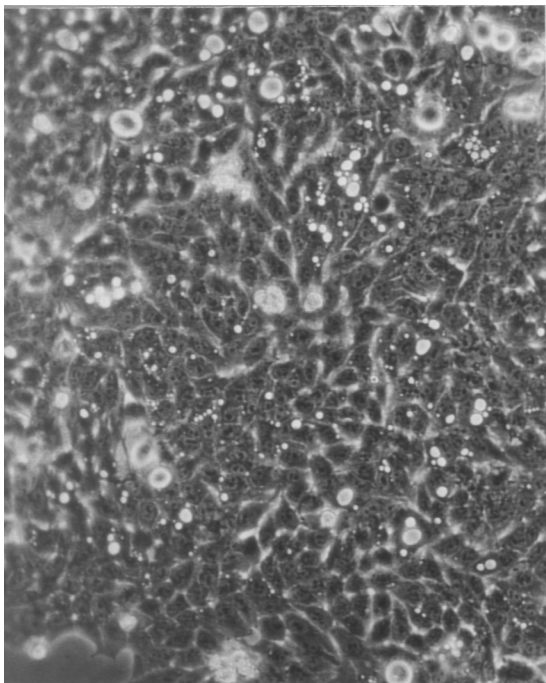


Abbildung 4-9 Mikroskopische Aufnahme der Flasche M11.

Optimale Konfluenz humaner Magenzellen HMO2 im Medium ohne  $\gamma$ -Tocotrienol-Zusatz (50fache VergrÖBerung).

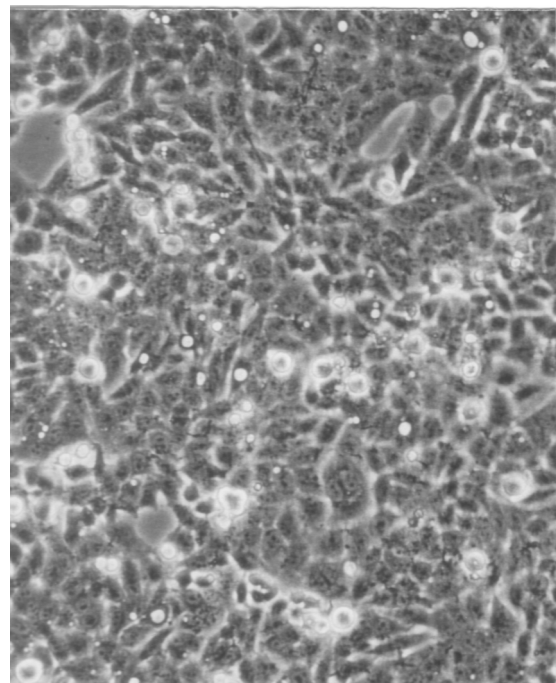


Abbildung 4-10 Mikroskopische Aufnahme der Flasche L11.

Optimale Konfluenz humaner Leberzellen HepG2 im Medium ohne  $\gamma$ -Tocotrienol-Zusatz (50fache VergrÖBerung).

#### **4.4.3.2 Aufarbeitung der Zellen und Mediumüberstände**

Ziel der Aufarbeitung war, die Zellkulturen in Mediumüberstand, Zellwandtrümmer und Zellinhalt zu separieren und für die HPLC-Bestimmung vorzubereiten. Da die abgestorbenen Zellen in den Flaschen 1 und 2 bereits lysiert sind und ihren Inhalt zum großen Teil an das überstehende Medium abgegeben haben, wurde hier die Zellkultur nur in Mediumüberstand und Zellwandtrümmer separiert.

##### **4.4.3.2.1 Vorgehen für die abgestorbenen Zellkulturen**

Flaschen M1, M2, L1 und L2: Das Medium mit den darin enthaltenen abgelösten Zellbestandteilen wurde aus den Zellkulturflaschen in 10 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei  $1600 \times g$  zentrifugiert, wobei auch evtl. intakte Zellen zerstört werden. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert (Isolat *Mediumüberstand*). Das Sediment wurde mit 2 mL PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und nach dem Verwerfen des Überstands in 1 mL PBS aufgenommen (Isolat *Zellwand*).

##### **4.4.3.2.2 Vorgehen für die lebenden Zellkulturen**

Flaschen M3-M11 und L3-L11: Das Medium über den adhären Zellen wurde abdekantiert (Isolat *Mediumüberstand*). Der zurückbleibende Zellrasen wurde abgeschabt, mit 2 mL PBS in ein 10 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei nicht mehr als  $28-40 \times g$  zentrifugiert, um die Zellen nicht zu zerstören. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Anschließend wurde das Sediment in 200  $\mu$ L PBS resuspendiert und 1 min im Ultraschallbad behandelt, um die Zellen zu fragmentieren und ihren Inhalt freizusetzen. Die Suspension wurde in 1,5 mL Eppendorf-Caps überführt, in der Eppendorf-Zentrifuge 1 min bei  $11.400 \times g$  zentrifugiert und der Überstand abgenommen (Isolat *Cytosol*). Das Sediment wurde in 100  $\mu$ L PBS aufgenommen (Isolat *Zellwand*). Berücksichtigt werden muß, daß im „Isolat *Cytosol*“ durch die Aufarbeitung durchaus auch  $\gamma$ -Tocotrienol aus der Zellwand enthalten sein kann und deswegen die so erzielten Ergebnisse nicht überbewertet werden sollten.

##### **4.4.3.2.3 Extraktion der isolierten Mediumüberstände**

Die isolierten Mediumüberstände wurden alle nach folgendem Prinzip extrahiert: Ein bestimmtes Volumen Mediumüberstand wurde zweimal mit einem bestimmten Volumen n-Hexan unter Schütteln und Ultraschallbehandlung extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die n-Hexan-Phasen wurden jeweils abpipettiert, die vereinigten Extrakte jeweils im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit und die Rückstände in einem bestimmten Volumen Acetonitril gelöst (Probelösung *Mediumüberstand*).

Tabelle 4-6 Übersicht zur Extraktion von  $\gamma$ -Tocotrienol aus den Mediumüberständen der Zellkulturen

	Extrahiertes Volumen „Isolat Mediumüberstand“	zur Extraktion verwendetes Volumen n-Hexan	Endvolumen der Probelösung <i>Mediumüberstand</i> in Acetonitril
M1	1 mL	2 × 0,5 mL	4 mL
M2	1 mL	2 × 0,5 mL	1 mL
M3	1 mL	2 × 0,5 mL	200 $\mu$ L
M4	1 mL	2 × 0,5 mL	100 $\mu$ L
M5	2 mL	2 × 1 mL	100 $\mu$ L
M6	0,5 mL	2 × 0,5 mL	100 $\mu$ L
M7, M8, M9, M10	Mischprobe aus je 1 mL = 4 mL	2 × 1 mL	100 $\mu$ L
L1	1 mL	2 × 0,5 mL	3 mL
L2	1 mL	2 × 0,5 mL	1,5 mL
L3	1 mL	2 × 0,5 mL	200 $\mu$ L
L4	1 mL	2 × 0,5 mL	100 $\mu$ L
L5	2 mL	2 × 1 mL	50 $\mu$ L
L6	0,5 mL	2 × 0,5 mL	50 $\mu$ L
M7, M8, M9, M10	Mischprobe aus je 1 mL = 4 mL	2 × 1 mL	50 $\mu$ L

#### 4.4.3.2.4 Extraktion der isolierten Mediumüberstände

Die Isolate *Zellwand* und *Cytosol* wurden in einem Eppendorf-Cap zweimal mit je 500  $\mu$ L n-Hexan unter Schütteln und Ultraschallbehandlung extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die n-Hexan-Phasen wurden jeweils abpipettiert, die vereinigten Extrakte jeweils im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit und die Rückstände in einem bestimmten Volumen Acetonitril gelöst (Probelösung *Zellwand* bzw. *Cytosol*).

Tabelle 4-7 Endvolumina der Probelösungen 'Zellwand' und 'Cytosol'

	Endvolumen der Probelösung <i>Zellwand</i> in Acetonitril	Endvolumen der Probelösung <i>Cytosol</i> in Acetonitril
M1	30 mL	
M2	10 mL	
M3	4 mL	100 $\mu$ L
M4	375 $\mu$ L	50 $\mu$ L
M6	500 $\mu$ L	50 $\mu$ L
M10	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L
M11	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

	Endvolumen der Probelösung <i>Zellwand</i> in Acetonitril	Endvolumen der Probelösung <i>Cytosol</i> in Acetonitril
L1	30 mL	
L2	15 mL	
L3	4 mL	50 µL
L4	1 mL	50 µL
L5	500 µl	50 µL
L6	500 µL	50 µL
L7	500 µL	
L8	100 µL	
L9	100 µL	
L10	150 µL	
L7, L8, L9 vereinigt		50 µL
L11	100 µL	100 µL

#### 4.4.3.3 Chromatographische Trennung der *cis/trans*-Isomere von $\gamma$ -Tocotrienol und Auswertung der Chromatogramme

Die in den Probelösungen enthaltenen  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomere wurden nach der Methode „analytische Trennung mit einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit amperometrischer Detektion“ (siehe 4.2.4) chromatographisch getrennt. Die Untersuchungen sollten zeigen, ob sich das Muster der vier  $\gamma$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere in den Zellkulturen unterscheidet. Um bei den verwendeten Zelllinien in Kombination mit mehreren  $\gamma$ -Tocotrienol-Konzentrationen im Medium Differenzen zwischen den  $\gamma$ -Tocotrienol-Isomeren zu erkennen, wurde der Prozentanteil der Peakhöhen der vier *cis/trans*-Seitenkettenisomere an der Summe aller Peakhöhen bestimmt, also: Der Prozentanteil der Peakhöhe von

$$cis-cis-\gamma\text{-Tocotrienol (1. Peak)}^6 = \frac{100 \times \text{Peakhöhe [cm] (cis - cis - } \gamma \text{ - Tocotrienol)}}{\text{Summe der Peakhöhen aller Isomere [cm]}};$$

$$cis/trans-\gamma\text{-Tocotrienol (2. Peak)}^6 = \frac{100 \times \text{Peakhöhe [cm] (cis / trans - } \gamma \text{ - Tocotrienol)}}{\text{Summe der Peakhöhen aller Isomere [cm]}};$$

$$cis/trans-\gamma\text{-Tocotrienol (3. Peak)}^6 = \frac{100 \times \text{Peakhöhe [cm] (cis / trans - } \gamma \text{ - Tocotrienol)}}{\text{Summe der Peakhöhen aller Isomere [cm]}};$$

$$trans-trans-\gamma\text{-Tocotrienol (4. Peak)}^6 = \frac{100 \times \text{Peakhöhe [cm] (trans - trans - } \gamma \text{ - Tocotrienol)}}{\text{Summe der Peakhöhen aller Isomere [cm]}}.$$

<sup>6</sup> gibt die Elutionsreihenfolge der Isomere auf der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin Phase an

So können unabhängig von einer möglicherweise nicht quantitativen Extraktion der  $\gamma$ -Tocotrienole aus den Probenmatrices sehr gut vergleichbare Aussagen über das Isomerenmuster erzielt werden.

In den Zellwänden und im Cytosol der beiden verwendeten unbehandelten Zelllinien konnte im übrigen kein  $\gamma$ -Tocotrienol nachgewiesen werden.

#### **4.4.4 Beeinflussung von $\gamma$ -Tocotrienol durch katalytischen Fetthärtungsprozess**

##### **4.4.4.1 Palmöl**

Für die Untersuchungen wurde ein partiell gehärtetes Palmöl (MW Fettraffinerie) verwendet. Der Schmelzpunkt betrug 46 °C und der Gehalt an *trans*-Fettsäuren nach Analyse der Raffinerie 10,6 %.

##### **4.4.4.2 Verseifung des Palmöls und Extraktion der unverseifbaren Lipide**

In eine 100 mL Laborflasche (Schott, Vertrieb durch LAT, Nr. 11 21 80524) wurden der Reihe nach 4 g Probe, 13 mL Kaliumhydroxid-Lösung (37,5 %), 1,5 g L-Ascorbinsäure und 20 mL Methanol eingebracht. Durch Spülen mit Stickstoff wurde die Luft aus dem Flaschenvolumen verdrängt und die Flaschen mit einer Schraubkappe dicht verschlossen. Der Ansatz wurde geschüttelt und anschließend unter Lichtausschluß 40 min lang bei 80 °C verseift, wobei wiederum etwa alle 10 min manuell geschüttelt wurde. Die noch heiße Lösung wurde mit 100 %iger Essigsäure auf pH 6 - 7 eingestellt und, falls nötig, mit Wasser auf ein Volumen von 50 mL gebracht. Diese Probelösung wurde auf eine Chem Elut Flüssig/Flüssig-Extraktionssäule (Kapazität 50 mL, Varian, Nr. 1219-8009) überführt. Nach einer Einwirkzeit von 10 - 15 min wurde mit 150 mL n-Hexan (mit 0,05 % BHT-Zusatz) extrahiert und der Extrakt in einem 250 mL Braunglas-Rundkolben gesammelt. Je nach Bedarf wurde das Aufziehen der Probelösung auf die stationäre Phase und die Extraktion durch ein schwaches Vakuum unterstützt, das mit Hilfe einer LiChrolut Absaugeinheit (Merck, Nr. 1.19851) am Säulenausgang angelegt wurde.

Der organische Extrakt wurde zur Trockne einrotiert und der Rückstand in 20 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde in einem 45 mL Zentrifugenröhrchen über Nacht bei -18 °C stehen gelassen, die ausgefrorenen Bestandteile bei -18 °C und 1360 × g abzentrifugiert und die überstehende Lösung in einen 25 mL Braunglas-Spitzkolben abgehoben. Der methanolische Extrakt wurde einrotiert und der ölige Rückstand mit n-Hexan in einen 1 mL Meßkolben überführt. Nach der Zugabe von 20  $\mu$ L Tocol-Lösung (200 mg/L) wurde mit n-Hexan zur Marke aufgefüllt.

##### **4.4.4.3 Chromatographische Trennung der *cis/trans*-Isomere von $\gamma$ -Tocotrienol**

Um den Gehalt an  $\gamma$ -Tocotrienol zu bestimmen wurde die Lösung nach der Methode des internen Standards auf der analytischen Diol-Phase (siehe 4.1.1.4) untersucht. Dabei war eine Verdünnung von

1:50 mit n-Hexan nötig. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$ -Portionen der 1:10 verdünnten Probelösung ohne Tocozusatz auf der semipräparativen Diol-Phase getrennt (siehe Abbildung 4-6) und die  $\gamma$ -Tocotrienol-Fractionen gesammelt, bis eine Menge von 1 - 2  $\mu\text{g}$   $\gamma$ -Tocotrienol erreicht war. Die vereinigten Eluate wurden einrotiert, der Rückstand in 400  $\mu\text{L}$  Aceton/Acetonitril (1:1, v/v) gelöst und für die Bestimmung mit der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase verwendet.

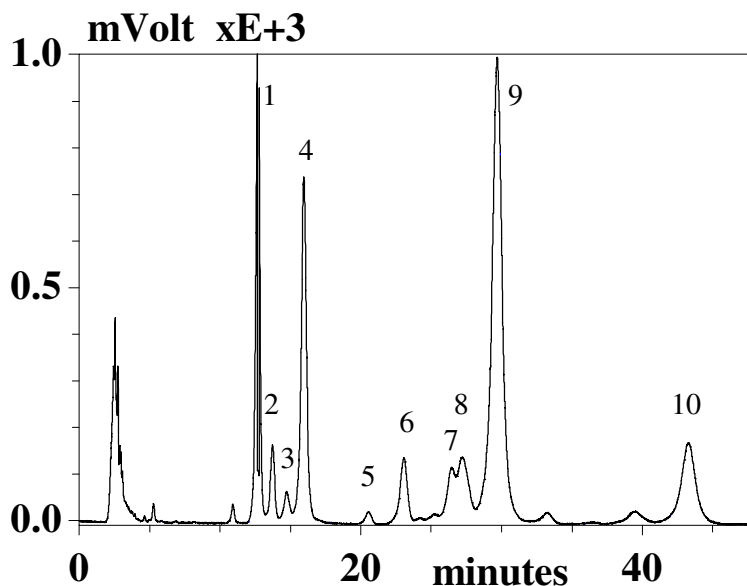


Abbildung 4-11 Tocopherole und Tocotrienole aus dem Unverseifbaren von gehärtetem Palmöl; HPLC-Trennung mit semipräparativer Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion.

1 =  $\alpha$ -Tocopherol (Peakform durch Detektor-Auto-Range verursacht), 2 = definiert als  $\alpha$ -Tocomoneol [ram 85], 3 =  $\alpha$ -Tocodienol nach [kon 96], 4 =  $\alpha$ -Tocotrienol (zur weiteren Bestimmung isoliert), 5 =  $\beta$ -Tocopherol, 6 =  $\gamma$ -Tocopherol, 7 =  $\beta$ -Tocotrienol, 8 = Plastochromanol-8 [bal 92], 9 =  $\gamma$ -Tocotrienol, 10 =  $\delta$ -Tocotrienol.

#### 4.4.5 Beeinflussung von $\alpha$ -Tocotrienol durch Biohydrierung im Pansen

##### 4.4.5.1 Schafsmilch

Ein schwarzes Milchschaaf mit zwei einwöchigen Lämmern erhielt als normales Futter 750 - 1000 g Hafer pro Tag und Heu *ad libidum*. In einem Zeitraum von acht Tagen wurde dem Mutterschaaf zusätzlich täglich 55 g warmes, verflüssigtes Palmöl (raffiniert,  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt 143,7 mg/kg, Henry Lamotte GmbH) oral verabreicht. Nachdem die Lämmer ca. 2 h von der Mutter getrennt waren, wurde einmal täglich gemolken und die durchschnittlich ausgemolkene Menge von 40 g bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Für die Untersuchung auf *cis/trans*-Isomere wurde nur Milch, die nach dem fünften Tag der Applikation gemolken wurde, herangezogen. Der Fettgehalt der Milch betrug durchschnitt 9,2 g/100 g.

##### 4.4.5.2 Bestimmung des $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalts in Schafsmilch

Die Extraktion des Milchfetts wurde nach der Methode von Balz et al. [bal 93] wie für Muttermilch beschrieben durchgeführt: 25 g Schafsmilch wurden in einem 250 mL Scheidetrichter nacheinander mit 1 mL Dikaliumoxalatlösung (35 %, w/v), 50 mL Ethanol, 25 mL tert-Butylmethylether und 35 mL n-Hexan versetzt. Nach jeder Zugabe wurde die Mischung 1 min lang geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die obere Phase in einen 250 mL Braunglas-Rundkolben überführt und die

wässrige Phase nochmals mit 25 mL tert-Butylmethylether und 35 mL n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer einrotiert, mit n-Hexan auf 10 mL aufgefüllt und der  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt der Milch mit Tocol als externem Standard bestimmt.

#### ***4.4.5.3 Verseifung des Schafsmilchfettes und Extraktion der unverseifbaren Lipide***

Das Schafsmilchfett wurde wie oben angegeben isoliert, nach dem Einrotieren mit 13 mL Methanol in eine 100 mL Laborflasche überführt und wie in Abschnitt 4.4.4.2 für Palmöl beschrieben verseift.

Die noch warme Seifenlösung wurde in einen 250 mL Scheidetrichter eingebracht und die Laborflasche dabei mit insgesamt 50 mL Wasser nachgespült. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden die unverseifbaren Lipide zweimal mit 100 mL n-Hexan entsprechend der DGF Einheitsmethode C-III 1b (84) [dgf 84] extrahiert. Abweichend wurde jedoch n-Hexan statt Petrolether (Siedebereich  $< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) für die Extraktion benutzt. Eventuell auftretende Emulsionen können durch kleine Mengen (1-2 mL) 50%igem Ethanol gebrochen werden, die man vorsichtig unter Drehen des Scheidetrichters an der Innenwand entlang einfließen läßt. Die organische Phase wurde mit 50%igem Ethanol gewaschen, bis die Waschflüssigkeit neutral gegen Universal-pH-Indikatorpapier reagierte. Die n-Hexanextrakte von drei Aufarbeitungen wurden vereinigt und zur Trockne einrotiert. Die unverseifbaren Bestandteile wurden mit insgesamt 10 mL Methanol in ein 10 mL Zentrifugenröhrchen überführt und über Nacht bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen. Die ausgefrorenen Bestandteile wurden bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $1360 \times g$  abzentrifugiert und die überstehende Lösung in einen 10 mL Braunglas-Spitzkolben abgehoben. Der methanolische Extrakt wurde einrotiert und der ölige Rückstand mit n-Hexan in einen 1 mL Meßkolben überführt und zur Marke aufgefüllt.

#### ***4.4.5.4 Chromatographische Trennung der cis/trans-Isomere von $\alpha$ -Tocotrienol***

Der  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt der Lösung wurde über die HPLC (analytische Diol-Phase) bestimmt. Anschließend wurde das Volumen der Lösung im Stickstoffstrom auf  $400\text{ }\mu\text{L}$  eingengt,  $100\text{ }\mu\text{L}$ -Portionen der Probelösung auf der semipräparativen Diol-Phase getrennt (siehe Abbildung 4-12) und die  $\alpha$ -Tocotrienol-Fractionen gesammelt bis eine Menge von 1 -  $2\text{ }\mu\text{g}$   $\alpha$ -Tocotrienol erreicht war. Die vereinigten Eluate wurden einrotiert, der Rückstand in  $500\text{ }\mu\text{L}$  Acetonitril gelöst und für die Bestimmung mit der permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase verwendet.

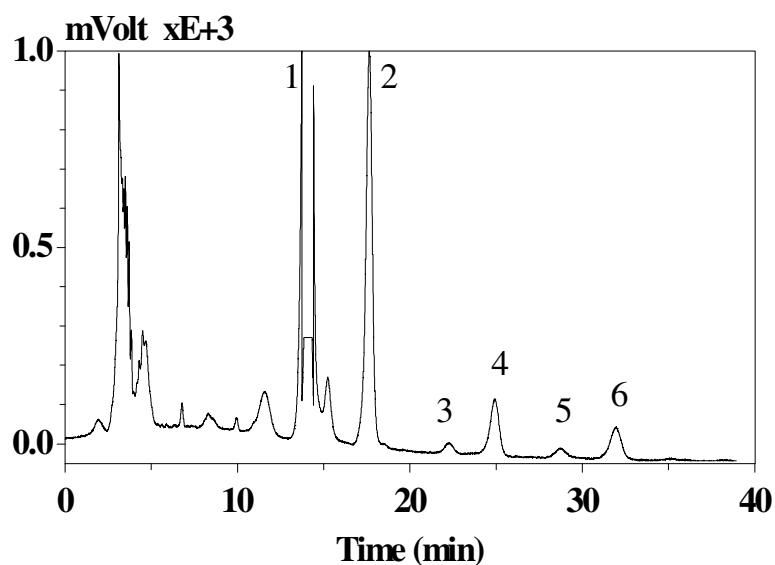


Abbildung 4-12 Tocopherole und Tocotrienole aus dem Unverseifbaren von Schafsmilchfett; HPLC-Trennung mit semipräparativer Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion.

1 =  $\alpha$ -Tocopherol (Peakform durch Detektor-Auto-Range verursacht), 2 =  $\alpha$ -Tocotrienol (zur weiteren Bestimmung isoliert), 3 =  $\beta$ -Tocopherol, 4 =  $\gamma$ -Tocopherol, 5 =  $\beta$ -Tocotrienol, 6 =  $\gamma$ -Tocotrienol.

## 4.5 HPLC-Trennung der *RS,cis/trans*-Tocotrienole

### 4.5.1 Chemikalien

#### 4.5.1.1 Derivatisierung zum Methylether

Ethylenglycoldimethylether (Sigma, Nr. E1129); Kaliumhydroxid-Lösung: 60 g Kaliumhydroxid (Merck, Nr. 105033) zu 100 mL Wasser geben und lösen; Dimethylsulfat zur Synthese (Merck-Schuchardt, Nr. 803071); n-Hexan, 2  $\times$  destilliert; die zur Veretherung bestimmten Tocopherole oder Tocotrienole werden als Lösung in das Reaktionsgefäß pipettiert und unter einem Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit.

#### 4.5.1.2 Chromatographie

Isohexan LiChroSolv für die Chromatographie (Merck, Nr. 104335), 2-Propanol LiChroSolv gradient grade für die Chromatographie (Merck, Nr. 101040).

Acetonitril Rotisolv (Carl Roth, Nr. 7330.2)

### 4.5.2 Gewinnung von *cis/trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Isomeren zur Derivatisierung

2  $\times$  250  $\mu$ L  $\alpha$ -Tocotrienol-Referenzlösung (2187 mg/L) wurden entsprechend der Methode „Präparative Trennung mit einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase“ (siehe 4.2.5) in die vier *cis/trans*-Isomere getrennt. Als Abweichung zur angegebenen Methode wurde der Eluent aus 60 Teilen Acetonitril (2  $\times$  destilliertes Azeotrop mit 16 % Wasseranteil) und 24 Teilen Wasser hergestellt, was in der gleichen Zusammensetzung von Acetonitril/Wasser (60:40 v/v) resultiert. Die vier abgetrennten Fraktionen wurden bei max. 75  $^{\circ}$ C Wasserbadtemperatur im Rotationsverdampfer



bis fast zur Trockne eingengt, Wasserreste mit Stickstoff verflüchtigt und die Rückstände mit jeweils insgesamt 1,5 mL 2-Propanol in ein Aufbewahrungsgefäß überführt.

Unter der Voraussetzung, daß alle Seitenkettenisomere zu gleichen Teilen vorliegen und daß die Fraktionen ohne Verlust an Isomeren gesammelt wurden, kann die erhaltene Menge je  $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomer grob zu 270  $\mu\text{g}$  abgeschätzt werden.

#### 4.5.3 Gewinnung von $\alpha$ -Tocopherol, sowie $\alpha$ -, $\gamma$ - und $\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl zur Derivatisierung

Eine 100 g/L Lösung von Palmöl (raffiniert, Chargen Nr. 1768601, Henry Lamotte) in n-Hexan ( $2 \times$  destilliert) wurde mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und durch zwei Faltenfilter filtriert. Der Gehalt des Palmöls wurde vorher nach der Methode des internen Standards (siehe 4.1.1.4) bestimmt zu 100,3 mg/kg  $\alpha$ -Tocopherol, 143,7 mg/kg  $\alpha$ -Tocotrienol, 18,9 mg/kg berechnet als  $\beta$ -Tocotrienol (Summe von  $\beta$ -Tocotrienol und Plastochromanol-8), 101,2 mg/kg  $\gamma$ -Tocotrienol und 46,2 mg/kg  $\delta$ -Tocotrienol. Wegen des geringen Gehalts an  $\beta$ -Tocotrienol, welches sich zudem nicht ausreichend von Plastochromanol-8 separierte und so als Summe mit diesem bestimmt wurde, wurde auf eine Isolierung dieses Vitamers verzichtet.

$3 \times 100 \mu\text{L}$  Portionen der Palmöllösung wurden entsprechend der Methode für die semipräparative HPLC-Trennung mit der Diol-Phase (siehe 4.1.2) in die  $\alpha$ -Tocopherol-,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol-Fraktion separiert (siehe Abbildung 4-13). Nach dem Abrotieren des Eluenten bei max. 45 °C Badtemperatur wurde je Vitamer der gesamte Rückstand zur Derivatisierung verwendet.

Unter der Voraussetzung, daß die Fraktionen ohne Verlust an Vitaminen gesammelt wurden, können die erhaltene Mengen grob folgendermaßen abgeschätzt werden:  $\alpha$ -Tocopherol 3,0  $\mu\text{g}$ ,  $\alpha$ -Tocotrienol 4,3  $\mu\text{g}$ ,  $\gamma$ -Tocotrienol 3,0  $\mu\text{g}$ , und  $\delta$ -Tocotrienol 1,4  $\mu\text{g}$ .

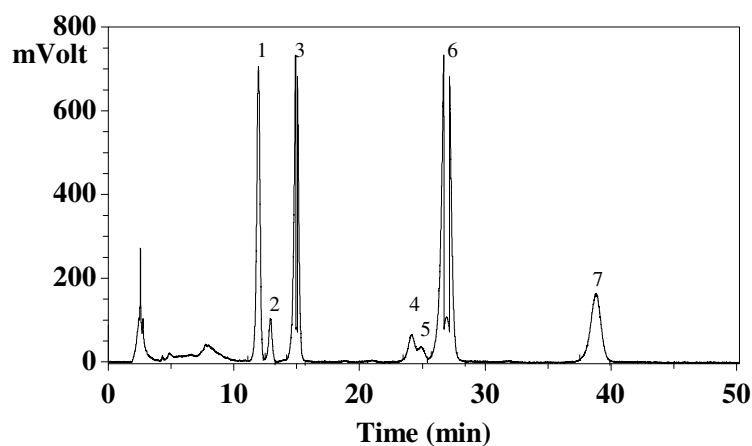


Abbildung 4-13 Chromatogramm von Palmöl; HPLC-Trennung auf der semipräparativen Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

1 =  $\alpha$ -Tocopherol, 2 = definiert als  $\alpha$ -Tocomoneol [ram 85], 3 =  $\alpha$ -Tocotrienol (Peakform durch Detektor-Auto-Range verursacht), 4 =  $\beta$ -Tocotrienol, 5 = Plastochromanol-8 [bal 92], 6 =  $\gamma$ -Tocotrienol (Peakform durch Detektor-Auto-Range verursacht) und 7 =  $\delta$ -Tocotrienol.

#### 4.5.4 Gewinnung von $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett zur Derivatisierung

$\alpha$ -Tocotrienol wurde wie in Abschnitt 4.4.5 beschrieben aus Schafmilchfett isoliert und ein Aliquot von 2/5 des erhaltenen Isolats zur Derivatisierung verwendet (ca. 6  $\mu$ g  $\alpha$ -Tocotrienol).

#### 4.5.5 Derivatisierung zum Methylether

Riss et al. [ris 94] entwickelten ein Verfahren zur Derivatisierung von Tocopherolen zum Methylether. Dieser Ansatz wurde hier aufgegriffen und leicht modifiziert zur Herstellung von Tocotrienol-Methylethern genutzt.

##### 4.5.5.1 Methode I, modifiziert nach [ris 94]

In einem 1,3 mL Braunglasfläschchen mit Schraubdeckel (z. B. Macherey Nagel, Nr. 70213.2) werden ca. 10  $\mu$ g Tocopherol, Tocotrienol bzw. Tocotrienol-Seitenkettenisomer in 50  $\mu$ L Ethylenglycoldimethylether gelöst. Während des ganzen Vorgehens wird die Lösung mit einem Magnetstäbchen (8  $\times$  3 mm) gerührt. Es werden tropfenweise 25  $\mu$ L Kaliumhydroxid-Lösung zugegeben. Während das Gläschen mit Stickstoff gespült wird, werden 30  $\mu$ L Dimethylsulfat zugetropft und das Gefäß anschließend verschlossen. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur werden im Stickstoffstrom weitere 15  $\mu$ L Dimethylsulfat zugefügt. Nach weiteren zwei Stunden wird das Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen, 100  $\mu$ L Wasser zugefügt und die Methylether zwei mal mit je 500  $\mu$ L n-Hexan extrahiert. Nach der Phasentrennung werden die n-Hexan-Phasen in einem zweiten 1,3 mL Schraubdeckel-Braunglasfläschchen vereinigt. Die Lösung ist zum Einspritzen in die HPLC geeignet.

##### 4.5.5.2 Methode II (doppelter Ansatz wie Methode I)

Die Methode wird mit den jeweils doppelten Mengen an Reagenzien und Extraktionslösungsmitteln analog zu Methode I durchgeführt. In Abwandlung werden 4 mL-Flaschen (Unicam, Nr. 9435 080 35001) mit 13 mm-Steckdeckel und geschlitztem Septum (Unicam, Nr. 9435 025 20810) benutzt und der Inhalt während der Durchführung vor Licht geschützt. Die Methylether werden dreimal statt zweimal extrahiert und die Extrakte (insgesamt 3 mL) z. B. in einem 5 mL-PE-Röhrchen mit Steckdeckel vereinigt.

#### 4.5.6 Vollständigkeit der Veretherung

Die Autoren Riss et al. [ris 94] geben die Vollständigkeit der Veretherung für Tocopherole nach GC-Bestimmung mit 40 % an. Für die oben beschriebene, nur leicht modifizierte Methode I nach Riss et al. ergab sich nach eigener Untersuchung für Tocotrienole allerdings ein anderes Bild. So wurde *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether in einer Konzentration von 10 mg/L, gelöst in Acetonitril Rotisolv, mit Hilfe der analytischen  $\beta$ -PM Cyclodextrin-Phase mit gleichzeitiger amperometrischer und Fluoreszenz-Detektion untersucht. Die chromatographischen Bedingungen sind in Abschnitt 4.2.4) beschrieben. Während mit Fluoreszenz-Detektion *ein* Peak bei einer Retentionszeit von

37,56 min mit einer Intensität von ca. 8 mV erscheint (siehe Abbildung 4-15) ist zur gleichen Zeit mit amperometrischer Detektion kein Signal zu erkennen (siehe Abbildung 4-14).

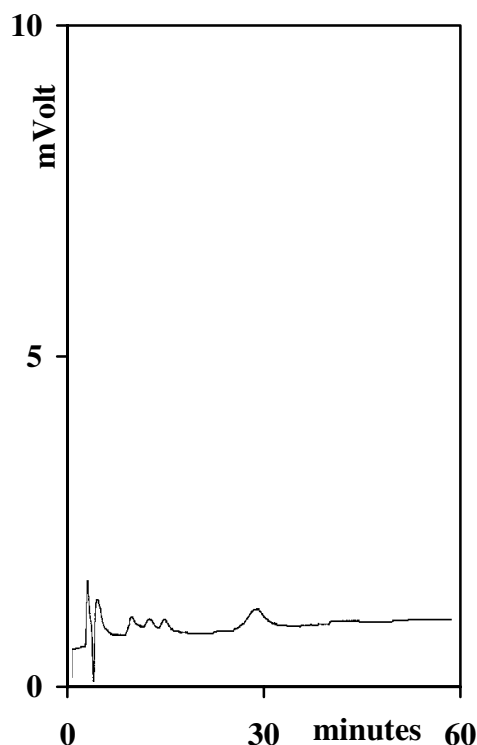


Abbildung 4-14 Kontrolle der Veretherung von  $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase mit amperometrischer Detektion.

Die amperometrische Detektion zeigt, daß bei der Veretherung von *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol nur Spuren des Eduktes zurückbleiben (RT = 29,0 min). Das Produkt *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether ergibt durch den Verlust der freien OH-Gruppe keinen Response unter diesen Bedingungen.

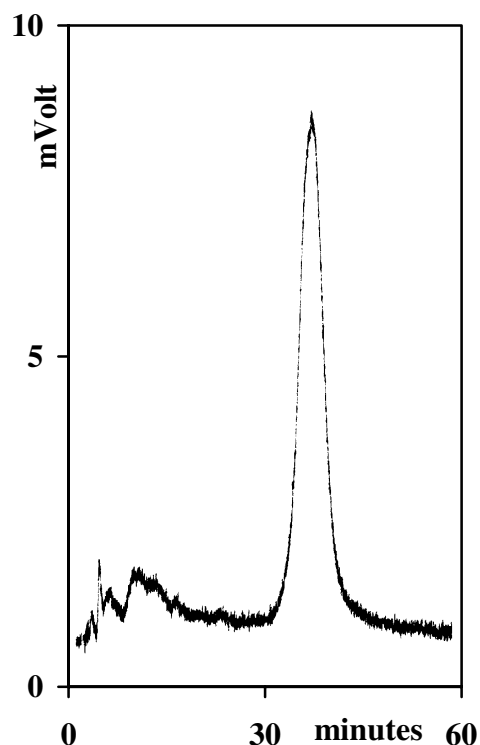


Abbildung 4-15 Kontrolle der Veretherung von  $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf der  $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.

Mit einer Retentionszeit von 37,56 min eluiert *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether, wie mit der Fluoreszenz-Detektion zu erkennen ist. Das Edukt ist mit dieser Methode nicht mehr detektierbar.

Diese Beobachtung ist damit zu erklären, daß das Reaktionsprodukt Methylether weiterhin fluoreszenzaktiv wirkt, jedoch durch den Verlust der freien OH-Gruppe am Chromanolring nicht mehr wie das entsprechende Tocotrienol im amperometrischen Detektor oxidiert werden kann. Das schwache Signal bei der elektrochemischen Detektion bei 29 min dagegen läßt auf einen Rest nicht umgesetztes *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol schließen. Bei einem Vergleich mit Abschnitt 3.8.7 (Abschätzung der Nachweisgrenze für RS,cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether) ergibt sich, daß bei einer Konzentration von beispielsweise ca. 0,2 mg/L *trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol ein Detektor-Signal von ca. 4 mV zu erwarten wäre. Da dieser Response bei der elektrochemischen Detektion aus dem

unten abgebildeten Chromatogramm bei weitem nicht hervorgeht, kann man davon ausgehen, daß der Anteil des Eduktes *trans-trans-α*-Tocotrienol neben dem Methylierungsprodukt unter 2 % (0,2 von 10 mg/L) liegt und damit für die weiteren Berechnungen vernachlässigt werden kann. Außerdem kann damit ausgeschlossen werden, daß es sich bei der unten beschriebenen Trennung auf chiraler Phase um eine Trennung von  $\alpha$ -Tocotrienol von seinem Derivatisierungsprodukt handelt.

#### 4.5.7 Eignung der $\beta$ -PM Cyclodextrin-Phase für die Enantiomerentrennung

Wie in Abbildung 3-9 dargestellt, ist am Beispiel von *trans-trans-α*-Tocotrienol-Methylether auf der chiralen  $\beta$ -PM Cyclodextrin-Phase nur eine geringe Antrennung zu erkennen, wobei es sich wahrscheinlich um die Enantiomere *R,trans-trans-α*-Tocotrienol-Methylether und *S,trans-trans-α*-Tocotrienol-Methylether handelt. Diese stationäre Phase wurde deshalb für eine befriedigende Trennung der RS-Enantiomere aller Tocotrienole nicht in Betracht gezogen.

#### 4.5.8 Herstellung der Probelösungen

Nr.	Edukt	zur Derivatisierung verwendete Menge	verwendete Methode	Konzentration des Produkts (Methylether in Meßlösung)
1	RS, <i>cis-cis-α</i> -Tocotrienol	36 $\mu$ g	II	12,2 mg/L
2	RS, <i>cis/trans-α</i> -Tocotrienol (2. Peak)	36 $\mu$ g	II	12,2 mg/L
3	RS, <i>cis/trans-α</i> -Tocotrienol (3. Peak)	36 $\mu$ g	II	12,2 mg/L
4	RS, <i>trans-trans-α</i> -Tocotrienol	36 $\mu$ g	II	12,2 mg/L
5	$\alpha$ -Tocotrienol-Referenz (alle RS, <i>cis/trans</i> -Isomere)	32 $\mu$ g	II	12,2 mg/L
6	$\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett	6,0 $\mu$ g	II	3,1 mg/L (Extr. mit insg. 2 mL n-Hexan), danach Konzentrierung um den Faktor 10
7	$\alpha$ -Tocotrienol aus Palmöl	4,3 $\mu$ g	I	4,4 mg/L
8	$\beta$ -Tocotrienol-Referenz (alle RS, <i>cis/trans</i> -Isomere)	34 $\mu$ g	II	11,7 mg/L
9	$\gamma$ -Tocotrienol-Referenz (alle RS, <i>cis/trans</i> -Isomere)	35 $\mu$ g	II	12,0 mg/L (dann Verdünnung 1:3)
10	$\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl	3,0 $\mu$ g	I	3,1 mg/L
11	$\delta$ -Tocotrienol-Referenz (alle RS, <i>cis/trans</i> -Isomere)	34 $\mu$ g	II	11,7 mg/L
12	$\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl	1,4 $\mu$ g	I	1,4 mg/L
13	<i>all-rac-α</i> -Tocopherol-Referenz	32 $\mu$ g	II	11,0 $\mu$ g/L
14	$\alpha$ -Tocopherol aus Palmöl	3,0 $\mu$ g	I	3,1 mg/L

## 4.5.9 Herstellung der Probelösungen für die Koinjektion

### 4.5.9.1 $\alpha$ -Tocotrienol aus Palmöl

100  $\mu$ L  $\alpha$ -Tocotrienol-Lösung (Probelösung 7) wurden im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt, 20  $\mu$ L RS,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (Probelösung 4) dazugegeben, mit 80  $\mu$ L Isohexan verdünnt und gemischt.

### 4.5.9.2 $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett

20  $\mu$ L  $\alpha$ -Tocotrienol-Lösung (Probelösung 6) wurden mit 100  $\mu$ L RS,*trans-trans*- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (Probelösung 4) vereinigt und gemischt.

### 4.5.9.3 $\gamma$ -Tocotrienol aus Palmöl

50  $\mu$ L  $\gamma$ -Tocotrienol-Lösung (Probelösung 10) wurden mit 100  $\mu$ L RS,*cis/trans*- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether (unverdünnte Probelösung 9) vereinigt, mit 150  $\mu$ L Isohexan verdünnt und gemischt.

### 4.5.9.4 $\delta$ -Tocotrienol aus Palmöl

100  $\mu$ L  $\delta$ -Tocotrienol-Lösung (Probelösung 12) wurden mit 50  $\mu$ L RS,*cis/trans*- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether (Probelösung 11) vereinigt und gemischt.

### 4.5.9.5 $\alpha$ -Tocopherol aus Palmöl

100  $\mu$ L  $\alpha$ -Tocopherol-Methylether-Lösung (Probelösung 14) wurden im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und der Rückstand in 50  $\mu$ L *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether (Probelösung 13) gelöst.

## 4.5.10 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Pumpe:	LaChrom pump L-7100 (Merck Hitachi)
Injektionsvolumen:	20 $\mu$ L
Eluent:	0,05 % 2-Propanol in Isohexan (v/v), isokratisch
Flußrate:	1,0 mL/min:
HPLC-Säule:	Chiralcel OD-H (250 $\times$ 4,6 mm ID, Adsorbentyp Cellulosecarbamatderivat, Partikelgröße 5 $\mu$ m, Porenweite 1000 Å, Daicel Chemical Industries, Ltd., Vertrieb durch Mallinckrodt Baker, Nr. 7582-00)
Detektor:	Fluoreszenz Detektor LaChrom FL-detector L-7480 (Merck Hitachi)
Detektion:	Emissionswellenlänge: 330 nm Anregungswellenlänge: 295 nm
HPLC-Software	Knauer EuroChro 2000, Version 2.1
Konzentration der Methylether-Referenzsubstanzen	ca. 10 mg/L

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dieser Arbeit sind die Grundlagen gelegt, Vitamin-E-Analytik in einer neuen Dimension zu verwirklichen. Zum ersten Mal können RS,*cis/trans*-Tocotrienol-Isomere von den in der Natur nur als R,*trans-trans*-Tocotrienolen vorkommenden chromatographisch getrennt werden. Die Methodik ist nicht nur für synthetische Referenzsubstanzen geeignet, sondern hat sich auch bei der Bestimmung von Tocotrienol-Isomeren aus komplexen Matrices bewährt, wie an mehreren Beispiel gezeigt wurde.

Die geometrischen *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere können auf mehreren HPLC-Phasen getrennt werden, wobei sich *eine* für die Trennung der RS-Stereoisomere eignet:

1. Eine RP18-Phase erlaubt in einer Multimethode durch Gradienten-Elution die Identifizierung von Tocotrienol-Seitenkettenisomeren neben einer Vielzahl von anderen Antioxidantien.
2. Wiederum auf einer RP18-Phase können mit einem modifiziertem Gradienten bereits zehn der insgesamt 16 *cis/trans*-Tocotrienol-Isomere getrennt werden.
3. 13 von 16 Tocotrienol-Seitenkettenisomeren sind durch eine Silberionen-Chromatographie mit Gradientenelution zugänglich.
4. Bei getrennt injizierten Tocotrienol-Homologen können in einer isokratischen Methode mit einer permethylierten  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase jeweils die vier möglichen *cis/trans*-Isomere basisliniengetreunt chromatographiert werden. Die Elutionsreihenfolge dieser Isomere wurde durch spektroskopische Untersuchungen bestimmt.
5. Die RS,*cis/trans*-Tocotrienol-Stereoisomere sind schließlich durch eine Cellulosecarbammat-Phase trennbar. In Kombination mit einer vorherigen präparativen Isolierung der *cis/trans*-Isomere kann so jedes Seitenkettenisomer in seine Enantiomere dividiert werden, wie am Beispiel von  $\alpha$ -Tocotrienol demonstriert wurde.

Sollen Tocotrienole aus realen Proben, wie z. B. Lebensmitteln, Nahrungsergänzungs- oder Arzneimitteln, charakterisiert werden, ist vor der Isomerenbestimmung in den meisten Fällen eine semipräparative Vortrennung auf einer Diol-Phase unerlässlich. Damit können die Tocotrienole von den anderen Vitamin-E-Homologen und weiteren störenden Begleitstoffen abgetrennt werden. Mit Hilfe dieser Mehr-Säulen-Chromatographie wurden Versuche zu Bedeutung und Vorkommen von *cis/trans*-Tocotrienolen durchgeführt:

1. In einer Art Pilotexperiment konnte am Beispiel des Huhns gezeigt werden, daß alle *cis/trans*-Isomere von  $\alpha$ -Tocotrienol bioverfügbar sind, da sie nach Fütterung im Hühnereigelb nachgewiesen werden konnten. Dieses Resultat ist von Bedeutung, da durch die Aufnahme in den Organismus

die biologische Aktivität der Seitenkettenisomere bedacht werden muß, über die aber bis jetzt noch keine Untersuchungen vorliegen.

2. Versuche mit menschlichen Leber- und Magen­zellen unter Verwendung von  $\gamma$ -Tocotrienol brachten das Ergebnis, daß Leberzellen im Gegensatz zu Magen­zellen einzelne Seitenkettenisomere bei oder nach der Aufnahme in die Zellmembran diskriminieren. Dies kann als erster Hinweis gelten, daß *cis/trans*-Isomere unterschiedliches physiologisches Verhalten aufweisen.
3. Es wurde untersucht, ob der katalytische Fetthärtungsprozeß als Quelle für *cis/trans*-Tocotrienole gelten kann. In keinem der überprüften gehärteten Öle konnte nachgewiesen werden, daß durch die technologische Hydrierung aus dem natürlich vorkommenden R,*trans-trans*-Tocotrienol dessen Isomere generiert worden sind.
4. Die biologische Hydrierung von ungesättigten Fettsäuren im Pansen von Wiederkäuern verursacht ebenfalls keinen detektierbaren Anteil von Tocotrienol-Seitenkettenisomeren, wie anhand  $\alpha$ -tocotrienolhaltiger Schafsmilch ermittelt wurde.
5. Bei der Untersuchung von RS,*cis/trans*-Tocotrienolen aus Palmöl mit der Cellulosecarbammat-Phase ist stets nur das Isomer mit der natürlichen R,*trans-trans*-Konfiguration nachgewiesen worden. Das bestätigt die Zuverlässigkeit der Methode.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, eröffnet sich dem Analytiker von nun an ein weites Feld für Studien auf dem biologisch-medizinischen Sektor. Solange die biologische Aktivität der Tocotrienol-Seitenketten nicht geklärt ist, sollte von einem breiten Einsatz in der menschlichen Ernährung abgesehen werden. Aber auch im Lebensmittelbereich besteht Untersuchungsbedarf, wenn synthetische Tocotrienol-Präparate Lebensmitteln direkt zugesetzt oder als Nahrungsergänzungsmittel in den Markt gebracht werden. Es wurden sogar Versuche unternommen, den Cholesteringehalt in Hühnereiern durch Fütterung der Hühner mit  $\alpha$ -Tocotrienol zu beeinflussen [bey 93], so daß auch solche Möglichkeiten, mit Tocotrienol-Seitenkettenisomeren konfrontiert zu werden, bedacht werden müssen.

Gegenwärtig werden 15.000-20.000 t *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol („synthetisches Vitamin E“) und 1.500-2.000 t semisynthetisches<sup>7</sup> „Vitamin E aus natürlichen Quellen“ (RRR- $\alpha$ -Tocopherol) hergestellt [net 96]. Trotz des Fortschritts in der stereoselektiven Synthese und aller Anstrengungen ist es bis jetzt nicht gelungen, eine wirtschaftliche Totalsynthese von RRR, $\alpha$ -Tocopherol zu entwickeln [net 96].

Zwar beträgt die Vitamin-E-Aktivität von  $\alpha$ -Tocotrienol nur 30 % von der des  $\alpha$ -Tocopherols, doch in Verbindung mit den anderen gesundheitserhaltenden Eigenschaften wie der Hemmung der

---

<sup>7</sup> Tocopherol-Homologe aus Sojaöl-Deodorierungsdestillat werden permethyliert und anschließend reduziert.

Cholesterinbiosynthese oder der speziellen Antitumorwirkung ist mit der zunehmenden Aufmerksamkeit der Verbraucher zu rechnen. Ein synthetisches Tocotrienol-Präparat dagegen, das sich dem preislichen Aspekt nach für eine umfangreiche Verwendung eignet, ist bis jetzt allerdings nicht auf dem Markt. In den USA bieten jedoch einige Firmen tocotrienolhaltige natürliche Extrakte in Kapselform an die sie speziell wegen des Tocotrienolgehaltes und den damit verbundenen gesundheitlichen Erwartungen anpreisen (z. B. The Life Extension Foundation, Hollywood, Florida mit „TOCOTRIENOL CAPSULES“; Eastman, Kingsport, Tennessee mit „NuTriene“; Bionutrics, Phoenix, Arizona mit „evolVE“ und Solgar, Leonia, New Jersey mit „Tocotrienols Complex Softgels“). In dem Fall, daß bei steigender Nachfrage ein synthetisches Tocotrienol-Präparat das günstigere ist, ist es sicherlich sinnvoll, eine geeignete Analytik zur Hand zu haben und die drängenden Fragen der Sicherheit schon vor der Verwendung zu prüfen.



## 6 Literaturverzeichnis

- abd 93 Abdollahi A, Rosenholtz NS, Garwin JL (1993) Tocopherol Micro-Extraction Method with Application to Quantitative Analysis of Lipophilic Nutrients, *Journal of Food Science* 58(3): 663-666
- abi 94 Abidi SL, Mounts TL (1994) Separation of tocopherols and methylated tocols on cyclodextrin-bonded silica, *J Chromatogr A* 670: 67-75
- acu 94 Acuff RV, Thedford SS, Hidioglou NN, Papas AM, Odom TA Jr (1994) Relative bio-availability of *RRR*- and all-*rac*- $\alpha$ -tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated compounds, *Am J Clin Nutr* 60: 397-402
- adl 94 Adlof RO (1994) Separation of *cis* and *trans* unsaturated fatty acid methyl esters by silverion high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 659: 95-100
- aoa 90 Alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetat in foods and feeds, Colorimetric method (971.30), Official methods of analysis, Assoc Off Anal Chem, 15th ed 1990, 2: 1071-1074
- aoa 90a Alpha -tocopheryl acetat (supplemental) in foods and feeds, Colorimetric method (948.26), Official methods of analysis, Assoc Off Anal Chem, 15th ed 1990, 2: 1075-1076
- aoa 90b Identification of *RRR*- or all-*rac*-tocopherol in drugs or feed supplements, Polarimetric method (975.43), Official methods of analysis, Assoc Off Anal Chem, 15th ed 1990, 2: 1074-1075
- ast 74 Astrup HN, Mills SC, Cook LJ, Scott TW (1974) Stability of  $\alpha$ -tocopherol in rumen liquor of the sheep, *Acta Vet Scand* 15: 451
- azz 92 Azzi A, Boscoboinik DO, Chatelain E (1992) Modulation of cell proliferation by tocopherols and tocotrienols: role in arteriosclerosis. In: Packer L, Ong ASH (Hrsg) Lipid-soluble antioxidants: biochemistry and clinical application. Birckhäuser Verlag Basel, S 123-133
- bal 92 Balz MK, Schulte E, Thier H-P (1992) HPLC separation of tocopherols and tocotrienols, *Fat Sci Technol* 94: 209-213
- bal 93 Balz MK, Schulte E, Thier H-P (1993) Simultaneous Determination of  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate, Tocopherols and Tocotrienols by HPLC with Fluorescence Detection in Foods, *Fat Sci Technol* 6: 215-220
- ber 92 Berthod A, Chang S-C, Armstrong DW (1992) Empirical Procedure That Uses Molecular Structure To Predict Enantioselectivity of Chiral Stationary Phase, *Anal Chem* 64(4): 395-404
- ber 93 van den Berg H (1993) General aspects of bioavailability of vitamins. In: Bundesforschungsanstalt für Ernährung (Hrsg) Bioavailability '93, BFE-R-93-01, Karlsruhe, S 267-278
- bey 93 Beyer RC, Jensen LS (1993) Tissue and Egg Cholesterol Concentrations of Laying Hens Fed High-Protein Barley Flour,  $\alpha$ -Tocotrienol, and Cholesterol, *Poultry Science* 72: 1339-1348
- bud 95 Budin JT, Breene WM, Putnam DH (1995) Some Compositional Properties of Camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) Seeds and Oils, *J Am Oil Chem Soc* 72: 309-315

- bur 90 Burton GW, Traber MG (1990) Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bio-availability, *Annu Rev Nutr* 10: 357-382
- cha 94 Chase GW Jr, Akoh CC, Eitenmiller RR (1994) Analysis of Tocopherols in Vegetable Oils by High-Performance Liquid Chromatography, *J Am Oil Chem Soc* 71: 877-880
- chr 81 Christie WW (ed) (1981) *Lipid metabolism in ruminant animals*. Pergamon Press, Oxford New York Ontario Potts Point Paris Kronberg/Taunus
- coh 81 Cohen N, Scott CG, Neukom C, Lopresti RJ, Weber G, Saucy G (1981) Total Synthesis of All Eight Stereoisomers of  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate. Determination of Their Diastereoisomeric and Enantiomeric Purity by Gas Chromatography, *Helv Chim Acta* 64(4): 1158-1173
- coh 97 Cohn W (1997) Bioavailability of vitamin E, *Europ J Clin Nutr* 51(Suppl1): 580-585
- com 88 Commission on oils, fats and derivatives (1988) Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography, Results of a collaborative study and the standardised method, *Pure & Appl Chem* 60(6): 877-892
- coo 84 Coors U (1984) Bestimmung und Verteilung von Tocopherolen und Tocotrienolen in Lebensmitteln, Dissertation, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg
- cor 83 Cort WM, Vicente TS, Waysek EH, Williams BD (1983) Vitamin E Content of Feedstuffs Determined by High-Performance Liquid Chromatographic Fluorescence, *J Agr Food Chem* 31: 1330-1333
- dai 98 Daicel Chemical Industries, Ltd, Vertrieb durch Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland: Aktuelle Produktinformation (1998) zur HPLC-Säule CHIRALCEL OD-H
- des 80 Desai ID (1980) Assay Methods. In: Machlin LJ (Hrsg) *Vitamin E: A Comprehensive Treatise*, Marcel Dekker, New York, S 67-98
- dgf 84 DGF Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, bearbeitet und herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft e. V. (DGF), Stand 1984/1, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Methode C-III 1b (77)
- dob 95 Dobson G, Christie WW, Nikolova-Damyanova B (1995) Silver ion chromatography of lipids and fatty acids, *J Chromatogr B* 671: 197-222
- dro 98 Drotleff AM, Ternes W (1998) Separation and characterization of *cis-trans* isomers of  $\alpha$ -tocotrienol by HPLC using a permethylated  $\beta$ -cyclodextrin phase, *Z Lebensm Unters Forsch A* 206: 9-13
- dut 94 Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Campbell FM, Duthie GG, James WPT (1994) Vitamin E requirements, transport, and metabolism: Role of  $\alpha$ -tocopherol-binding proteins, *J Nutr Biochem* 5: 562-570
- eas 98 Produktinformation zu „NuTriene“ Tocotrienol-Extrakt, Eastman Chemical Company, Kingsport, Tennessee, Februar 1998
- eic 97 Eicher SD, Morill JL, Velazco J (1997) Bioavailability of  $\alpha$ -Tocopherol Fed with Retinol and Relative Bioavailability of D- $\alpha$ -Tocopherol or DL- $\alpha$ -Tocopherol Acetate, *J Dairy Sci* 80: 393-399
- elm 93 Elmadfa I, Faist V (1993) Bioavailability of vitamin E. In: Bundesforschungsanstalt für Ernährung (Hrsg) *Bioavailability '93*, BFE-R-93-01, Karlsruhe, S 300-308
- eva 22 Evans HM, Bishop KS (1922) On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction, *Science* 56: 650-651

- fer 93 Ferslew KE, Acuff RV, Daigneault EA, Woolley TW, Stanton PE Jr (1993) Pharmacokinetics and Bioavailability of the RRR and All Racemic Stereoisomers of Alpha-Tocopherol in Humans After Single Oral Administration, *J Clin Pharmacol* 33: 84-88
- gaß 95 Gaßmann B (1995) Natürlich vorkommende Vitamin-E-Formen – Geschichte und Stand ihrer Bewertung, *Ernährungsumschau* 42(11): 394-398
- ger 83 Gertz C (1983) Zur Analytik der natürlichen und Synthetischen Antioxidantien in Lebensmitteln, Dissertation, Fachbereich Chemie der Universität Hannover
- gli 91 Glinz E, Walther W, Maurer R, Ranalder UB, Poster präsentiert auf der „HPLC 91“, Basel, Schweiz, 3. - 9. Juni 1991
- gom 93 Gómez-Fernandez JC, Villain J, Aranda FJ (1993) Studies on the Interaction of Vitamin E with Phospholipid Membranes. In: Packer L, Fuchs J (Hrsg) *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong, S 223-234
- gov 72 Govind Rao MK, Perkins EG (1972) Identification and Estimation of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J Agr Food Chem* 20(2): 240-245
- gre 55 Green J, Marcinkiewicz S, Watt PR (1955) The determination of tocopherols by paper chromatography, *J Sci Food Agr* 6: 274-282
- gre 72 Green J (1972) Biogenesis. In: Sebrell WH Jr, Harris RS (Hrsg) *The Vitamins*, 2nd Ed, Vol V, Academic Press, New York, S 252-255
- gut 84 Gutcher GR, Raynor WJ, Farrell PM (1984) An Evaluation of Vitamin E Status in Premature Infants, *Am J Clin Nutr* 40: 1078-1089
- har 81 Harfoot CG (1981) Lipid Metabolism in the Rumen. In: Christie WW (Hrsg) *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*, Pergamon Press, Oxford New York Ontario Potts Point Paris Kronberg/Taunus
- hay 93 Hayes KC, Pronczuk A, Liang JS (1993) Differences in the Plasma Transport and Tissue Concentrations of Tocopherols and Tocotrienols: Observations in Humans and Hamsters, *P Soc Exp Biol Med* 202: 353-359
- hid 94 Hidioglou M, Ivan M, Toutain PL (1994) Metabolism of Tritiated D- $\alpha$ -Tocopherol and D- $\alpha$ -Tocopheryl Succinate in Intraruminally Dosed Sheep, *J Anim Sci* 72: 2124-2130
- hog 89 Hogarty CJ, Ang C, Eitenmiller RR (1989) Tocopherol Content of Selected Foods by HPLC/Fluorescence Quantification, *J Food Comp Anal* 2: 200-209
- huo 96 Huo J-Z, Nelis HJ, Lavens P, Sorgeloos P, De Leenheer AP (1996) Determination of Vitamin E in Aquatic Organisms by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Anal Biochem* 242: 123-128
- ict 96 ICT GmbH (1996) Problem Solving Techniques for Chiral Separations by LC and Capillary GC, Seminarunterlagen Juni 1996
- ike 96 Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Sugano M, (1996) Lymphatic Transport of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Tocotrienols and  $\alpha$ -Tocopherol in Rats, *Intern J Nutr Res* 66: 217-221
- ing 87 Ingold KU, Burton GW, Foster DO, Hughes L, Lindsay DA, Webb A (1987) Biokinetics of and Discrimination Between Dietary RRR- and SRR- $\alpha$ -Tocopherols in the Male Rat, *Lipids* 22(3): 163-172

- iun 78 IUNS (1978) International Union of Nutritional Sciences, Generic Descriptors and Trivial Names for Vitamins and Related Compounds: Recommendations (1976), *Nutr Abst Rev* 48A: 831-835
- iup 82 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1982) Nomenclature of Tocopherols and Related Compounds, Recommendations 1981, *Eur J Biochem* 123: 473-475
- iva 95 Ivanov SA, Aitzetmüller K (1995) Untersuchungen über die Tocopherol- und Tocotrienol-zusammensetzung der Samenöle einiger Vertreter der Familie Apiaceae, *Fat Sci Technol* 97(1): 24-29
- jen 94 Jenkins TC (1994) Regulation of Lipid Metabolism in the Rumen, *J Nutr* 124 (8 Suppl): 1372S-1376G
- kam 96 Kamal-Elfdin A, Appelqvist LÅ (1996) The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols, *Lipids* 31(7): 671-701
- kas 80 Kasperek S (1980) Chemistry of Tocopherols and Tocotrienols. In: Machlin LJ (Hrsg) *Vitamin E: A Comprehensive Treatise*, Marcel Dekker, New York, Chapter 2
- kat 85 Kato A, Yamaoka M, Tamaka A, Komiyama K, Umezawa I (1985) Physiological effects of tocotrienol, *Abura Kagaku* 34: 375-376
- kay 93 Kayden HJ, Traber MG (1993) Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans, *J Lipid Res* 34: 343-358
- kep 71 Kepler CR, Tucker WP, Tove SB (1971) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. V. stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -transisomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, *J Biol Chem* 246: 2765-2771
- kiy 95 Kiyose C, Muramatsu R, Fujiyama-Fujiwara Y, Ueda T, Igarashi O (1995) Biodiscrimination of  $\alpha$ -Tocopherol Stereoisomers During Intestinal Absorption, *Lipids* 30(11): 1015-1018
- kiy 97 Kiyose C, Muramatsu R, Kameyama Y, Ueda T, Igarashi O (1997) Biodiscrimination of  $\alpha$ -tocopherol stereoisomers in humans after oral administration, *Am J Clin Nutr* 65: 785-789
- kom 89 Komiyama K, Iizuka K, Yamaoka M, Watanabe H, Tsuchiya N, Umezawa I (1989) Studies on the Biological Activity of Tocotrienols, *Chem Pharm Bull* 37(5): 1369-1371
- kom 92 Komiyama K, Yamaoka M (1992) Antitumor Activity of Tocotrienols. In: Packer L, Fuchs J (Hrsg) *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong, S 529-532
- kon 96 Konings EJM, Roomans HHS, Beljaars PR (1996) Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Margarine, Infant Foods, and Vegetables, *Journal of AOAC International* 79(4): 902-906
- kra 97 Kramer JKG, Blais L, Fouchard RC, Melnyk RA, Kallury KMR (1997) A Rapid Method for the Determination of Vitamin E Forms in Tissues and Diet by High-Performance Liquid Chromatography Using a Normal-Phase Diol Column, *Lipids* 32 (3): 323-220
- lan 97 Lane JR, Webb LW, Acuff RV (1997) Concurrent liquid chromatographic separation and photodiode array detection of retinol, tocopherols, all-trans- $\alpha$ -carotene, all-trans- $\beta$ -carotene and the mono-cis isomers of  $\beta$ -carotene in extracts of human plasma, *J Chromatogr A* 787: 111-118

- leh 82 Lehmann J, Martin HL (1982) Improved Direct Determination of Alpha- and Gamma-Tocopherols in Plasma and Platelets by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Clin Chem* 28: 1784-1787
- lie 96 Lietz G, Henry CJK (1996) A modified method to minimise losses of carotenoids and tocopherols during HPLC analysis of red palm oil, *Food Chem* 60(1): 109-117
- loz 93 Lozano YF, Mayer CD, Bannon C, Gaydou EM (1993) Unsaponifiable Matter, Total Sterol und Tocopherol Contents of Avocado Oil Varieties, *JAOCS* 70(6): 561-565
- mac 96 Macherey-Nagel (1996) Produktinformation zur HPLC Trennsäule ET 200/4 NUCLEODEX  $\beta$ -PM
- mar 59 Marcinkiewicz S, Green J (1959) The complete analysis of tocopherol mixtures, Part II, The separation of nitroso-tocopherols by paper chromatography and their determination, *Analyst* 84: 304-312
- may 67 Mayer H, Metzger J, Isler O (1967) Die Stereochemie von natürlichem  $\gamma$ -Tocotrienol (Plastochromanol-3), Plastochromanol-8 und Plastochromenol-8, *Helv Chim Acta* 139: 1376-1393
- mei 96 Meier B (1996) Unterlagen zum Kurs „Zellkulturtechnik“ am Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Januar 1996
- men 91 Menges RA, Armstrong DW (1991) Chiral separations using native and functionalized cyclodextrin-bonded stationary phases in high-pressure liquid chromatography. In: Ahujy S (Hrsg) *Chiral Separation by Liquid Chromatography*, ACS Symposium series 471, American Chemical Society, Washington, DC, S. 67-100
- mer 96 Merck-Index CD-ROM, Stand 1996, Metlis-CD, Merck Thyroid Literature Service on CD-Rom, Cary N Mariash, Bd.6, 1996, H5, S 496
- mom 98 Momchilova S, Nikolova-Damyanova B, Christie WW (1998) Silver ion high-performance liquid chromatography of isomeric *cis*- and *trans*-octadecenoic acids, Effect of the ester moiety and mobile phase composition, *J Chromatogr A* 793: 275-282
- mur 96 Murkovic M, Hillebrand A, Winkler J, Pfannhauser W (1996) Variability of vitamin E content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.), *Z Lebensm Unters Forsch* 202: 275-278
- nes 95 Nesaretnam K, Guthrie N, Chambers AF, Carroll K (1995) Effect of Tocotrienols on the Growth of a Human Breast Cancer Cell Line in Culture, *Lipids* 30(2): 1139-1143
- net 96 Netscher Tocopherol (1996) Stereoisomers of Tocopherols – Syntheses and Analytics, *Chimia* 50: 563-567
- nie 73 ermination of free tocopherols in plant oils by liquid-solid chromatography, *Anal Biochem* 52: 533-537
- nik 96 Nikolova-Damyanova B, Christie WW, Herslöf B (1996) Mechanistic aspects of fatty acid retention in silver ion chromatography, *J Chromatogr A* 749: 47-54
- ong 93 Ong ASH (1993) Natural Sources of Tocotrienols. In: Packer L, Fuchs J (Hrsg) *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong, S 3-8
- pac 92 Packer L (1992) New horizons in vitamin E research – The vitamin E cycle, biochemistry, and clinical application. In: Packer L, Ong ASH (Hrsg) *Lipid-soluble antioxidants: biochemistry and clinical application*. Birkhäuser Verlag Basel, S 1-16

- pac 93 Packer L, Kagan VE (1993) Vitamin E: The Antioxidant Harvesting Center of Membranes and Lipoproteins. In: Packer L, Fuchs J (Hrsg) Vitamin E in Health and Disease. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong, S 977-982
- pac 93a Packer L, Kagan VE (1993) Vitamin E: The Antioxidant Harvesting Center of Membranes and Lipoproteins. In: Packer L, Fuchs J (Hrsg) Vitamin E in Health and Disease. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong, S 179-192
- par 93 Parker RA, Pearce BC, Clark RW, Gordon DA, Wright JJK (1992) Tocotrienols Regulate Cholesterol Production in Mammalian Cells by Post-transcriptional Suppression of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase, J Biol Chem 268(15): 11230-11238
- pat 94 Patterson HBW (1994) Hydrogenation of fats and oils: Theory and Practice. AOCS Press, Champaign/Illinois
- pea 92 Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Qureshi AA, Wright JJK (1992) Hypocholesterolemic Activity of Synthetic and Natural Tocotrienols, J Med Chem 35: 3595-3606
- pea 94 Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Dischino DD, Gillespie E, Qureshi AA, Volk K, Wright JJK (1994) Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis. 2. Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Benzopyran and Tetrahydronaphthalene Analogues of the Tocotrienols, J Med Chem 37: 526-541
- pet 95 Peterson DM (1995) Oat Tocols: Concentration and Stability in Oat Products and Distribution Within the Kernel, Cereal Chem 72(1): 21-24
- pfa 95 Pfalzgraf A, Steinhart H, Frigg M (1995) Rapid determination of  $\alpha$ -tocopherol in muscle and adipose tissues of pork, Z Lebensm Unters Forsch 200: 190-193
- pii 84 Piironen V, Varo P, Syvaaja E-L, Salminen K, Koivistoinen P (1998) High-Performance Liquid Chromatography of Tocopherols and Tocotrienols and Its Application to Diets and Plasma of Finnish Men, Internat J Vit Nutr Res 54: 35-40
- pii 91 Piironen VI, Liljeroos AI, Koivistoinen PE (1991) Transfer of  $\alpha$ -Tocopherol Stereoisomers from Feeds to Eggs, J Agric Food Chem 39: 99-101
- poc 88 Pocklington WD, Diefenbacher A (1988) Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by High-Performance Liquid Chromatography. Results of a Collaborative Study and the Standardised Method, Pure & Appl Chem 60: 877-892
- pod 96 Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L (1996) Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones, J Lipid Res 37: 893-901
- pre 97 Precht D, Molkentin J (1997) Effect of feeding on *trans* positional isomers of octadecenoic acid in milk fats, Milchwissenschaft 52(10): 564-568
- pum 93 Pumfrey AM, DeYonge KG, Slusark JA, Garber MJ, Roeder RA, Sanchez WK, Schelling GT (1993) Absorption of various forms of vitamin E from digestive tract and transfer across the mammary gland in lactating dairy cows, J Anim Sci 71 (suppl. 1): 256 (abs)
- qis 98 Qi G-H, Sim JS (1998) Natural Tocopherol Enrichment and Its Effect in *n*-3 Fatty Acid Modified Chicken Eggs, J Agric Food Chem 46: 1920-1926
- qur 91 Qureshi AA, Qureshi N, Hasler-Rapacz JO, Weber FE, Chaudhary V, Crenshaw TD, Gapor A, Ong ASH, Chong YH, Peterson D, Rapacz J (1991) Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, thromboxane B<sub>2</sub>, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias, Am J Clin Nutr 53: 1042S-1046S

- rab 87 Rabascall NH, Riera JB (1987) Variaciones del contenido en tocoferoles y tocotrienoles durante los procesos de obtención, refinación e hidrogenación de aceites comestibles, *Grasas y Aceites* 38(3): 145-148
- ram 85 Rammell CG, Hoogenboom JJL (1985) Separation of Tocols by HPLC on an Amino-Cyano Polar Phase Column, *J Liquid Chromatogr* 8: 707-717
- ris 94 Riss G, Kormann AW, Glinz E, Walther W, Ranalder UB (1994) Separation of Eight Stereoisomers of all-rac- $\alpha$ -Tocopherol from Tissues and Plasma: Chiral Phase High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gas Chromatography, *Methods in Enzymology* 234: 302-327
- rog 93 Rogers EJ, Rice SM, Nicolosi RJ, Carpenter DR, McClelland CA, Romancyk LJ Jr (1993) Identification and Quantitation of  $\gamma$ -Oryzanol Components and Simultaneous Assessment of Tocols in Rice Bran Oil, *JAOCS* 70(3): 301-307
- run 89 Runge G, Steinhart H (1989) Zur Tocochromanol- und Fettsäureanalytik im Fisch, *Fat Sci Technol* 7: 281-287
- sch 63 Schudel P, Mayer H, Metzger J, Rüegg R, Isler O (1963) Über die Chemie des Vitamin E. V. Die Synthese von *rac. all-trans*- $\zeta_1$ - und - $\epsilon$ -Tocopherol, *Helv Chim Acta* 46: 2517-2526
- sch 72 Schudel P, Mayer H, Isler O (1972) Chemistry. In: Sebrell WH Jr, Harris RS (Hrsg) *The Vitamins*, 2nd Ed, Vol V, Academic Press, New York, S 168-218
- sch 92 Schwarz K, Ternes W (1992) Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenol diterpene with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC, *Z Lebensm Unters Forsch* 195(2): 95-98
- sco 76 Scott JW, Bizzarro FT, Parrish DR, Saucy G (1979) Syntheses of (2*R*,4'*R*,8'*R*)- $\alpha$ -Tocopherol and (2*R*,3'*E*,7'*E*)- $\alpha$ -Tocotrienol, *Helv Chim Acta* 59(1): 290-306
- ser 91 Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L (1991) Free radical recycling and intramembran mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol, *Free Radical Biology & Medicine* 10: 263-275
- she 93 Sheppard AJ, Pennington JAT, Weihrauch JL (1993) Analysis and Distribution of Vitamin E in Vegetable Oils and Foods. In: Packer L, Fuchs J (Hrsg) *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker New York, Basel, Hong Kong, S 9-31
- slo 81 Slover HT, Thompson RH Jr (1981) Chromatographic Separation of the Stereoisomers of  $\alpha$ -Tocopherol, *Lipids* 16(4): 268-275
- str 91 Stryer L (1991) *Biochemie*, Spektrum Akadem Verlag, Heidelberg Berlin New York
- str 98 Strohschein S, Pursch M, Lubda D, Albert K (1998) Shape Selectivity of C<sub>30</sub> Phases for RP-HPLC Separation of Tocopherol Isomers and Correlation with MAS NMR Data from Suspended Stationary Phase, *Anal Chem* 70: 13-18
- sua 93 Suarna C, Hood RL, Dean RT, Stocker R (1993) Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins, *Biochim Biophys Acta* 1166: 163-170
- sun 89 Sundram K, Khor HT, Ong AS, Pathmanathan R (1989) Effects of dietary palm oil on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene, *Canc Res* 49: 1447-1451
- sun 92 Sundram K, Gapor A (1992) Vitamin E from palm oil: its extraction and nutritional properties

- suz 93 Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L (1993) Structural and Dynamic Membrane Properties of  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -Tocotrienol: Implication to the Molecular Mechanism of Their Antioxidant Potency, *Biochemistry* 32: 10692-10699
- tan 89 Tan B, Brzuskiwicz L (1989) Separation of Tocopherol and Tocotrienol Isomers Using Normal- and Reverse-Phase Liquid Chromatography, *Anal Biochem* 180: 368-373
- tat 71 Tatsua Tocopherol (1971) Relationship between chemical structure and biological activity of vitamin E. I. Free tocopherols, *Vitamins (Japan)* 44: 185-190
- tay 81 Taylor P, Barnes P (1981) Analysis for Vitamin E in Edible Oils by High-Performance Liquid Chromatography, *Chem and Ind* 1981:722-726
- ter 95 Ternes W, Krämer P, Menzel R, Zeilfelder K (1995) Verteilung von fettlöslichen Vitaminen (A, E, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>) und Carotinoiden (Lutein, Zeaxanthin) in den Lipiden von Granula und Plasma des Eigelbs, *Archiv für Geflügelkunde* 5: 261-268
- tho 79 Thompson JN, Hatina G (1979) Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Food and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography, *J Liquid Chromatogr* 2: 327-344
- tra 88 Traber MG, Ingold KU, Burton GW, Kayden HJ (1988) Absorption and Transport of Deuterium-Substituted 2R,4R,8R- $\alpha$ -Tocopherol in Human Lipoproteins, *Lipids* 23(8): 791-797
- ued 87 Ueda T, Igarashi O (1987) Effect of Coexisting Fat on the Extraction of Tocopherols from Tissues after Saponification as a Pretreatment for HPLC Determination, *Journal of Micronutrient Analysis* 3: 15-25
- ued 93 Ueda T, Ichikawa H, Igarashi O (1993) Determination of  $\alpha$ -Tocopherol Stereoisomers in Biological Specimens Using Chiral Phase High-Performance Liquid Chromatography, *J Nutr Sci Vitaminol* 39: 201-219
- ura 83 Urano S, Nakano S-I, Matsuo M (1983) Synthesis of *dl*- $\alpha$ -Tocopherol and *dl*- $\alpha$ -Tocotrienol, *Chem Pharm Bull* 31(12): 4341-4345
- vec 90 Vecchi M, Walther W, Glinz E, Netscher T, Schmid R, Lalonde M, Vetter W (1990) Chromatographische Trennung und quantitative Bestimmung aller acht Stereoisomeren von  $\alpha$ -Tocopherol, *Helv Chim Acta* 73: 782-789
- wan 93 Wang L, Newman RK, Newman CW, Jackson LL, Hofer PJ (1993) Tocotrienol and fatty acid composition of barley oil and their effect on lipid metabolism, *Plant Foods for Human Nutrition* 43: 9-17
- war 90 Warner K, Mounts TL (1990) Analysis of Tocopherols und Phytosterols in Vegetable Oils by HPLC with Evaporative Light-Scattering Detection, *J Am Oil Chem Soc* 67: 827-831
- wat 93 Watkins T, Lenz P, Gapor A, Struck M, Tomeo A, Bierenbaum M (1993)  $\gamma$ -Tocotrienol as a Hypocholesterolemic and Antioxidant Agent in Rats Fed Atherogenic Diet, *Lipids* 28(12): 1113-1118
- wei 96 Weiser H, Riss G, Kormann AW (1996) Biodiscrimination of the Eight  $\alpha$ -Tocopherol Stereoisomers Results in Preferential Accumulation of the Four 2R Forms in Tissues and Plasma of Rats, *J Nutr* 126: 2539-2549
- yam 84 Yamaguchi H, Itakura Y, Kunihiro K (1984) Analysis of the Stereoisomers of  $\alpha$ -Tocopheryl acetate by HPLC, *Iyakuin Kenkyu* 15(4): 536-540



- yam 90 Yamaoka M, Carrillo MJH (1990) Effect of tocopherols and tocotrienols on the physico-chemical property of the liposomal membran in relation to their antioxidative activity, *Chemistry and Physics of Lipids* 55: 295-300

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{\text{Anr.}}$	Anregungswellenlänge
$\lambda_{\text{Em.}}$	Emissionswellenlänge
$\beta$ -PM	permethylierte $\beta$ -Cyclodextrin-Phase
Alk.	Alkohol
BHA	Butylhydroxyanisol (2-Tert-butyl-4-methylphenol)
BHT	Butylhydroxytoluol (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)
FS	Full Scale; Schreiber-Vollausschlag
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot (-Spektroskopie)
GC	Gaschromatographie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography; Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
ID	Innerer Durchmesser
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance; Kernmagnetische Resonanz (-Spektroskopie)
PTFE	Polytetrafluorethylen
RT	Retentionszeit
T	Tocopherol
T <sub>3</sub> bzw. T3	Tocotrienol
TEAA	Tetraethylammoniumacetat
TEANO <sub>3</sub>	Tetraethylammoniumnitrat
TEAOH	Tetraethylammoniumhydroxid
UV	Ultraviolett

### 7.2 Verzeichnis der Hersteller

Bela Mühle, Josef Bergmann	Vechta (Langförden), Deutschland
Bruker	Reinstetten, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Chrompack	Frankfurt am Main, Deutschland
Finnigan MAT	Bremen, Deutschland
Fluka	Deisenhofen, Deutschland
Henry Lamotte GmbH	Bremen, Deutschland
ICT	Bad Homburg, Deutschland
Knauer	Berlin, Deutschland
LAT	Garbsen-Berenbostel, Deutschland
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Malinckrodt Baker	Griesheim, Deutschland
Matreya, Inc.	Pleasant Gap, PA 16823 USA
Merck	Darmstadt, Deutschland
Merck-Schuchardt	Hohenbrunn, Deutschland
MW Fettraffinerie	Brake (Unterweser), Deutschland
Perkin Elmer	Überlingen, Deutschland
Shimadzu	Duisburg, Deutschland
Siemens	Ditzingen, Deutschland
Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Spark	Emmen, Holland
Unicam Chromatography	Kassel, Deutschland
Varian	Darmstadt, Deutschland

## 7.3

## 7.4 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1	Strukturformel von 2R,4'R,8'R (RRR)-Tocopherol bzw. Tocol	2
Abbildung 1-2	Strukturformel von 2R,3'trans,7'trans (R,trans-trans)-Tocotrienol	3
Abbildung 1-3	Dreidimensionale Darstellung von R,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol mit weitgehend gestreckter Seitenkette.	5
Abbildung 1-4	Dreidimensionale Darstellung von R,cis-cis- $\alpha$ -Tocotrienol; die cis-Konfiguration der Seitenkette bewirkt eine geknickte räumliche Struktur des Moleküls.	5
Abbildung 1-5	Prozeßführung zur Extraktion von Vitamin E aus dem Dämpfungsdestillat der Palmölraffination nach [sun 92].	8
Abbildung 1-6	Struktur von $\beta$ -Cyclodextrin	16
Abbildung 1-7	Schematische Darstellung des von permethyliertem $\beta$ -Cyclodextrin gebildeten Hohlkegelstumpfes; R = $-\text{OCH}_3$	16
Abbildung 1-8	Struktur eines Cellulose-3,5-Dimethylphenylcarbamats als stationäre Phase	17
Abbildung 1-9	Vitamin-E-Transport-Mechanismus; Transport der Tocopherole vom Dünndarm zu anderen Geweben.	23
Abbildung 2-1	Trennungsgang der RS,cis/trans-Tocotrienole	28
Abbildung 3-1	Chromatogramm eines Referenzgemisches aller acht Tocopherole und Tocotrienole mit Tocol als internem Standard; HPLC-Trennung mit analytischer Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion.	30
Abbildung 3-2	Chromatogramm eines Referenzgemisches aller acht Tocopherole und Tocotrienole, sowie Tocol; HPLC-Trennung auf der semipräparativen Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	30
Abbildung 3-3	HPLC-Trennung von $\alpha$ -, $\beta$ - und $\delta$ -Tocotrienol neben weiteren Antioxidantien auf der RP18-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,800 V vs. Ag/AgCl) (Multimethode).	33
Abbildung 3-4	HPLC-Trennung von $\gamma$ -Tocotrienol neben weiteren Antioxidantien auf der RP18-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,800 V vs. Ag/AgCl) (Multimethode).	33
Abbildung 3-5	HPLC-Trennung von Thymol und BHT auf der RP18-Phase mit UV-Detektion (Multimethode).	34
Abbildung 3-6	HPLC-Trennung von $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - und $\delta$ -Tocotrienol auf der RP18-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	35
Abbildung 3-7	HPLC-Trennung von $\alpha$ -Tocotrienol auf der präparativen RP18-Phase mit UV-Detektion ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).	35
Abbildung 3-8	Trennung der Seitenkettenisomere von $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - und $\delta$ -Tocotrienol auf der Silberionen-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	36
Abbildung 3-9	$\alpha$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der cis/trans-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	40
Abbildung 3-10	$\beta$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der cis/trans-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	40
Abbildung 3-11	$\gamma$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der cis/trans-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	41
Abbildung 3-12	$\delta$ -Tocotrienol, analytische HPLC-Trennung der cis/trans-Seitenkettenisomere auf einer permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	41
Abbildung 3-13	Präparative Trennung von $\alpha$ -Tocotrienol auf der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit UV-Detektion.	43
Abbildung 3-14	Massenspektrum der $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion 1, die durch präparative HPLC auf der RP18-Phase isoliert wurde; Molekülionpeak $M^+$ bei $m/z$ 424,2 und den Hauptfragmenten bei $m/z$ 205,1 ( $M^+ - 219$ ) und bei $m/z$ 165,1 ( $M^+ - 219 - 40$ ).	45

Abbildung 3-15	Massenspektrum der $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion 2, die durch präparative HPLC auf der RP18-Phase isoliert wurde; Molekülionpeak $M^+$ bei $m/z$ 424,2 und den Hauptfragmenten bei $m/z$ 205,1 ( $M^+ - 219$ ) und bei $m/z$ 165,1 ( $M^+ - 219 - 40$ )	45
Abbildung 3-16 A-C	Ausschnitte aus $^1H$ -NMR-Spektren von $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomeren, isoliert durch präparative HPLC auf der $\beta$ -PM-Phase.	46
Abbildung 3-17 A-C	Ausschnitte aus FTIR-Spektren von $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomeren, isoliert durch präparative HPLC.	47
Abbildung 3-18	Relative Zunahme [ $\alpha$ -T <sub>3</sub> / $\beta$ -T <sub>3</sub> ] des $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalts im Eigelb in Abhängigkeit der Fütterungstage mit supplementiertem Futter.	49
Abbildung 3-19	Die vier Seitenkettenisomere von synthetischem $\alpha$ -Tocotrienol (20 mg/L) mit trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol als zuletzt eluierendem Isomer; HPLC-Trennung auf der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	50
Abbildung 3-20	Die vier Seitenkettenisomere von $\alpha$ -Tocotrienol aus Eigelb nach Fütterung des Huhns mit synthetischem $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase nach Isolierung der $\alpha$ -Tocotrienol-Fraktion durch semipräparative HPLC (Diol-Phase).	50
Abbildung 3-21	$\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Magenzellen HMO2; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,700 V vs. Ag/AgCl).	53
Abbildung 3-22	$\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Leberzellen HepG2; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,700 V vs. Ag/AgCl).	53
Abbildung 3-23	Beispiel für einen Extrakt aus Zellwänden, die nicht mit $\gamma$ -Tocotrienol behandelt wurden; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Phase mit amperometrischer Detektion (+0,700 V vs. Ag/AgCl).	53
Abbildung 3-24	cis-cis- $\gamma$ -Tocotrienol und cis/trans- (2. Peak)- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Magenzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.	55
Abbildung 3-25	cis-cis- $\gamma$ -Tocotrienol und cis/trans- (2. Peak)- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Leberzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.	55
Abbildung 3-26	cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol (3. Peak) und trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Magenzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.	55
Abbildung 3-27	cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol (3. Peak) und trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol aus humanen Leberzellwänden; Prozentanteil der Peakhöhen.	55
Abbildung 3-28	$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Medium für humane Magenzellen HMO2; Prozentanteil der Peakhöhen.	56
Abbildung 3-29	$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Medium für humane Leberzellen HepG2; Prozentanteil der Peakhöhen.	56
Abbildung 3-30	$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Cytosol von humanen Magenzellen HMO2; Prozentanteil der Peakhöhen.	56
Abbildung 3-31	$\gamma$ -Tocotrienol-Isomere aus dem Cytosol von humanen Leberzellen HepG2; Prozentanteil der Peakhöhen.	56
Abbildung 3-32	HPLC-Trennung einer $\gamma$ -Tocotrienol-Referenzsubstanz auf der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	59
Abbildung 3-33	$\gamma$ -Tocotrienol aus gehärtetem Palmöl auf der permethylierten $\beta$ -Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	59
Abbildung 3-34	$\alpha$ -Tocotrienol-Gehalt von Schafsmilch während und nach einer achttägigen Fütterungsperiode mit Palmöl.	61
Abbildung 3-35	$\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	62
Abbildung 3-36	Koinjektion von synthetischem $\alpha$ -Tocotrienol und $\alpha$ -Tocotrienol aus Schafsmilchfett; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	62

Abbildung 3-37	Das RS-Enantiomerenpaar von cis-cis- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	65
Abbildung 3-38	Das RS-Enantiomerenpaar von cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (erhalten aus 2. Peak bei $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase) <sup>5</sup> ; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	65
Abbildung 3-39	Das RS-Enantiomerenpaar von cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether (entspr. 3. Peak bei $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase) <sup>5</sup> ; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	66
Abbildung 3-40	Das RS-Enantiomerenpaar von trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether <sup>5</sup> ; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	66
Abbildung 3-41	Die vorangegangenen vier Chromatogramme in übereinandergelegter Darstellung.	66
Abbildung 3-42	Methyletherderivat von kommerziell erhältlichem synthetischem $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	67
Abbildung 3-43	RS,cis/trans- $\beta$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	68
Abbildung 3-44	RS,cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	68
Abbildung 3-45	RS,cis/trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	69
Abbildung 3-46	all-rac- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	69
Abbildung 3-47	$\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	70
Abbildung 3-48	Koinjektion von $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl und RS,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	70
Abbildung 3-49	$\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Schafsmilchfett; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	71
Abbildung 3-50	Koinjektion von $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether aus Schafsmilchfett und RS,trans-trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	71
Abbildung 3-51	Chromatogramm von R,trans-trans- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	72
Abbildung 3-52	Koinjektion von $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl und RS,cis/trans- $\gamma$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	72
Abbildung 3-53	R,trans-trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	73
Abbildung 3-54	Koinjektion von $\delta$ -Tocotrienol-Methylether aus Palmöl und RS,cis/trans- $\delta$ -Tocotrienol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	73
Abbildung 3-55	Koinjektion von RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether aus Palmöl und all-rac- $\alpha$ -Tocopherol-Methylether; HPLC-Trennung auf Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	74
Abbildung 3-56	Die RS,cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether-Isomere bei Elution mit 100 % Isohexan ohne Zusatz von 2-Propanol; HPLC-Trennung auf der Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	75
Abbildung 3-57	Erheblich verkürzte Retentionszeit der acht RS,cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether-Isomere bei einem Anteil von 0,1 % 2-Propanol in Isohexan als Eluent; HPLC-Trennung auf der Cellulosecarbamat-Phase mit Fluoreszenz-Detektion.	76
Abbildung 3-58	Kalibriergerade und Abschätzung der Nachweisgrenze für RS,cis/trans- $\alpha$ -Tocotrienol-Methylether.	77

Abbildung 4-1 Graphische Darstellung der Kalibriergeraden der Tocopherole; analytische HPLC-Trennung auf der Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion. _____	80
Abbildung 4-2 Graphische Darstellung der Kalibriergeraden der Tocotrienole; analytische HPLC-Trennung auf der Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion. _____	81
Abbildung 4-3 Abhängigkeit des Detektor-Responses vom angelegten Potential für die vier Seitenkettenisomere von $\alpha$ -Tocotrienol (2,1 mg/L) _____	88
Abbildung 4-4 Kalibriergeraden für $\alpha$ -Tocotrienol-Seitenkettenisomere bei amperometrischer Detektion bei + 0,700 V (vs. Ag/AgCl). _____	88
Abbildung 4-5 Ausschnitt aus Abbildung 4-4 _____	88
Abbildung 4-6 Tocopherole und Tocotrienole aus dem Unverseifbaren des Eigelbs; HPLC-Trennung mit der semipräparativen Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion. _____	94
Abbildung 4-7 Mikroskopische Aufnahme der Flasche M2. _____	97
Abbildung 4-8 Mikroskopische Aufnahme der Flasche L1. _____	97
Abbildung 4-9 Mikroskopische Aufnahme der Flasche M11. _____	97
Abbildung 4-10 Mikroskopische Aufnahme der Flasche L11. _____	97
Abbildung 4-11 Tocopherole und Tocotrienole aus dem Unverseifbaren von gehärtetem Palmöl; HPLC-Trennung mit semipräparativer Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion. _____	102
Abbildung 4-12 Tocopherole und Tocotrienole aus dem Unverseifbaren von Schafsmilchfett; HPLC-Trennung mit semipräparativer Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion. _____	104
Abbildung 4-13 Chromatogramm von Palmöl; HPLC-Trennung auf der semipräparativen Diol-Phase mit Fluoreszenz-Detektion. _____	105
Abbildung 4-14 Kontrolle der Veretherung von $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase mit amperometrischer Detektion. _____	107
Abbildung 4-15 Kontrolle der Veretherung von $\alpha$ -Tocotrienol; HPLC-Trennung auf der $\beta$ -PM-Cyclodextrin-Phase mit Fluoreszenz-Detektion. _____	107

## 7.5 Verzeichnis der Tabellen

<i>Tabelle 1-1 Struktur und chemische Bezeichnung der Tocopherole</i>	2
<i>Tabelle 1-2 Struktur und chemische Bezeichnung der Tocotrienole</i>	3
<i>Tabelle 1-3 Physikalische Eigenschaften der Tocopherole und Tocotrienole</i>	6
<i>Tabelle 1-4 Fluoreszenz-Maxima der Tocopherole und Tocotrienole<sup>a</sup></i>	6
<i>Tabelle 1-5 Tocopherole (T) und Tocotrienole (T<sub>3</sub>) in Pflanzenölen [mg/kg]</i>	7
<i>Tabelle 1-6 Eigenschaften der Cyclodextrine<sup>a</sup></i>	15
<i>Tabelle 1-7 Vitamin-E-Aktivitäten von Tocopherolen und Tocotrienolen als Tocopheroläquivalente (TÄ)</i>	18
<i>Tabelle 4-1 Formeln der Kalibriergeraden der Tocopherole und Tocotrienole; HPLC-Trennung mit der analytischen Diol-Phase und Fluoreszenz-Detektion</i>	81
<i>Tabelle 4-2 Formeln der Kalibriergeraden für Tocopherole und Tocotrienole zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des internen Standards; HPLC-Trennung mit der analytischen Diol-Phase</i>	82
<i>Tabelle 4-3 Zusammensetzung des Zellkulturmediums MEM und von PBS</i>	92
<i>Tabelle 4-4 Übersicht zur Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an <math>\gamma</math>-Tocotrienol-haltigem Medium</i>	95
<i>Tabelle 4-5 Übersicht zur Beurteilung der Konfluenz nach 24stündiger Behandlung der Zellen mit <math>\gamma</math>-Tocotrienol-haltigem Medium.</i>	96
<i>Tabelle 4-6 Übersicht zur Extraktion von <math>\gamma</math>-Tocotrienol aus den Mediumüberständen der Zellkulturen</i>	99
<i>Tabelle 4-7 Endvolumina der Probelösungen 'Zellwand' und 'Cytosol'</i>	99

Die vorliegende Arbeit wurde an der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. W. Ternes durchgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle besonders

Herrn Prof. Dr. W. Ternes für die aktuelle und interessante Themenstellung, für wertvolle wissenschaftliche Anregungen und für seine stetige Diskussionsbereitschaft,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für das angenehme Arbeitsklima im Laboralltag,

Frau E. Krause und Herrn G. Jungbluth für ihre Freundschaft und daß sie rund um die Uhr sowohl zum fachlichen Austausch wie auch zur Zerstreuung bereit waren,

meinen Eltern, daß sie mir durch ihre nie zweifelnde – nicht zuletzt finanzielle – Unterstützung das Studium ermöglichten

und meinem Mann für eine Atmosphäre, in der die Arbeit gelingen konnte.



## Lebenslauf

1975 - 1979

1979 - 1988

WS 1988/89 - SS 1991

WS 1991/92 - WS 1994/95

20.12.1994

01.08.96 - 31.03.97

29.05.1997

seit WS 1997/98

15.02.95 - 31.07.96

15.05.97 - 31.07.98

## Astrid M. Drotleff

Otto-Brenner-Str. 14  
30159 Hannover

## Persönliche Angaben

Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsort: Karlstadt am Main  
Eltern: Wolfgang und Inge Gehrsitz, geb. Hemmelmann

## Ausbildung

### Grundschule Zellingen

### Johann-Schöner-Gymnasium Karlstadt

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fachrichtung Chemie (Diplom) bzw. Geographie (Diplom)

### Universität Stuttgart

Fachrichtung Lebensmittelchemie (Staatsexamen) Abschluß:  
Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker (Hauptprüfung Teil A)

### Staatliches Lebensmittel-Untersuchungsamt Braunschweig und Bedarfsgegenstände-Untersuchungsamt Lüneburg

Praktikum für Lebensmittelchemiker

Abschluß: Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

### Universität Hannover

Fachrichtung Chemie (Promotion)

## Tätigkeiten

### Tierärztliche Hochschule Hannover

Wissenschaftliche Hilfskraft

in der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie

## Veröffentlichung

Drotleff A.M., Ternes W. (1998) Separation and characterization of *cis-trans* isomers of  $\alpha$ -tocotrienol by HPLC using a permethylated  $\beta$ -cyclodextrin phase. *Z Lebensm. Unters. Forsch. A* 206: 9-13