

79. Chromatographische Trennung und quantitative Bestimmung aller acht Stereoisomeren von α -Tocopherol

von Max Vecchi^{†1)}, Willy Walther^{a)}*, Ernst Glinz^{a)}, Thomas Netscher^{b)},
Rudolf Schmid^{a)}, Michel Lalonde^{a)} und Walter Vetter^{a)}

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

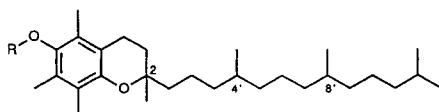
Herrn Dr. Otto Isler zum 80. Geburtstag gewidmet

(6.IV.90)

Separation and Quantitation of All Eight Stereoisomers of α -Tocopherol by Chromatography

The results of the analysis of several derivatives of (all-*rac*)- α -tocopherol by HPLC on a chiral stationary phase and by capillary GC on a achiral stationary phase are reported. Consecutive application of both methods to the ethyl-ether derivative allows the separation and quantification of all eight possible stereoisomers of (all-*rac*)- α -tocopherol.

Einleitung. – Der Begriff Vitamin E umfasst 8 nahe verwandte 6-Chromanole mit isoprenoider Seitenkette [1]. Wichtigster Vertreter ist α -Tocopherol (**1a**), das, soweit bekannt [2–5], in der Natur ausschliesslich (*R,R,R*)-konfiguriert vorkommt.



- | | |
|--|--|
| 1a R = H | 1f R = CF ₃ CH ₂ |
| b R = Me | g R = MeOCH ₂ |
| c R = Et | h R = MeOCH ₂ CH ₂ OCH ₃ |
| d R = <i>i</i> -Pr | i R = CH ₃ CO |
| e R = (<i>t</i> -Bu)Me ₂ Si | j R = CF ₃ CO |

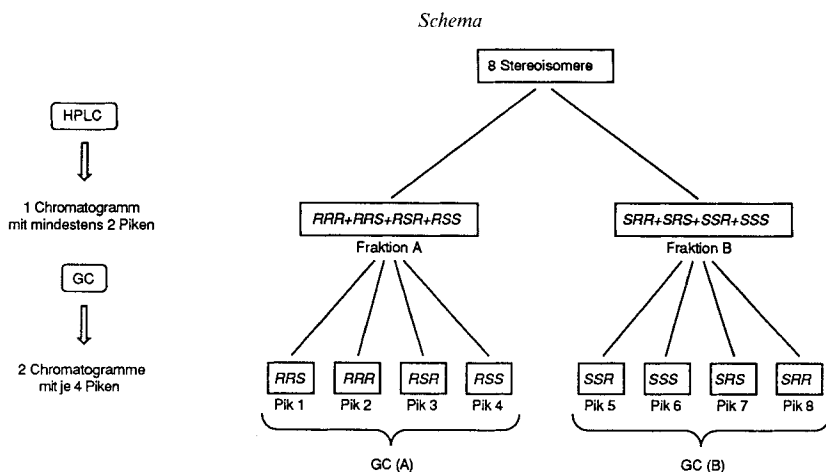
Heutige technische Totalsynthesen von α -Tocopherol basieren auf der säure-katalysierten Kondensation von 2,3,6-Trimethylhydrochinon mit (all-*rac*)-Isophytol (= 3,7,11,15-Tetramethylhexadec-1-en-3-ol) [6]. Das dabei erhaltene (all-*rac*)- α -Tocopherol ist ein äquimolares Gemisch der 8 möglichen Stereoisomeren. Zur Klärung der Frage, wie sich diese Stereoisomeren des (all-*rac*)- α -Tocopherols im Organismus von Mensch und Tier bei Aufnahme, Verteilung, Abbau und Ausscheidung verhalten, ist es erforderlich, nach Applikation von (all-*rac*)- α -Tocopherol, also der 8 Stereoisomeren in gleicher Menge, den Pegel der einzelnen Isomeren quantitativ zu verfolgen. Zu diesem Zweck kann nur eine chromatographische Methode eingesetzt werden, da die mittels NMR erzielbare Unterscheidung nicht ausreichend ist [7].

Die Trennung von 8 Stereoisomeren, die sich nur in der Konfiguration der 3 chiralen Me-substituierten C-Atome unterscheiden, war auf den ersten Blick ein hochgestecktes Ziel. Durch Kombination von HPLC und Kapillar-GC schien es jedoch erreichbar. 1980

¹⁾ Verstorben am 4. November 1989.

wurde von *Slover* und *Thompson* gezeigt, dass (all-*rac*)- α -Tocopheryl-(trimethylsilyl)-ether mittels Kapillar-GC auf achiraler Phase in seine 4 Racemate getrennt werden kann [5]. *Cohen et al.* [4] verbesserten die Methode, indem sie den Trimethylsilyl-ether durch den stabileren Methyl-ether ersetzten, der auch im niedrigen Nanogramm-Bereich die vollständige Trennung der 4 Racemate erlaubt. Durch Co-injektion der authentischen Isomeren wurden in dieser Arbeit überdies alle Pike identifiziert (vgl. *Fig.*).

Im Jahre 1984 demonstrierten *Yamaguchi et al.* [8], dass es möglich ist, sogenanntes (2-*ambo*)- α -Tocopheryl-acetat ((2*RS*,4'*R*,8'*R*)- α -Tocopheryl-acetat) auf der im Handel erhältlichen chiralen stationären Phase *Chiralpak OT (+)*²⁾ in die beiden Epimeren aufzuspalten. Mit (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetat wurden ebenfalls 2 Pike erhalten, allerdings im überraschenden Intensitätsverhältnis von 3:1, wobei im grösseren der beiden eine Aufspaltung in 2 Komponenten angedeutet ist [8]. Damit liess sich also die natürliche Form von α -Tocopherol von der (2-*ambo*)- und der (all-*rac*)-Form unterscheiden. Aufgrund dieser Befunde war zu erwarten, dass die Methode soweit verbessert werden könnte, dass auch (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetat in 2 Fraktionen zu trennen wäre, die aus je 4 Stereoisomeren mit gleicher Konfiguration an C(2) des Chroman-Ringes bestehen, oder mit anderen Worten, dass sich (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetat in 2 Fraktionen trennen liesse, welche die je 4 Stereoisomeren von (2*R*,4'-*ambo*,8'-*ambo*)- bzw. (2*S*,4'-*ambo*,8'-*ambo*)- α -Tocopheryl-acetat enthalten würden.



Im *Schema* ist die Kombination der HPLC- und der GC-Trennung dargestellt. Durch Auffangen der HPLC-Fraktionen *A* und *B*, die aus den je 4 (2*R*)- bzw. (2*S*)-Epimeren bestehen, und anschliessende Analyse der getrennten Fraktionen mittels GC ergäbe sich grundsätzlich die gewünschte Trennung aller 8 Stereoisomeren des (all-*rac*)- α -Tocopherols. Wir möchten nun eine Methode vorstellen, mit der es in der Tat möglich ist, alle 8 Stereoisomeren in einzelne Pike aufzutrennen und zu quantifizieren.

Resultate. – Die erforderliche Trennung der beiden Gruppen von C(2)-Epimeren des (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetates gelang nach der Methode von *Yamaguchi et al.* [8] unter

²⁾ Daicel Chem. Ind., Ltd., Japan; Vertrieb durch J. T. Baker.

Anwendung von hausgemachter stationärer Phase besser als erwartet. Wie in der *Figur (p)* gezeigt, konnten 5 Pike erhalten werden, deren Identität durch Co-injektion der authentischen Stereoisomeren festgestellt wurde. Auf diese Weise konnte nicht nur die erhoffte Trennung der beiden Gruppen von C(2)-Epimeren erzielt werden, sondern sogar die Trennung aller 4 Stereoisomeren, die sich in den Konfigurationen an C(2) und C(4') unterscheiden, oder anders ausgedrückt, die Trennung aller möglichen Stereoisomeren, die C(8')-Paare ausgenommen. Die HPLC leistet also weit mehr als nach *Schema* für unsere kombinierte Methode erforderlich, aber nicht genug, um auf die GC verzichten zu können.

Wie schon erwähnt, erzielten *Cohen et al.* ihre GC-Trennung mit dem Methyl-ether, während *Yamaguchi et al.* in der HPLC mit dem Acetat arbeiteten. Die Kombination der unveränderten HPLC- und GC-Methoden erfordert demzufolge eine chemische Umwandlung der HPLC-Fraktionen von den Acetaten in die Methyl-ether. Zur Vermeidung dieses umständlichen Schrittes erschien es uns angebracht, ein Derivat zu suchen, mit dem beide benötigten Trennungen durchführbar sind.

Nach einigen Versuchen brachte der Ethyl-ether den gewünschten Erfolg. *Figur (c)* zeigt die Trennung der 4 Racemate in der GC. Die Pikfolge ist die gleiche wie im Falle des Methyl-ethers³⁾. Die Auflösung in der HPLC (*Fig. (d)*) geht weit über das geforderte Minimum von 2 Piken, die der (2*R*)- und (2*S*)-Stereoisomeren, hinaus, da zusätzlich auch noch die (2*S*,4'*R*)- und die (2*S*,4'*S*)-Stereoisomeren getrennt erscheinen. Für die nachfolgende GC-Analyse werden diese beiden Pike gemäss *Schema* vereinigt.

Die relativen Intensitäten der 4 Pike der beiden Gaschromatogramme, multipliziert mit den relativen Intensitäten der entsprechenden HPLC-Pike, ergeben direkt die Anteile der einzelnen Isomeren an der Gesamtmenge. Zur Berechnung des relativen Anteils, beispielsweise des (S,S,S)-Stereoisomeren, lautet demnach die Formel (vgl. *Schema*):

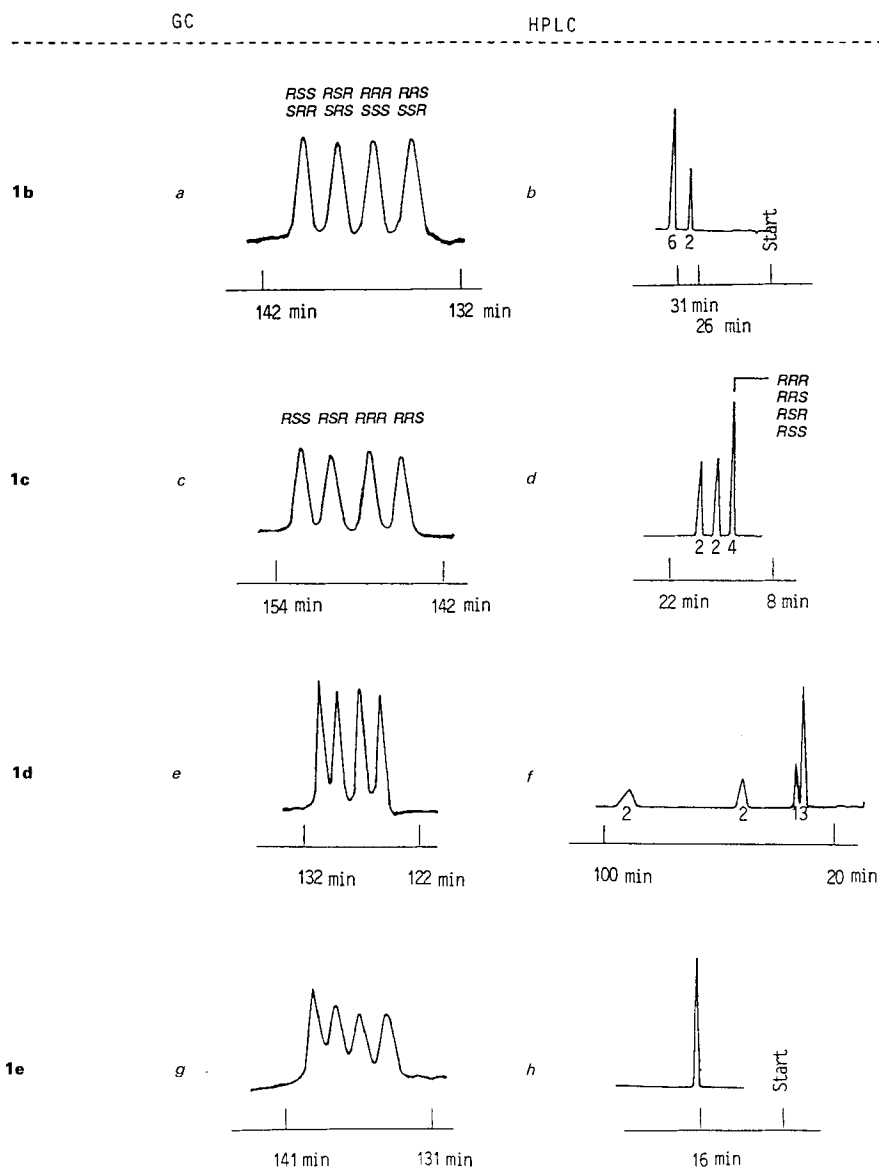
$$\frac{F_{GC(B6)}}{F_{GC(B5+6+7+8)}} \times \frac{F_{LC(B)}}{F_{LC(A+B)}} \times 100 = \%(S,S,S)$$

<i>F</i>	Fläche des Piks
GC (B6)	Pik 6 des GC (B), das dem (S,S,S)-Isomeren entspricht
LC (B)	Pike B des HPLC
LC (A + B)	Summe aller Pike im HPLC
GC (B5 + 6 + 7 + 8)	Summe aller Pike im GC (B)

Im Zuge der Suche nach einem brauchbaren Derivat wurden verschiedene andere *O*-substituierte α -Tocopherole analysiert, die jedoch entweder in der GC oder in der HPLC nicht die erforderliche minimale Trennung ergaben. Da uns die relative Veränderung der Retentionszeiten verschiedener Derivate auf der *Chiralpak OT (+)*-Säule teilweise bizarr erscheint, zeigen wir alle Resultate zusammengefasst in der *Figur*.

Während in der GC die 4 Komponenten jeweils als *Dublett* von 2 *Dubletten* mehr oder weniger getrennt sichtbar sind, ergeben sich in der HPLC erstaunliche Bilder: Von einem homogen erscheinenden Pik im Falle des (*t*-Bu)Me₂Si-Derivates (*Fig. (h)*) bis zu 7 der 8 möglichen Pike, ganz oder teilweise getrennt, für das Methoxymethyl-Derivat (*Fig. (l)*) ist ein ganzes Kaleidoskop von chromatographischen Bildern zu sehen. Soweit durch

³⁾ Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich mit einer synthetischen Probe, die definierte Mengen von Stereoisomeren enthielt.

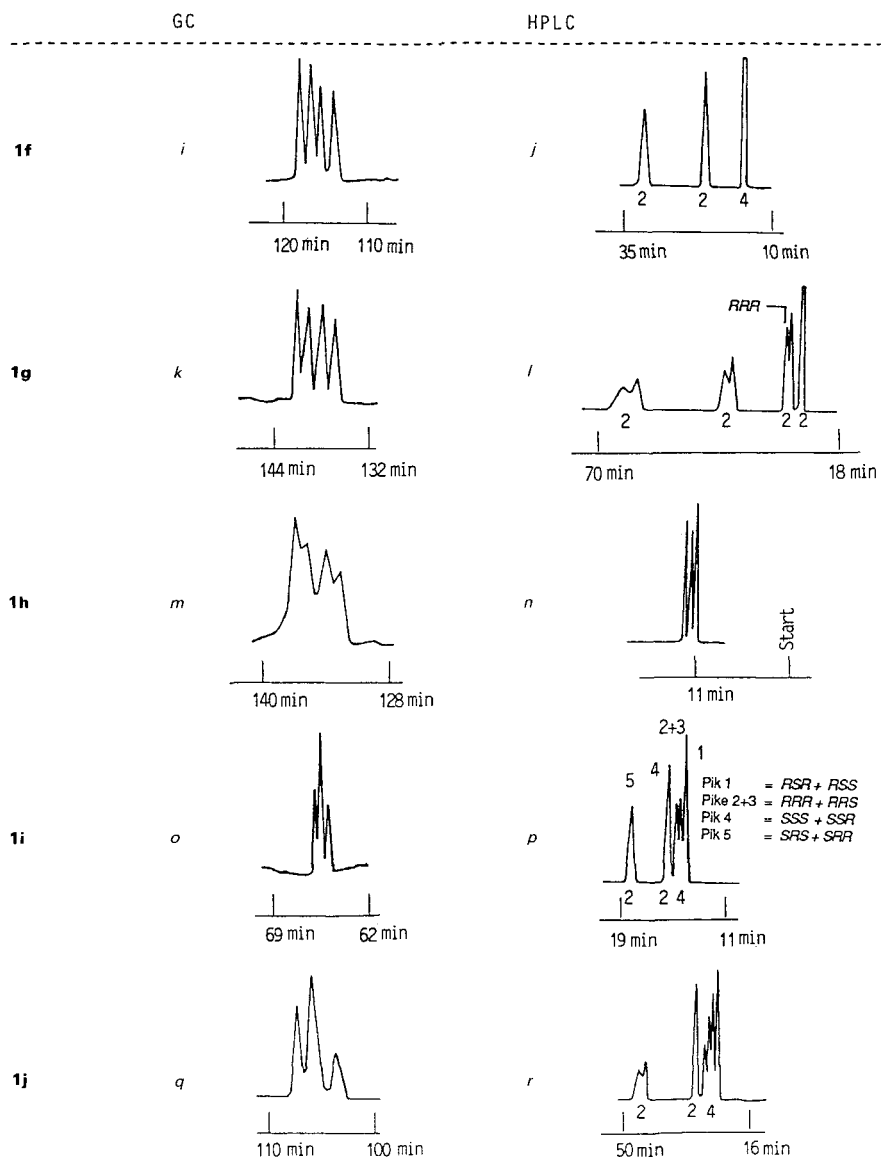


Figur. GC bzw. HPLC verschiedener Derivate von (*all-rac*)- α -Tocopherol.

Die durch Co-injektion identifizierten Pike sind mit *RRR* usw. bezeichnet. Die Zahl unter den Piken bedeutet die Zahl der Stereoisomeren im jeweiligen Pik.

gezielte Experimente gesichert, ist die Zuordnung einzelner Isomeren in den Bildern angegeben.

Auf eine spekulative Interpretation der einzelnen Verschiebungen möchten wir verzichten, aber auf zwei besondere Punkte soll doch hingewiesen werden. 1) Beim Methyl-



Figur (Forts.)

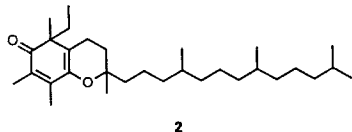
ether (Fig. (b)) kommt es zu einer Trennung in 2 Pike, aber das Intensitätsverhältnis von 6:2 zeigt, dass nicht die beiden Gruppen von C(2)-Epimeren, sondern ein (C(2)–C(4'))-Isomeres von den anderen 3 (C(2)–C(4'))-Isomeren getrennt wurde! 2) Im Falle des schon erwähnten Methoxymethyl-Derivates (Fig. (l)) ist sogar eine teilweise Trennung von 3 der 4 C(8')-Paare zu beobachten. Daraus ergibt sich die Hoffnung, schliesslich eine HPLC-Methode entwickeln zu können, mit der alle 8 Stereoisomeren trennbar sind, womit auf die Kombination mit der GC verzichtet werden könnte.

Wir danken Herrn Dr. R. K. Müller für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn I. Gautschi für experimentelle Mitarbeit, Frau E. Kirscher für die Aufnahme der Gaschromatogramme, Herrn Dr. R. Lorenz für die GPC-Analysen und den Kollegen der Labors für NMR, MS, IR, Drehwertbestimmung und Mikroanalyse für ihre analytischen Untersuchungen.

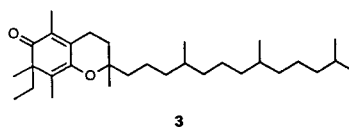
Experimenteller Teil

Allgemeines. (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetat ('*d,l*- α -Tocopheryl-acetat' = (all-*rac*)-3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl-acetat) ist ein Handelsprodukt von Roche. Das natürliche Stereoisomere ist im Handel erhältlich, alle anderen 7 Stereoisomeren waren aus den Synthesen von Cohen *et al.* [4] verfügbar. Anal. DC: Dünnschichtplatten Kieselgel 60 F_{254} , Schichtdicke 0,25 mm (Merck). Säulenchromatographie: Kieselgel 60, 0,040–0,063 mm (Merck). Optische Rotation: Perkin Elmer 241 Polarisimeter. IR: Nicolet 170-SX FT-IR; Angaben in cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$: 250,1 MHz (Bruker AC-250); gemessen in CDCl_3 -Lsg., TMS als interner Standard; chemische Verschiebung in ppm (δ), *mc* = zentriertes Multiplett; Kopplungskonstanten *J* in Hz. MS: MS9 (AEI, Manchester, GB); EI-MS, Ionisationsenergie 70 eV, Temp. der Ionenquelle 250°C; *m/z* in Prozent relativ zum Basis-Pik (= 100%). Mikroanalysen: Angaben in Prozent.

Ethyl-(α -tocopheryl)-ether (= 6-Ethoxy-3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran; **1c**). Zu einer gerührten Suspension von 8,0 mmol NaH (durch Waschen von 240 mg 80% NaH mit Hexan) in 4 ml THF (über Na/Benzophenon, Ar, destilliert) gibt man unter Ar die Lsg. von 862 mg (2,0 mmol) α -Tocopherol (= 3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; **1a**) in 4 ml THF. Nach 30 min Rühren bei RT. tropft man 624 mg (0,32 ml, 4,0 mmol) EtI zu und rührt weitere 3 h bei RT. (DC-Kontrolle, Hexan/AcOEt 9:1, R_f (**1a**) 0,23, R_f (**1c**) 0,60). Man engt i. V. ein, filtriert mit Et_2O über Decalit, engt erneut ein und trocknet i. HV.: 950 mg bräunliches Rohprodukt (Gehalt lt. GC 96,5%), nach chromatographischer Reinigung (60 g Kieselgel, Hexan/AcOEt 99:1) 822 mg (90%) farbloses Öl. Bei Alkylierung mit 2,0 equiv. $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Et}$ in Et_2O wurden neben 59% **1c** 22% 5-Ethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-on (**2**; R_f 0,43) und 11% 7-Ethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-on (**3**; R_f 0,33) gefunden (vgl. [9]).



2



3

(all-*rac*)-**1c**: IR (Film): 2927s, 1460m, 1381m, 1256m (Aryl-ether), 1089m. $^1\text{H-NMR}$: 0,84, 0,85, 0,86 (3 d, $J = 6$, $\text{CH}_3\text{-C}(5)$, $\text{CH}_3\text{-C}(7)$, $\text{CH}_3\text{-C}(8)$); 0,94–1,61 (*m*, 21 aliph. H); 1,23 (*s*, $\text{CH}_3\text{-C}(2)$); 1,39 (*t*, $J = 7$, CH_3CH_2); 1,78 (*mc*, $J = 7$, 2 H-C(3)); 2,08, 2,12, 2,17 (3 *s*, $\text{CH}_3\text{-C}(4')$, $\text{CH}_3\text{-C}(8')$, $\text{CH}_3\text{-C}(12')$); 2,57 (*t*, $J = 7$, 2 H-C(4)); 3,71 (*q*, $J = 7$, CH_3CH_2). MS: 458 (83, M^+), 429 (10), 402 (19), 233 (11), 193 (100), 165 (47). Anal. ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_2$ (458,77): C 81,16, H 11,86; gef.: C 81,20, H 11,96.

(2*R*,4'*R*,8'*R*)-**1c**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0,56$ ($c = 0,9$, CH_2Cl_2). IR, $^1\text{H-NMR}$, MS: identisch mit den Spektren von (all-*rac*)-**1c**. Anal. gef.: C 81,08, H 11,71.

Daten von (2*RS*,5*RS*,4'*RS*,8'*RS*)-2: Schwach gelbes Öl. IR (Film): 2927s, 1640m (C=O), 1591m (C=C), 1458m, 1378m, 1096m. $^1\text{H-NMR}$: 0,53, 0,54 (2 *t* von Diastereoisomeren, Diastereoisomerenverhältnis ca. 1:1, $J = 7$, CH_3CH_2); 0,82–0,90 (*m*, 4 CH_3); 0,98–2,18 (*m*, 33 aliph. H); 1,86, 2,02 (2 *s*, $\text{CH}_3\text{-C}(7)$, $\text{CH}_3\text{-C}(8)$). MS: 458 (8, M^+), 429 (100), 165 (54). Anal. ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_2$ (458,77): C 81,16, H 11,86; gef.: C 81,02, H 12,11.

Daten von (2*RS*,7*RS*,4'*RS*,8'*RS*)-3: Schwach gelbes Öl. IR (Film): 2928s, 1633m (C=O), 1459m (C=C), 1379m, 1120m. $^1\text{H-NMR}$: 0,50, 0,51 (2 *t* von Diastereoisomeren, Diastereoisomerenverhältnis ca. 1:1, $J = 7$, CH_3CH_2); 0,79–0,91 (*m*, 4 CH_3); 0,98–2,03 (*m*, 31 aliph. H); 1,78, 1,82 (2 *s*, $\text{CH}_3\text{-C}(5)$, $\text{CH}_3\text{-C}(8)$); 2,57 (*t*, $J = 7$, 2 H-C(4)). MS: 458 (20, M^+), 429 (100, $[M - \text{C}_2\text{H}_5]^+$), 165 (69).

Herstellung der anderen α -Tocopherol-Derivate.

3,4-Dihydro-6-methoxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran (**1b**): [4].

3,4-Dihydro-6-isopropoxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran (**1d**): mit 2-Bromopropan und K_2CO_3 in DMF [10] bei 110°C.

6- $\{[(\text{tert-Butyl})\text{dimethylsilyl}]\text{oxy}\}$ -3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran (**1e**): a) NaH in THF, b) Silyltrifluormethansulfonat bei $-78^\circ \rightarrow \text{RT}$.

3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-6-(2,2,2-trifluoroethoxy)-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran (**1f**): a) NaH in THF, b) $\text{Cl}_3\text{CSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ (Heraeus) [11] bei $0 \rightarrow 20^\circ$.

3,4-Dihydro-6-(methoxymethoxy)-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran (**1g**): mit *in-situ*-hergestelltem MOM-Cl [12] und (i-Pr)₃NH [13] in CH_2Cl_2 bei RT.

3,4-Dihydro-6-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran (**1h**): wie vorstehend, mit MEM-Cl (Fluka).

3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl-trifluoroacetat (**1j**): mit $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ und Et_3N in CH_2Cl_2 bei RT.

GC. Gaschromatograph: Modell 5890 (Hewlett-Packard) mit Flammenionisationsdetektor und einem 'Split'/'Splitless'-Injektor ausgerüstet. Es wurde eine Glaskapillare (100 m $\times$ 0,30 mm) mit Silar 10C (Socolabo/Alltech) als stationärer Phase, nach der dynamischen Methode hergestellt [14], verwendet. Die dosierte Probenmenge war etwa 1 μg , gelöst in 50 μl CH_2Cl_2 ; davon wurde 1 μl splitlos eingespritzt. Die Temp. waren 260° am Injektor, und isotherm 165° im Säulenofen. Für die Pik-Integration wurde ein GC-Datensystem, Modell DS 654 (Varian), benutzt.

HPLC. Herstellung der chiralen Phase. (+)-Poly(triphenylmethylmethacrylat)((+)-PTMA) in seiner THF-löslichen Form wurde nach der Methode von Okamoto *et al.* [15] [16] unter Verwendung von (+)-6-Benzylspartein und BuLi als chiraalem Polymerisations-Initiator synthetisiert. Es wurden Chargen von 10–50 g hergestellt. Das rohe Polymere wurde mit MeOH gefällt und ohne weitere Reinigung für die Herstellung der GC-Säulen benutzt. Die Ausbeute an Polymeren lag bei 96–100%. $[\alpha]_D^{20}$ des Polymeren zwischen +305 und +367 ($c = 0,2\text{--}0,5$, THF) [15]: +343 ($c = 0,5$, THF).

Die Analyse der Verteilung der Molekulargewichte wurde mit Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt, unter Verwendung von THF als Lsgm. und einer Waters-HPLC-Apparatur mit Ultrastyroporgel 500, 1000, 10000 Å.

Die Kalibrierung der Molekulargewicht-Skala wurde mit Polystyrol-Standards vorgenommen; Oligomere wurden von der Berechnung der Durchschnittsmolekulargewichte ausgeschlossen. Molekulargewichte lagen im Gewichtsdurchschnitt (MW) im Bereich 24000–58000, im Durchschnitt der Anzahl von Molekülen bei 21000–24000. Demnach ist der Polymerisationsgrad im Bereich von 65–124. Die Belegung des Kieselgels mit (+)-PTMA wurde wie folgt durchgeführt: 0,5 g des Polymeren wurden in einem 500-ml-Rundkolben mit 50 ml CH_2Cl_2 versetzt und etwa 10 min im Ultraschallbad behandelt, so dass eine klare Lsg. entstand. Hierauf wurden 5,0 g Nucleosil 1000-5 (Macherey & Nagel) zugesetzt und die Suspension etwa 3 weitere min im Ultraschallbad belassen. Der Kolben wurde dann mit einem knapp über dem Kolbenboden laufenden Halbmondrührer (100 rpm) und einem Hickmann-Kühler ausgestattet und das Lsgm. langsam bei 0,7 bar unter Ar (Wasserbad, 40°) abdestilliert. Der Rührer wurde gestoppt, sobald das Kieselgel nicht mehr an der Glaswand klebte. Es wurde Ar in den Kolben geblasen, bis nach etwa 1 h das Abgas geruchlos war. Um eine einheitliche Korngrösse des chromatographischen Füllmaterials zu bekommen, wurde der Inhalt des Kolbens in einen 250-ml-Messzylinder gegossen und mit ca. 230 ml MeOH versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde die Mischung 15 min lang der Sedimentation überlassen. Die obenstehende Suspension wurde vorsichtig in einen zweiten Messzylinder gleichen Volumens dekantiert. Hier wurde wieder geschüttelt und dann so lange die Sedimentation abgewartet, bis sich etwa 5–6 ml Kieselgel am Boden des Zylinders angesammelt hatten. Die überstehende Suspension wurde vorsichtig abdekantiert und verworfen. Das Sediment wurde in 18 ml MeOH aufgeschlämmt und die Suspension in eine leere chromatographische Säule gepumpt. Die Füllung der Säule geschah in der üblichen Weise unter Verwendung von 400 ml Hexan als Eluens bei einem Druck von 600 bar. Die Selektivität und die Auflösung der Kolonnen wurde mit (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetat bestimmt.

Chromatographische Bedingungen. Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe Merck-Hitachi L-6200, einem Perkin-Elmer-Injektions-Dosiersystem, einer Stahlsäule (250 mm $\times$ 4 mm) und einem UV-Detektor Merck-Hitachi L-4200, auf $\lambda = 200$ nm und $E = 0,1$ eingestellt. Die mobile Phase war eine Mischung von MeCN und H_2O (9:1, v/v) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, der Druck betrug 22 bar. Die stationäre Phase war (+)-PTMA auf Kieselgel adsorbiert, hergestellt nach dem oben beschriebenen Verfahren, Temp. 20° . Die Pik-Integration erfolgte mit einem Datensystem Varian DS 654. Diese Bedingungen wurden für alle Derivate angewandt. Das oben beschriebene Herstellungsverfahren der (+)-PTMA-Säulen bedarf eines Kommentars. Frühere Versuche, Kieselgel mit diesem Polymeren nach Methoden zu behandeln, wie sie beim Belegen von Kieselgel für gepackte Säulen in der Gaschromatographie üblich sind [17], schlugen fehl. Die hier beschriebene Technik dauert etwas länger, ergibt aber befriedigende Reproduzierbarkeit der Chargen. Versuche mit (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetat zeigten, dass die erreichbare Auflösung stark von der Porengrösse des Kieselgels, vom Polymerisationsgrad des (+)-PTMA, von der

Belegungsdicke des Supports mit dem Polymeren und der Temp. abhängt. Wie erwartet, erreicht die Lebensdauer dieser stationären Phasen nicht jene von chemisch gebundenen Phasen, weil ständig etwas Polymer von der mobilen Phase ausgewaschen wird. Dieser Prozess hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Trennleistung der Säule, die Selektivität ändert sich jedoch nach einigen Wochen ständiger Benutzung in der Weise, dass die vorderen Pike des (all-*rac*)- α -Tocopheryl-acetats, *Fig. (p)*, sich zunehmend näher rücken und schliesslich nicht mehr getrennt erscheinen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 'Nomenclature of Tocopherols and Related Compounds', *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1507; *Eur. J. Biochem.* **1982**, *123*, 473.
- [2] H. Mayer, P. Schudel, R. Rüegg, O. Isler, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 650, und dort zit. Lit.
- [3] a) H. Weiser, M. Vecchi, *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **1981**, *51*, 100; b) W. Walther, E. Glinz, C. Fizet, H. Schneider, R. K. Müller, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [4] N. Cohen, C. G. Scott, C. Neukom, R. J. Lopresti, G. Weber, G. Saucy, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1158.
- [5] H. T. Slover, R. H. Thompson, *Lipids* **1981**, *16*, 268.
- [6] a) 'Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie', Verlag Chemie, Weinheim, 1983, Bd. 23, S. 643; b) O. Isler, G. Brubacher, 'Vitamine I', Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1982.
- [7] W. Bremser, F. G. M. Vogel, *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14*, 155.
- [8] H. Yamaguchi, Y. Itakura, K. Kunihiro, *Iyakuhiin Kenkyu* **1984**, *15*, 536.
- [9] a) R. S. Topgi, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 6125; b) C. Suarna, D. C. Craig, K. J. Cross, P. T. Southwell-Keely, *ibid.* **1988**, *53*, 1281.
- [10] 'Fieser & Fieser's Reagents for Organic Synthesis', Eds. M. Fieser, R. L. Danheiser und W. Roush, John Wiley and Sons, New York, 1981, Vol. 9, S. 69.
- [11] B. Langlois, M. Desbois, *Actual. Chim.* **1987**, 151.
- [12] J. S. Amato, S. Karady, M. Sletzing, L. M. Weinstock, *Synthesis* **1980**, 970.
- [13] R. Baker, C. L. Gibson, C. J. Swain, D. J. Tapolczay, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 1509.
- [14] G. Schomburg, H. Husmann, F. Weeke, *J. Chromatogr.* **1974**, *99*, 63.
- [15] Y. Okamoto, S. Honda, I. Okamoto, H. Yuki, S. Murata, R. Noyori, H. Takaya, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6971.
- [16] Y. Okamoto, K. Hatada, *Daicel Chem. Ind., Ltd.*, Eur. Pat. Appl. 155 637, 16.3.1985.
- [17] E. Bayer, 'Gaschromatographie', 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin, 1962, S. 28.