

## Séparation du cholestérol, du desmostérol et du 5-dihydrocholestérol par chromatographie en couche mince après propionylation

La séparation par chromatographie en couche mince de certains stérols comme le cholestérol, le desmostérol (24-deshydrocholestérol) et le 5-dihydrocholestérol s'avère assez difficile.

Actuellement, la méthode la plus valable est celle qui a été proposée par AVIGAN *et al.*<sup>1</sup> et qui consiste, après acétylation préalable du mélange de stérols selon la technique de JOHNSTON *et al.*<sup>2</sup> à réaliser une migration sur plaque de 40 × 20 cm imprégnée d'acide silicique, sous l'action d'un solvant hexane-benzène (5:1, v/v).

Ce procédé malgré son bon pouvoir de résolution présente au moins deux inconvénients:

(1) Il s'avère particulièrement long à mettre en oeuvre.

(2) Il nécessite un matériel spécial (plaques de 40 × 20 cm) car dans les conditions classiques (plaques 20 × 20 cm) la séparation est médiocre du fait des faibles différences de  $R_F$ .

Dans le présent travail, une méthode de séparation efficace et rapide, sur plaques de 20 × 20 cm est décrite, faisant appel à une propionylation préalable des stérols et à une migration sur couche de silicagel imprégné de nitrate d'argent.

### Méthode expérimentale

(1) *Préparation de l'ester propionique.* Le stérol ou l'extractum renfermant les stérols est directement mis en contact avec 0.5 ml de chlorure de propionyle\*. On facilite la dissolution par léger chauffage à la flamme d'un bec bunsen et laisse ensuite refroidir 10 min. On ajoute alors 5 ml d'hexane, agite, et 3 lavages successifs de la phase organique sont alors pratiqués à l'aide d'eau distillée, de carbonate acide de potassium en solution aqueuse à 10 % et finalement d'eau distillée. La couche organique est alors décantée en tube à essai jaugé à 5 ml, complétée à ce volume par de l'hexane. Le dosage des stérols peut être réalisé sur une partie aliquote de cette solution. Le volume résiduel est évaporé sous vide.

(2) *Préparation des plaques.* 8 g de nitrate d'argent sont dissous extemporanément dans 60 ml d'eau distillée. La mise en suspension dans ce volume de 30 g de silicagel\*\* est effectuée très rapidement et le mélange est étalé\*\*\* sur 3 plaques de 20 × 20 cm en réglant l'épaisseur de la couche à 450-500  $\mu$ . Elles sont mises à sécher alors 30 min à l'obscurité sous hotte ventilée, puis 2-3 h en étuve à 50°. Les plaques peuvent être conservées 3-4 jours à l'obscurité.

La viscosité de la suspension de silicagel dans une solution de nitrate d'argent est supérieure à celle d'une suspension dans l'eau distillée. De plus, des couches de 350-400  $\mu$  s'avèrent plus homogènes après dessiccation. Ce sont les raisons qui obligent à utiliser une plus grande épaisseur d'étalement qu'il n'est habituel, tous les étaleurs commerciaux étant étalonnés en fonction de la viscosité du Kieselgel.

(3) *Développement chromatographique.* 100-200  $\mu$ g de stérols propionylés sont appliqués en solution chloroformique sur une plaque imprégnée de nitrate d'argent. Cette plaque est mise à migrer à l'obscurité dans un solvant hexane-benzène (5:1, v/v)

\* Produits RP, Prolabo, Paris.

\*\* Kieselgel G., Merck, Darmstadt.

\*\*\* Etaleur automatique Stratomat, Chemetron, Milan.

jusqu'à ce que celui-ci ait parcouru toute la plaque. La cuve à chromatographie est alors ouverte de 15 mm et on abandonne ainsi 45 min à 20°. L'évaporation de la partie supérieure permet l'ascension continue du solvant et l'entraînement des corps en cours de migration.

(4) *Séchage et révélation.* On sèche 30 min à 50° puis quelques heures à la température ordinaire à l'obscurité. La révélation est faite à l'acide sulfurique à 50 %, suivi d'un chauffage de 30 min à 110°. On observe des spots colorés en brun foncé.

### Résultats

En utilisant ces conditions opératoires on sépare de façon très satisfaisante cholestérol, desmostérol, 7-deshydrocholestérol, 5-dihydrocholestérol comme le montre la Fig. 1. De plus, la résolution est supérieure à celle obtenue avec les dérivés acétylés des mêmes stérols comme on peut l'observer sur la Fig. 2.

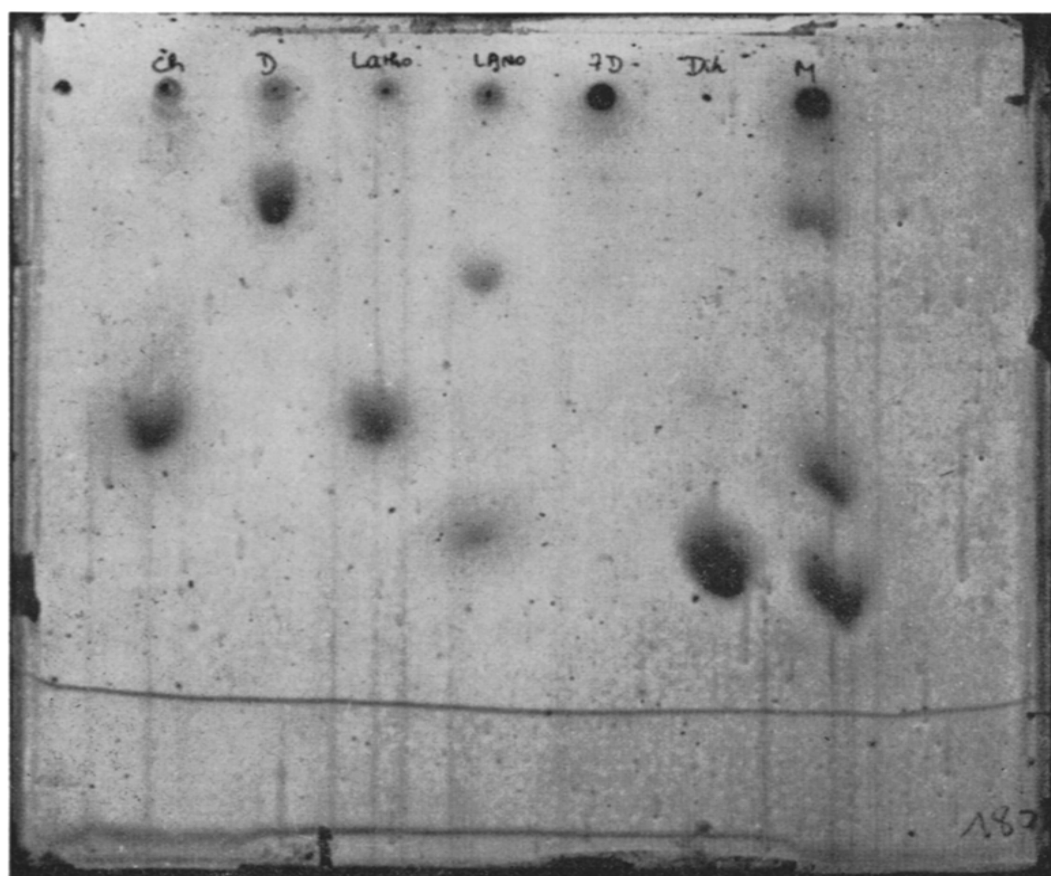


Fig. 1. Séparation des stérols propionylés sur plaque silicagel-nitrate d'argent. Solvant: hexane-benzène (5:1); révélateur:  $H_2SO_4$  à 50 %. De gauche à droite: cholestérol; desmostérol; lathostérol; lanostérol; 7-deshydrocholestérol; 5-dihydrocholestérol; mélange 7-deshydrocholestérol-desmostérol-cholestérol-5-dihydrocholestérol.

### Discussion

1. Le remplacement de l'acétylation en milieu pyridiné comme l'ont proposé JOHNSTON *et al.*<sup>2</sup>, par une propionylation par le chlorure de propionyle présente au moins deux avantages.

(a) Elle est immédiate, à l'inverse de l'acétylation pyridinée qui nécessite 12 h environ de contact.

(b) L'estérification par un acide à 3 atomes de carbone permet une migration plus rapide et une meilleure séparation dans le système solvant hexane-benzène (5:1), que l'estérification par l'acide acétique.

2. Les plaques contenant du nitrate d'argent sont préparées, non plus par pulvérisation d'une solution alcoolique de nitrate d'argent comme le préconisent AVIGAN *et al.*, mais par incorporation directe du sel d'argent dans la suspension destinée à être étalée, comme l'ont montré BARRETT *et al.*<sup>3</sup>, HAAHTI ET NIKKARI<sup>4</sup>, MORRIS<sup>5</sup>, CLAUDE ET BEAUMONT<sup>6</sup>. Le pouvoir séparateur de la couche est ainsi bien supérieur. La proportion de nitrate d'argent incorporée n'est pas absolument critique, mais la quantité indiquée ici paraît optimale.

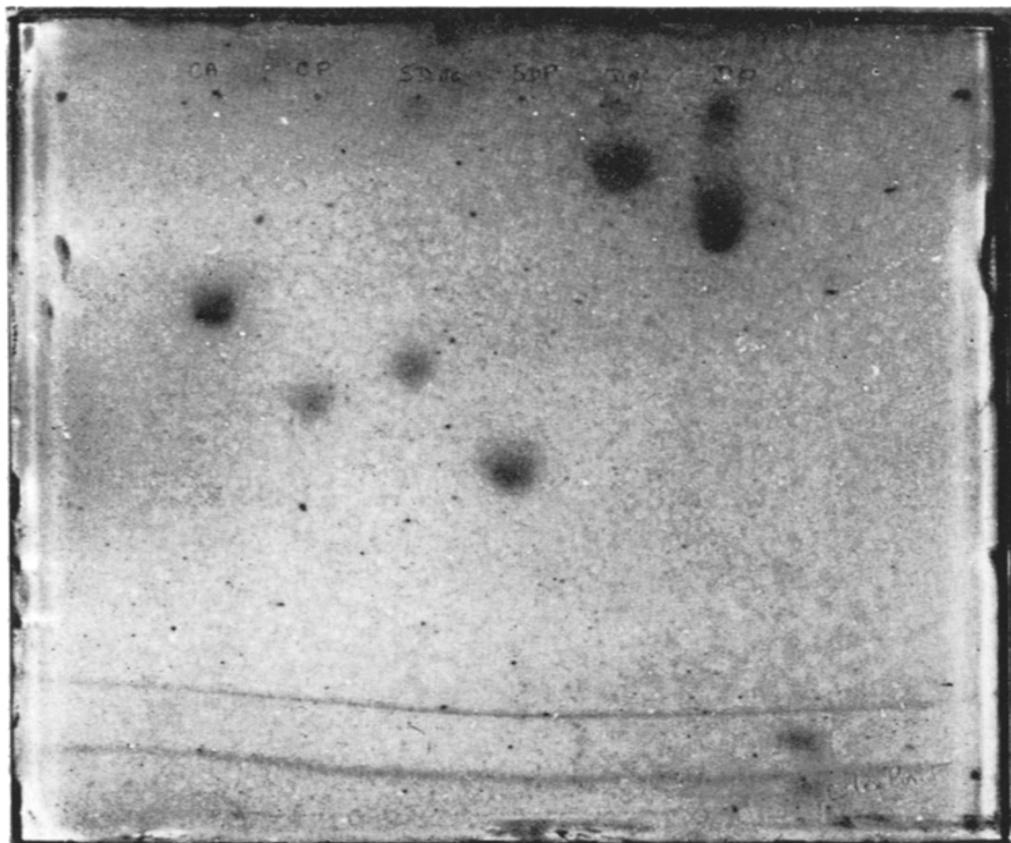


Fig. 2. Comparaison des valeurs réciproques de l'acétylation et de la propionylation pour la séparation du cholestérol, du desmostérol et du 5-dihydrocholestérol sur plaque silicagel-nitrate d'argent. Solvant: hexane-benzène (5:1); révélateur:  $H_2SO_4$  à 50%. De gauche à droite: cholestérol acétylé; cholestérol propionylé; 5-dihydrocholestérol acétylé; 5-dihydrocholestérol propionylé; desmostérol acétylé; desmostérol propionylé.

3. L'ouverture de la cuve à chromatographie dans des conditions bien déterminées à la fin de la migration réalise un développement continu qui améliore grandement la migration globale des substances séparées.

Cette technique rapide a permis en particulier de mettre en évidence de petites quantités de desmostérol dans le sérum humain normal.

*Remerciements*

Nous remercions vivement Mlle M. ANTONUCCI et Mme N. LEMORT de leur collaboration.

*Groupe de Recherches sur l'Athérosclérose\* de l'Institut National  
d'Hygiène, Hôpital Boucicaut, Paris (France)*

J. R. CLAUDE

- 1 J. AVIGAN, D. S. GOODMAN ET D. STEINBERG, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 100.
- 2 J. D. JOHNSTON, F. GAUTSCHI ET K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 185.
- 3 C. B. BARRET, M. S. J. DALLAS ET F. B. PADLEY, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 1050.
- 4 E. HAAHTI ET T. NIKKARI, *Acta Chem. Scand.*, 17 (1963) 536.
- 5 L. J. MORRIS, *J. Lipid. Res.*, 4 (1963) 357.
- 6 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 22 (1964) 815.

Reçu le 23 juillet 1964

\* Directeur: J. L. BEAUMONT

*J. Chromatog.*, 17 (1965) 596-599

### **$R_f$ values of some estrogens and $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroids in thin-layer chromatography without binder**

Recently, much attention has been paid to the biological significance of  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroids as the precursors of estrogen formation in the ovary and placenta. Many attempts have been made to separate estrogens,  $\Delta^5$ -androstene and  $\Delta^5$ -pregnene derivatives. The use of thin-layer chromatography on silica gel was systematically studied for this purpose and excellent results were obtained<sup>1,2</sup>. In the present communication the chromatographic technique for the separation of the most important naturally occurring estrogens and  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroids on a thin layer of alumina without binder<sup>3</sup> is described.

Alumina without binder (activity III for  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroids and activity IV for estrogens, 200-250 mesh) was freely spread on a glass plate (12 × 22 cm) and a layer 10 cm wide and 0.6-0.8 mm thick was smoothed by means of a glass rod with polythene tubing sleeves as described previously<sup>4</sup>. Steroid samples in chloroform were spotted on the start-line and the chromatogram was developed by the ascending technique at a slope of 15° in a chromatographic tank completely saturated with the mobile phase poured into the bottom. The solvent front reached the upper end of the glass plate within 25-30 min.

$3\beta$ -Hydroxy- $\Delta^5$ -steroids were detected by spraying the plate after drying with ALLEN's reagent<sup>5</sup> (80 ml conc. sulphuric acid and 20 ml 90% ethanol); the purple spots appeared without heating. 7-Hydroxy- $\Delta^5$ -steroids and  $\Delta^5,7$ -dienes gave an azure-blue coloration. The sensitivity of the reaction was 1-2  $\mu$ g per spot. Estrogens were detected by spraying the surface of the chromatogram while still moist with ferricyanide-ferric chloride reagent<sup>6</sup>.

*J. Chromatog.*, 17 (1965) 599-602