

CHROM. 5030

ZUR IDENTIFIZIERUNG UND BESTIMMUNG VON STEROLEN

TH. KARTNIG UND G. MIKULA

Institut für Pharmakognosie der Universität Graz, Graz (Österreich)

(Eingegangen am 9. Juni 1970).

SUMMARY

The identification and quantitative determination of sterols

A method for the separation of free sterols by thin-layer chromatography is described using magnesium oxide as adsorbent and cyclohexane-diethyl ether-acetic acid as the solvent system. When using other solvent systems the naturally occurring palmitic and stearic acid esters of these sterols could also be separated on magnesium oxide. The quantitative estimation of sterols separated by precipitation with digitonin followed by thin-layer chromatography on magnesium oxide is carried out by UV-spectrophotometric measurement in concentrated sulphuric acid. The application of this method is demonstrated by the identification and quantitative determination of the sterols of some vegetable oils.

EINLEITUNG

Die Untersuchung von pflanzlichem und tierischem Material auf Sterole ist nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch von praktischem Interesse. Da entsprechend der Bedeutung der Sterolforschung auch die Zahl der einschlägigen Veröffentlichungen sehr gross ist, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden, sondern lediglich auf die Arbeiten von PEERBOOM UND ROOS¹ sowie SEHER UND HOMBERG² hingewiesen werden, in denen umfassende Zusammenstellungen der neueren, einschlägigen Literatur, insbesondere der Bestimmung von Sterolen, gebracht werden.

Die Sterole, die frei oder gebunden vorliegen können, finden sich im Untersuchungsmaterial sehr oft als Gemische. Die Auftrennung solcher Sterolgemische erfolgt heute vorwiegend papier- oder dünnschichtchromatographisch, wobei häufig auf imprägnierten Schichten gearbeitet wird (Verteilungschromatographie) oder Umsetzungsprodukte der Sterole (Acetate, Bromide) getrennt werden. Über die Auftrennung freier Sterole auf nicht-imprägnierten Schichten (Adsorptionchromatographie) wurden nach SEHER UND HOMBERG² noch keine befriedigenden Ergebnisse berichtet. SEHER UND HOMBERG selbst gelingt die Auftrennung der Sterole durch die Chromatographie der acetylierten Produkte auf MgO-Al₂O₃-CaSO₄-Schichten.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Bei unseren Untersuchungen über die Brauchbarkeit des MgO als Sorptionsmittel in der DC von Pflanzeninhaltsstoffen³⁻⁵ zeigte es sich, dass bei der Benützung

entsprechender Fliessmittel auch freie Sterole und deren natürlich vorkommende Ester (z.B. Palmitate, Stearate) auf MgO-Schichten getrennt werden können. Darüber sei im folgenden berichtet.

Abtrennung der Sterole

Die Abtrennung der Gesamtsterole aus dem Untersuchungsmaterial erfolgt nach der bei PEEREBOOM UND ROOS¹ angegebenen Vorschrift durch Fällen mit Digintonin nach vorangegangener Verseifung. Die Spaltung der Digitonide wird mittels Pyridin⁶ durchgeführt. Die letztlich in chloroformiger Lösung vorliegenden Sterole werden von uns wie folgt aufgetrennt.

Auftrennung der Sterole mittels DC

Sorptionsmittel

Als Sorptionsmittel verwenden wir MgO (Handelspräparat Merck, "MgO für die DC"), das unmittelbar vor dem Einschlämmen (15 g MgO + 68 ml H₂O) durch Sieb VI gebürstet wird. Die Beschichtung erfolgt wie üblich. Trocknung bei 130° durch 30 min. Die Platten sind über einem Trocknungsmittel unbeschränkt haltbar.

Fliessmittelgemische

Von ca. 30 versuchten Fliessmittelgemischen (FG) erwiesen sich die folgenden als am besten geeignet:

FG (a), Cyclohexan-Diäthyläther-Eisessig (20:79.5:0.5);

FG (b), Cyclohexan-Diäthyläther-Eisessig (50:49.5:0.5);

FG (c), Petroläther (40-60°)-Eisessig (99.9:0.1);

FG (d), Petroläther (40-60°)-Aceton (98:2);

FG (e), Tetrachlorkohlenstoff.

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt bei Zimmertemperatur und normaler Kammersättigung. Die Laufstrecke beträgt 15 cm, die Laufzeit etwa 30 min.

Detektionsmittel

Vanillin-Schwefelsäure. 3% Vanillin in H₂SO₄ konz.: Nach dem Besprühen ca. 10 min auf 120° erhitzen. Rot-violette Flecken auf hellem Grund. Nachweisgrenze ca. 5 µg.

Alkalische Permanganatlösung. 0.1 M KMnO₄-Lösung + gleiche Teile 10%ige, wässrige NaOH: Nach dem Besprühen ca. 10 min auf 120° erhitzen. Helle Flecken auf violetterem Grund. Nachweisgrenze ca. 10 µg.

Wasser. Nach vorsichtigem Besprühen erscheinen helle Flecken auf dunklerem Grund. Nachweisgrenze ca. 20 µg.

Für die quantitativen Bestimmungen verwenden wir Wasser als Detektionsmittel, das es uns ermöglicht, auch die Bahnen, deren Flecken abgeschabt werden, zu besprühen.

Quantitative Bestimmung der Sterole

ZAFFARONI⁷ und neuerdings LEVORATO⁸ haben darauf hingewiesen, dass Adrenocorticosteroide in konzentrierter Schwefelsäure im UV-Bereich absorbieren. Eigene Untersuchungen⁹ ergaben, dass auch Sterole, Steroidglykoside und triterpenoide Verbindungen in konzentrierter Schwefelsäure spezifische Absorptionsbanden im UV-Bereich aufweisen und durch Messung der Absorption quantitativ bestimmt werden

können. Die spektrophotometrische Messung wird so durchgeführt, dass die abgeschabte Zone des Chromatogrammes in einem Reagensglas in 0.2 ml konz. HCl gelöst und sodann mit 3 ml konz. H₂SO₄ versetzt und gut durchgerührt wird. Man erwärmt durch 15 min auf 60° (oder lässt 2 h 30 min bei Zimmertemperatur stehen), kühlt ab und misst die völlig klare Flüssigkeit bei der entsprechenden Wellenlänge (für Sterole 318 nm) gegen 0.2 ml HCl konz. + 3 ml H₂SO₄ konz., worin eine entsprechende Menge MgO gelöst wurde. Ein allfälliger Niederschlag von MgSO₄ wird abzentrifugiert.

Sollen die Sterole ohne vorherige Trennung mittels DC gemessen werden, so bringt man die Substanz oder deren Lösung in ein Reagensglas, dampft das Lösungsmittel ab und verfährt weiter wie oben angegeben.

Die Erfassungsgrenze dieser Messmethode beträgt für Sterole *ca.* 5 µg, die Standardabweichung ± 1.4 %.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Qualitative Auftrennung von Sterolen und Sterolestern mit Hilfe der Fließmittelgemische a-e

Bei Verwendung der FG (a) und (b) können die untersuchten Sterole mit Ausnahme des Campesterol, das bislang in nur wenigen Ölen nachgewiesen werden konnte, auch im freien Zustand zufriedenstellend aufgetrennt werden. Durch Verlängerung der Laufstrecke auf 25 cm und Verwendung des FG (a) gelingt auch die Auftrennung der kritischen Paare Campesterol (73), Cholesterol (78) und β-Sitosterol (66). Die Auftrennung der Sterole in Form der natürlich vorkommenden Palmitate und Stearate gelingt mit den FG (c-e), wird jedoch sinnvoll nur dort angewendet werden, wo eine Abtrennung über die Digitonide nicht nötig ist (Tabelle I, Fig. 1).

TABELLE I

R_F × 100 WERTE VON STEROLEN UND STEROLESTERN

Verbindung	Fließmittel				
	a	b	c	d	e
Cholesterol	86	51	—	—	—
Stigmasterol	80	41	—	—	—
β-Sitosterol	94	60	—	—	—
Ergosterol	61	27	—	—	—
Campesterol	90	55	—	—	—
Lumisterol	10	15	—	—	—
Lanosterol	100	75	—	—	—
Cholesterolacetat	—	—	57	100	—
Stigmasterolacetat	—	—	45	83	—
β-Sitosterolacetat	—	—	68	100	—
Ergosterolacetat	—	—	21	53	—
Cholesterolpalmitat	—	—	—	86	80
Stigmasterolpalmitat	—	—	—	66	70
β-Sitosterolpalmitat	—	—	—	95	96
Ergosterolpalmitat	—	—	—	43	55
Cholesterolstearat	—	—	—	76	78
Stigmasterolstearat	—	—	—	55	60
β-Sitosterolstearat	—	—	—	93	92
Ergosterolstearat	—	—	—	38	48

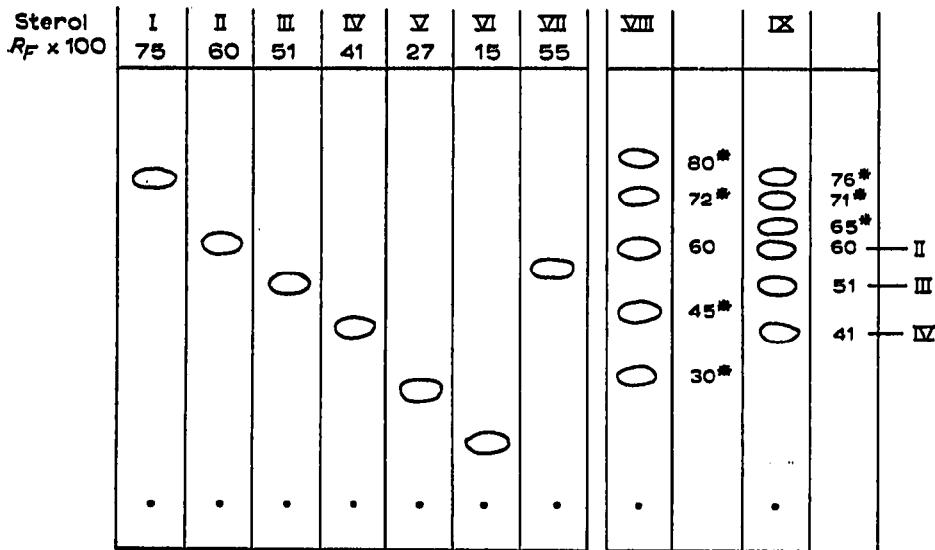


Fig. 1. Auftrennung von Sterolen und Sterolgemischen mit FG (b). Sorptionsmittel, MgO; Laufstrecke, 15 cm. I = Lanosterol, II = β -Sitosterol, III = Cholesterol, IV = Stigmasterol, V = Ergosterol, VI = Lumisterol, VII = Campesterol, VIII = Oleum Olivae, IX = Oleum Arachidis und Oleum Ricini (Sterole identisch). * Nicht identifizierbares Sterol.

Quantitative Bestimmung der Sterole

Die quantitative Bestimmung der isolierten Sterole erfolgt durch die oben beschriebene spektralphotometrische Messung in konzentrierter Schwefelsäure mit grosser Genauigkeit. Die günstigste Menge sowohl zur DC Auftrennung wie auch zur spektroskopischen Messung liegt zwischen 40 und 100 μg pro Sterol. Die Standardabweichung der Gesamtbestimmung liegt bei $\pm 2.5\%$. In Tabelle II und Fig. 2 sind die Extinktionswerte und Eichkurven einiger Sterole und Sterolester als Beispiele geführt.

Der Vorteil der beschriebenen Bestimmung, deren Erfassungsgrenze (ca. 20 μg)

TABELLE II

EXTINKTIONEN DER EICHKURVEN EINIGER STEROLE UND ESTER
 $\lambda = 318 \text{ nm}$.

Verbindung	Extinktion für		
	50 μg	75 μg	100 μg
Cholesterol	0.305	0.450	0.600
Stigmasterol	0.370	0.550	0.740
β -Sitosterol	0.370	0.550	0.740
Cholesterolacetat	0.255	0.375	0.500
Stigmasterolacetat	0.275	0.400	0.540
β -Sitosterolacetat	0.250	0.370	0.490
Cholesterolpalmitat	0.210	0.310	0.420
Stigmasterolpalmitat	0.210	0.320	0.425
β -Sitosterolpalmitat	0.190	0.280	0.375
Cholesterolstearat	0.200	0.285	0.380
Stigmasterolstearat	0.200	0.300	0.410
β -Sitosterolstearat	0.170	0.260	0.350

und Genauigkeit (Standardabweichung $\pm 2.5\%$) zufriedenstellend scheinen, liegt durch die Auftrennung der Sterole auf MgO darin, dass sich das Sorptionsmittel der abgeschabten Zone im Salzsäure-Schwefelsäuregemisch völlig löst und somit das gesamte in der Beschichtung (MgO) vorhandene Sterol zur Umsetzung und Messung gelangt. Diesbezügliche Versuche mit eingewogenen Reinsubstanzen und von der DC abgeschabten Flecken ergaben identische Extinktionswerte.

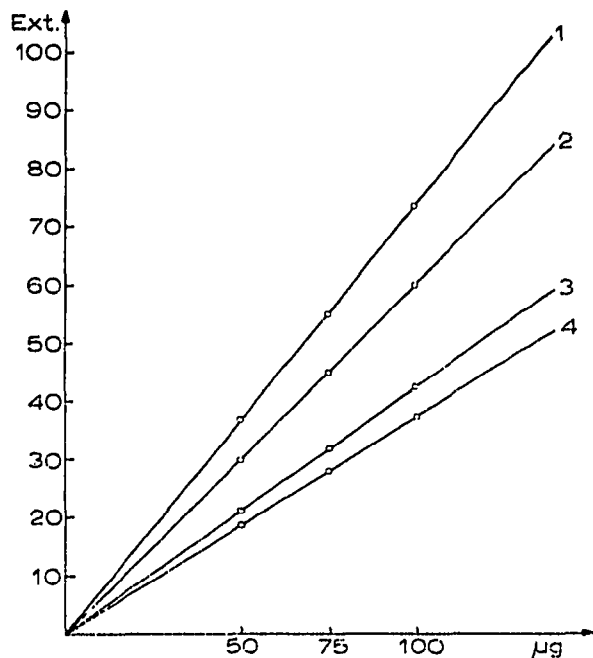


Fig. 2. Eichkurven einiger Sterole und Sterolester. UV-Spektroskopische Messung in konz. H_2SO_4 bei 318 nm. 1 = β -Sito- und Stigmasterol, 2 = Cholesterol, 3 = β -Sito- und Stigmasterolpalmitat, 4 = Cholesterolpalmitat.

ANWENDUNGSBEISPIELE

Als Anwendungsbeispiele der vorgestellten Methode bestimmten wir die Sterolgehalte einiger im ÖAB 9 angeführter Öle. Die Chromatogramme der über die Digitonidfällung erhaltenen Sterolgemische des Oleum Olivae, Oleum Arachidis und Oleum Ricini zeigen neben vier bekannten Sterolen die Flecken von 3 bzw. 4 weiteren, nicht identifizierbaren Sterolen (siehe Fig. 1), wobei die Zusammensetzung der Sterolfraktion des Oleum Arachidis und Oleum Ricini praktisch gleich ist. Die in Kolonne 1 der Tabelle III angeführten Gesamtsterolgehalte sind gleichzeitig die Sterolgehalte nach der Methode von PEERBOOM UND ROOS¹.

In allen drei untersuchten Ölen erwiesen sich sowohl bei den frei vorliegenden wie auch bei den gebunden vorliegenden Sterolen die qualitative wie auch die quantitative Zusammensetzung dieser beiden Fraktionen praktisch als gleich.

DANK

Herrn Prof. Dr. J. W. COPPIUS PEERBOOM danken wir die grosszügige Überlassung hochreiner Sterole. Ebenso gilt unser Dank Herrn Prof. Dr. A. SEHER für die Überlassung von Campesterol.

TABELLE III
BESTIMMUNG DER STEROLGEHALTE EINIGER ÖLE DES ÖAB 9

	Gesamtsterole		Sterole		Qualitative Zusammensetzung des Sterolgemisches	Quantitative Zusammensetzung des Sterolgemisches		
	(mg %)	(mg %)	frei (mg %)	gebunden (mg %)		Gesamtsterole	Sterole frei	Sterole gebunden
Oleum Olivae	12.94	3.12	3.12	9.82	β -Sitosterol 4 weitere Sterole (nicht identifizierbar)	78.4 % β -Sitosterol 21.6 % restl. Sterole	78.0 % β -Sitosterol 22.0 % restl. Sterole	78.5 % β -Sitosterol 21.4 % restl. Sterole
Oleum Arachidis	28.00	15.56	15.56	12.44	β -Sitosterol Stigmasterol Cholesterol 3 weitere Sterole (nicht identifizierbar)	50.0 % β -Sitosterol 27.7 % Stigmasterol 13.8 % Cholesterol 8.5 % restl. Sterole	50.0 % β -Sitosterol 27.8 % Stigmasterol 13.8 % Cholesterol 8.4 % restl. Sterole	50.0 % β -Sitosterol 27.7 % Stigmasterol 13.8 % Cholesterol 8.5 % restl. Sterole
Oleum Ricini	24.46	21.32	21.32	3.14	β -Sitosterol Stigmasterol Cholesterol 3 weitere Sterole (nicht identifizierbar)	48.0 % β -Sitosterol 31.3 % Stigmasterol 16.6 % Cholesterol 5.1 % restl. Sterole	48.0 % β -Sitosterol 30.7 % Stigmasterol 16.1 % Cholesterol 5.2 % restl. Sterole	48.0 % β -Sitosterol 31.2 % Stigmasterol 16.5 % Cholesterol 5.3 % restl. Sterole

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur dünn-schichtchromatographischen Trennung freier Sterole beschrieben, wobei Magnesiumoxid als Sorptionsmittel und das System Cyclohexan-Diäthyläther-Eisessig (20:79.5:0.5) als Fließmittelgemisch benützt werden. Bei Verwendung weiterer Fließmittelgemische können auch die natürlich vorkommenden Palmitinsäure- und Stearinsäureester der Sterole auf Magnesiumoxid getrennt werden. Die quantitative Bestimmung der über Digitonidfällung und Dünnschichtchromatographie auf Magnesiumoxid aufgetrennten Sterole (sieben Substanzen) erfolgt durch UV-spektroskopische Messung in konzentrierter Schwefelsäure. Als Anwendungsbeispiele wird der Sterolgehalt einiger Öle bestimmt.

LITERATUR

- 1 J. W. COPIUS PEEREBOOM UND J. B. ROOS, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 62 (1960) 91.
- 2 A. SEHER UND E. HOMBERG, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 70 (1968) 481.
- 3 TH. KARTNIG, A. HIERMANN UND G. MIKULA, *Pharm. Zentralhalle*, 108 (1969) 177.
- 4 TH. KARTNIG UND G. MIKULA, *Pharm. Zentralhalle*, 108 (1969) 457.
- 5 TH. KARTNIG UND G. MIKULA, *Zentr. Pharm.*, 109 (1970) 251.
- 6 H. DAM UND R. SCHOENHEIMER, *Z. Physiol. Chem.*, 215 (1933) 59.
- 7 A. ZAFFARONI, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3828.
- 8 C. LEVORATO, *Il Farmaco, Ed. Prat.*, 24 (1969) 227.
- 9 TH. KARTNIG UND G. MIKULA, *Arch. Pharm.*, 303 (1970) 767.

J. Chromatog., 53 (1970) 537-543