

CHROM. 10,111

ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DER STRUKTUR PFLANZLICHER STERINE UND IHREM GASCHROMATOGRAPHISCHEN VERHALTEN AUF VERSCHIEDENEN STATIONÄREN PHASEN

ELFRIEDE HOMBERG

Bundesanstalt für Fettforschung, Piusallee 68-76, 4400 Münster (B.R.D.)

(Eingegangen am 15. Februar 1977)

SUMMARY

Relationship between the structure of plant sterols and their retention behaviour in gas chromatography on several stationary phases

The relative retention times of 49 plant sterols were determined as their trimethylsilyl ethers on 8 different stationary phases. Separation characteristics are derived from the gas chromatographic behaviour of the different types of double bonds and other structural specificities. Proper choice of a stationary phase for optimal separation of critical pairs is facilitated by the separation factors.

EINLEITUNG

Schon in frühen Arbeiten über die gaschromatographische (GC) Trennung von Sterinen wurde über die Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Retentionszeit pflanzlicher Sterine berichtet^{1,2}. Die Anwendung dieser Erkenntnisse auf die Zusammensetzung aus Pflanzen isolierter Steringemische zeigte, dass diese sich wegen ihrer komplexen Zusammensetzung gaschromatographisch nicht ohne weiteres trennen lassen. Zur Trennung der kritischen Paare sind stationäre Phasen mit unterschiedlicher Selektivität erforderlich. Durch Kombination verschiedener Säulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften lassen sich die meisten dieser Trennprobleme lösen. In einer Reihe von Arbeiten wird darüber berichtet³⁻⁸. Eigene Untersuchungen mit neueren stationären Phasen haben zu einer Erweiterung der Erkenntnisse geführt. Zusammen mit diesen Versuchen wird eine zusammenfassende Übersicht gegeben über die auf dem heutigen Stand des Wissens verfügbaren Erkenntnisse über optimale Bedingungen zur Trennung pflanzlicher Sterine.

EXPERIMENTELLES

GC-Säulen und Arbeitsbedingungen

SE-30 und QF-1 wurden bezogen von der Firma E. Merck (Darmstadt, B.R.D.); OV-17, OV-25 und SP-1000 von Supelco; Dexsil 300 und Silar 5CP von

Applied Science Labs.; HI-EFF-8BP sowie die Trägermaterialien Chromosorb W AW und Chromosorb W AW DMCS von der Firma W. Günther Analystechnik (Düsseldorf, B.R.D.).

Die Liquidphasen wurden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und zu 3% auf Chromosorb W AW DMCS, 80–100 mesh, aufgezogen, Dexsil 300 zu 2% auf Chromosorb W AW, 80–100 mesh. Das Säulenmaterial wurde in Glassäulen (3.5 m × 4 mm I.D.) gefüllt und über Nacht etwas unterhalb der Maximaltemperatur ausgeheizt.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt auf einem Perkin-Elmer Gaschromatographen F22 mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und "on-column" Einspritzung; Injektor- und Detektortemperaturen 280–300°, Ofentemperaturen 225–285°, je nach der Maximaltemperatur der Säule (Tabelle I).

TABELLE I

STATIONÄRE PHASEN ZUR UNTERSUCHUNG VON STERIN-TMS-ÄTHERN

Stationäre Phase	McReynold Konstante	Max. Temp. (°C)	Arbeits-temp. (°C)	Theoretische Böden
SE-30 (Dimethylsilikon)	17	300	253	3180
Dexsil 300 (Polycarboransiloxan)	47	500	285	4280
OV-17 (50% Phenyl-methyl-silikon)	119	375	265	3130
QF-1 (50% Trifluorpropyl-methyl-silikon)	144	250	225	3210
OV-25 (75% Phenyl-methyl-silikon)	178	350	260	2900
HI-EFF-8BP (1,4-Cyclohexan-dimethanolsuccinat)	269	250	238	3500
Silar 5CP (50% Cyanopropyl-50% phenyl-silikon)	319	275	240	4240
SP-1000 (Carbowax 20M, modifiziert)	332	275	240	3775

Standardsubstanzen

Cholesterin, Stigmasterin und Sitosterin wurden bezogen von der Firma E. Merck; Cholestanol und Ergosterin von der Firma C. Roth (Karlsruhe, B.R.D.); Campesterin, Desmosterin, Lanosterin, Dihydrolanosterin und β -Amyrin lieferten Applied Science Labs. Campestanol und Stigmastanol entstanden bei der Hydrierung von Campesterin und Sitosterin. Fucosterin wurde aus Braunalgen isoliert, Brassicasterin aus Rapsöl, 24-Methylencholesterin, Δ 5,24(28)-Stigmastadienol, Δ 7,24(28)-Stigmastadienol und Δ 7,24(25)-Stigmastadienol aus Sonnenblumenöl, Δ 7,25-Stigmastadienol und Δ 7,22,25-Stigmastatrienol aus Kürbiskernen und Δ 5,25-Stigmastadienol aus dem Samenöl von *Trichosanthes kirilowii*. Die übrigen Substanzen wurden synthetisiert.

Alle Substanzen wurden untersucht als Trimethylsilyl (TMS)-Äther. Diese wurden hergestellt durch 1-stündiges Erhitzen der Sterine mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluor(o) butyramid in "reaction vials". Der Überschuss des Silylierungsmittels wurde im Stickstoff-Strom abgedampft und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die relativen Retentionszeiten sind bezogen auf Cholesterin TMS-Äther = 1.00 bei einer absoluten Retentionszeit von 30 min.

RESULTATE UND DISKUSSION

Polarität und Selektivität der stationären Phasen

Mit Hilfe geeigneter Säulen unterschiedlicher Polarität und Selektivität ist es heute möglich, die meisten Trennprobleme pflanzlicher Sterine gaschromatographisch zu lösen. Dazu gehört die Kenntnis spezifischer Trenneigenschaften der stationären Phasen, die man mit Hilfe von Standardsubstanzen ermitteln kann. Die Art der Strukturmerkmale pflanzlicher Sterine bringt es mit sich, dass die relativen Retentionszeiten der Sterine durch die Art der Untersuchung als freie Sterine, Sterinacetate oder TMS-Äther nicht unterschiedlich beeinflusst werden. Die Wahl, ob freie Sterine oder Sterinderivate untersucht werden sollen, ist eine Frage der Trennbedingungen. Im allgemeinen geben TMS-Äther die besten Trennungen.

Zahl, Natur und stereochemische Anordnung der funktionellen Gruppen sind wichtig. Diese bestehen bei pflanzlichen Sterinen vorwiegend aus Doppelbindungen und OH-Gruppen. Strukturunterschiede, die nur auf Grösse und Form des Moleküls beruhen und keinen funktionellen Charakter haben, führen auf polaren und unpolaren Säulen zu den gleichen Retentionsveränderungen.

Die Selektivität einer stationären Phase wird beurteilt nach dem Retentionsverhalten funktioneller Gruppen der zu untersuchenden Substanz. Sie geht im allgemeinen parallel mit der Polarität der Liquidphase. Es gibt jedoch Ausnahmen, wo eine polare Phase eine spezifische Selektivität für bestimmte Strukturmerkmale aufweist, sich andererseits aber wie eine unpolare Phase verhält, z.B. QF-1. Es müsste auf Grund seiner McReynold Konstanten unter die selektiven Phasen eingereiht werden, verhält sich jedoch nur in Bezug auf polare Substituenten, z.B. C=O-Gruppen, wie eine selektive Phase, in Bezug auf Doppelbindungen wie eine nicht selektive Phase. QF-1 ist wegen seiner geringen Selektivität gegenüber Doppelbindungen noch wenig auf spezifische Trenneigenschaften pflanzlicher Sterine untersucht worden.

Substitution durch Methyl- oder Äthylgruppen

Zu den Strukturveränderungen, die sich auf allen stationären Phasen gleich auswirken, gehört die Methyl- bzw. Äthylsubstitution am C₂₄ der Seitenkette. Sie führt zu einer Verlängerung der relativen Retentionszeit, die beeinflusst wird durch benachbarte Doppelbindungen, z.B. bei einer 24-Methylgruppe durch eine Δ 22-Doppelbindung. Wenn die C-Zahl des Sterins durch Methylgruppen in 4- oder 14-Stellung wächst, tritt meistens eine Verlängerung der relativen Retentionszeit (RRT) ein. 4 α -Methylgruppen tragen immer zu einer Verlängerung bei, wenn diese auch weniger ausgeprägt ist als bei der C-24 Methylgruppe wegen der Wechselwirkung mit der 3 β -OH Gruppe. Eine 4 β -Methylgruppe verlängert ebenfalls die RRT, während eine 14-Methylgruppe auf einigen stationären Phasen eine Verlängerung, auf anderen eine Verkürzung bewirkt. Auch diese Verschiebung wird kontrolliert durch benachbarte Doppelbindungen, z.B. Δ 8(9) und Δ 17. Sie ist unabhängig von der Polarität der Phasen³.

Einfluss von Doppelbindungen

Doppelbindungen sowie Hydroxy- und Ketogruppen beeinflussen das Retentionsverhalten. Da durch eine Doppelbindung die Konfiguration des Moleküls verändert wird, kommt es in Abhängigkeit von der Stellung auf polaren und unpolaren

Phasen zu unterschiedlicher Retention. Die Trennung verschiedener Doppelbindungs-isomerer beruht besonders bei selektiven Siloxanphasen vorwiegend auf Unterschieden in der Konfiguration der Moleküle, weniger auf einer Affinität der C=C-Doppelbindung an die Liquidphase⁹. Besonders ausgeprägt ist der Einfluss der Konfiguration bei der Trennung der $\Delta 5$ -Sterine von den entsprechenden gesättigten Sterinen. Diese gelingt nur auf Phasen mit einem hohen Mass an stereochemischer Spezifität, z.B. Dexsil 300, QF-1, SP-1000, EGSS-x und NGS. Auf den hochpolaren Phasen NGS, EGSS-x und SP-1000 wird das gesättigte Sterin vor dem $\Delta 5$ -ungesättigten eluiert, auf QF-1 und Dexsil 300 ist es umgekehrt. Die sterische Konfiguration, die von der $\Delta 5$ -Doppelbindung herrührt, ähnelt der *cis*-Verknüpfung (5β) des A- und B-Ringes. Durch Herstellung der Heptafluorbutyrate oder Trifluoracetate lässt sich auf QF-1 eine verbesserte Trennung der $\Delta 5$ - von den 5-Dihydroverbindungen erreichen.

$\Delta 7$ -Sterine der Cholestanserie zeigen auf allen Säulen eine verlängerte RRT, die auf selektiven Säulen mit Ausnahme von QF-1 in ihrer Grösse von der Polarität der stationären Phase abhängt. Je polarer die Säule, desto länger die RRT. Auffallend sind die z.T. grossen Differenzen zwischen den $\Delta 7$ -Sterinen der Cholestan-, Ergostan- und Stigmastanreihe, die in weniger starkem Masse auch bei anderen Doppelbindungstypen zu verzeichnen sind. In der Coprostanserie wird der Einfluss der $\Delta 7$ -Doppelbindung durch die 5β -Konfiguration aufgehoben³. Die $\Delta 8(9)$ -Doppelbindung übt nur auf QF-1 (Verkürzung) sowie Silar 5CP und SP-1000 (Verlängerung) einen nennenswerten Einfluss aus. $\Delta 8(14)$ hat auf allen Säulen eine niedrigere RRT als $\Delta 8(9)$. Eine Unterscheidung zwischen $\Delta 8(9)$ und $\Delta 8(14)$ ist nur auf Dexsil 300, SE-30, HI-EFF-8BP und SP-1000 möglich, nicht auf polaren Polysiloxanphasen.

Uncharakteristisch für Phytosterine sind einige Doppelbindungen im Ringgerüst, die auf allen Phasen keine nennenswerte Retentionsveränderung bewirken. $\Delta 4$, $\Delta 6$ und $\Delta 14^2$ verhalten sich ähnlich wie $\Delta 5$ -Sterine. $\Delta 9(11)$ und $\Delta 16$ -Doppelbindungen verkürzen die Retentionszeit auf einer DEGS-Säule².

Die $\Delta 22$ -Doppelbindung bewirkt auf allen stationären Phasen eine Verkürzung der RRT, die durch Methyl- oder Äthylsubstitution am C₂₄ in ihrer Grösse nur unwesentlich beeinflusst wird. Die Polarität der Säule spielt bei der Retention der $\Delta 22$ -Doppelbindung kaum eine Rolle. Geringe Unterschiede im Retentionsverhalten bewirken jedoch, dass auf den polaren Phasen HI-EFF-8BP, Silar 5CP, SP-1000 sowie QF-1 keine befriedigende Trennung des kritischen Paares Stigmasterin-Campesterin möglich ist.

Bei sämtlichen Seitenkettendoppelbindungen ausser $\Delta 22$ hat die Polarität der Säule (abgesehen von QF-1) auf das Retentionsverhalten grossen Einfluss. Die $\Delta 25$ -Doppelbindung und die 24-Methylengruppe bewirken auf unpolaren Säulen und QF-1 eine Verkürzung der RRT, auf selektiven Phasen je nach Polarität eine mehr oder weniger starke Verlängerung. Die 24-Äthylidengruppe kommt in der Z-(Avanasterin) und E-(Fucosterin) Konfiguration vor. Die Z-Konfiguration hat immer eine längere Retentionszeit als die E-Konfiguration. Auf unpolaren Säulen lässt sich Fucosterin kaum von dem entsprechenden Sterin mit gesättigter Seitenkette unterscheiden, auch die Differenz zwischen E- und Z-Form ist gering. Beide Trennmöglichkeiten verbessern sich stark mit zunehmender Polarität der Säule. Die 24(25)-Doppelbindung führt zu einer ähnlich starken Verlängerung wie die $\Delta 7$ -Doppelbindung.

Im allgemeinen addieren sich die Einflüsse mehrerer isolierter Doppelbindungen im Molekül sowohl auf polaren als auch unpolaren stationären Phasen. Eine

Ausnahme bilden nahe zusammen liegende Doppelbindungen, z.B. Δ_{22} und Δ_{25} , die eine gewisse Wechselwirkung aufeinander ausüben. Dadurch entspricht die Verkürzung oder Verlängerung auf den verschiedenen Phasen nicht der durch Addition errechneten RRT eines $\Delta_{22,25}$ -Systems. Die ermittelte Retentionszeit ist immer geringer als die errechnete. Die Differenzen zwischen den beiden Werten sind auf polaren Phasen grösser als auf unpolaren.

Bei Sterinen mit konjugiertem Diensystem, z.B. $\Delta_{5,7}$, $\Delta_{7,9}$, $\Delta_{7,14}$, $\Delta_{8,14}$, ist die Beeinflussung so stark, dass dieses als funktionelle Gruppe betrachtet werden muss. Teilweise kommt es zu einer Verlängerung, teilweise zu einer Verkürzung gegenüber dem entsprechenden Monoen mit der grösseren RRT. Eine GC-Unterscheidung der verschiedenen Diensysteme des Ringgerüsts ist nicht auf allen Säulen möglich. Einige Diene lassen sich besser auf polaren, andere auf unpolaren Phasen unterscheiden. Gesetzmässigkeiten in Abhängigkeit von der Polarität der Phasen sind nicht gegeben.

Epimerentrennungen

Während bei der Untersuchung pflanzlicher Sterine die Unterscheidung zwischen isomeren Doppelbindungen von grosser Bedeutung ist, spielen Epimere kaum eine Rolle. Im allgemeinen stehen α -ständige Substituenten äquatorial zum Ringgerüst, während β -ständige eine axiale Stellung einnehmen. Die 3-OH-Gruppe hat immer β -, das H-Atom in 5-Position immer α -Konfiguration. Die Methyl- bzw. Äthylgruppe am C₂₄ der Seitenkette kann in α - und β -Stellung vorkommen. α -Ständig sind z.B. Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin, während Ergosterin und Brassicasterin 24β -Konfiguration aufweisen. Auch bei den 24-Äthylidensterinen unterscheidet man zwei epimere Formen: 24Z (Avenasterin) und 24E (Fucosterin). Sterine, bei denen sich ein Substituent des Ringgerüsts in seiner axialen oder äquatorialen Stellung von der des Cholestans unterscheidet, sind im Pflanzenreich bisher nicht nachgewiesen worden mit Ausnahme in den selten vorkommenden Steroidhormonen¹². Gaschromatographisch lassen sich Epimerentrennungen bei Steroiden in den meisten Fällen durchführen. Für die Trennung von 24α -Methyl und 24β -Methyl-Epimeren ist bisher allerdings noch kein GC-System bekannt. 24Z- und 24-E Äthylidensterine lassen sich trennen, wobei die Differenzen der RRT auf polaren Säulen grösser sind als auf unpolaren und auf QF-1. Axiale Formen haben niedrigere Retentionszeiten als äquatoriale. Im allgemeinen sind Epimerentrennungen wie 5α - und 5β - am besten auf Polyesterphasen durchzuführen. QF-1 ist dafür auch geeignet¹³. Von Mathews u.a.¹⁴ wird PZ-176 für Epimerentrennungen empfohlen. 3β -OH-Sterine lassen sich von den entsprechenden Epiverbindungen ebenfalls am besten auf polaren Phasen trennen. Auf unpolaren Phasen wie SE-30 ist eine Trennung nur nach Derivatisierung der OH-Gruppe möglich, z.B. als Acetat oder TMS-Äther. Sterische Effekte werden durch Derivatbildung verstärkt. Bei freien Sterinen kann intramolekulare H-Bindung zwischen einer axialen 3-OH-Gruppe und einer 5/6-Doppelbindung die GC-Trennung beeinflussen¹⁵.

Vergleich relativer Retentionszeiten

Die Wahl der stationären Phase richtet sich grundsätzlich nach dem Trennproblem. Die Strukturmerkmale der zu untersuchenden Sterine sollen möglichst grosse Differenzen der RRT-Werte aufweisen, ohne jedoch kritische Paare zu bilden.

TABELLE II

RELATIVE RETENTIONSZEITEN VON STERIN-TMS-ÄTHERN

<i>Sterin</i>	<i>QF-1</i>	<i>Dexsil</i> <i>300</i>	<i>SE-30</i>	<i>OV-17</i>	<i>OV-25</i>	<i>HI-EFF-</i> <i>8BP</i>	<i>Silar</i> <i>5CP</i>	<i>SP-1000</i>
Cholesterin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholestanol	1.07	1.05	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95
Δ^4 -Cholestenol	1.00	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Δ^6 -Cholestenol	0.99	1.01	0.99	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01
Δ^7 -Cholestenol	1.12	1.13	1.12	1.17	1.20	1.22	1.23	1.20
Δ^{14} -Cholestenol	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
$\Delta^{5,7}$ -Cholestadienol	1.10	1.09	1.08	1.14	1.17	1.16	1.27	1.22
Demosterin	1.08	1.08	1.08	1.28	1.29	1.30	1.31	1.33
Campesterin	1.33	1.28	1.29	1.30	1.30	1.31	1.30	1.29
Campestanol	1.40	1.33	1.30	1.30	1.30	1.31	1.31	1.23
Δ^7 -Campesterin	1.48	1.48	1.45	1.52	1.55	1.58	1.60	1.56
Δ^7 -Ergostenol	1.48	1.48	1.45	1.52	1.55	1.58	1.60	1.56
$\Delta^8(9)$ -Ergostenol	1.33	1.35	1.34	1.35	1.37	1.33	1.37	1.34
$\Delta^8(14)$ -Ergostenol	1.31	1.24	1.27	1.31	1.34	1.25	1.35	1.26
Δ^{14} -Ergostenol	1.32	1.28	1.28	1.29	1.29	1.30	1.29	1.28
24-Methylencholesterin	1.31	1.26	1.26	1.39	1.41	1.43	1.45	1.44
Brassicasterin	1.11	1.09	1.12	1.12	1.12	1.10	1.10	1.11
$\Delta^{5,7}$ -Ergostadienol	1.47	1.41	1.40	1.51	1.55	1.65	1.68	1.56
$\Delta^{7,9}$ -Ergostadienol	1.40	1.39	1.39	1.49	1.54	1.55	1.60	1.56
$\Delta^{7,14}$ -Ergostadienol	1.34	1.33	1.31	1.39	1.44	1.46	1.51	1.51
$\Delta^8,14$ -Ergostadienol	1.31	1.32	1.31	1.39	1.44	1.46	1.47	1.49
$\Delta^{7,22}$ -Ergostadienol	1.25	1.27	1.26	1.33	1.36	1.36	1.38	1.36
$\Delta^8(14),22$ -Ergostadienol	1.09	1.05	1.10	1.13	1.16	1.04	1.15	1.08
$\Delta^{14},22$ -Ergostadienol	1.07	1.10	1.12	1.11	1.11	1.10	1.11	1.10
Ergosterin	1.24	1.20	1.21	1.32	1.36	1.43	1.49	1.47
$\Delta^{7,9(11),22}$ -Ergostadienol	1.17	1.19	1.20	1.31	1.35	1.33	1.40	1.36
Sitosterin	1.63	1.56	1.60	1.60	1.61	1.59	1.57	1.56
Stigmastanol	1.75	1.62	1.60	1.60	1.61	1.59	1.57	1.48
Δ^7 -Stigmastenol	1.81	1.80	1.79	1.87	1.91	1.91	1.93	1.90
$\Delta^8(14)$ -Stigmastenol	1.59	1.50	1.57	1.61	1.67	1.51	1.62	1.51
Δ^{14} -Stigmastenol	1.62	1.56	1.59	1.59	1.60	1.58	1.56	1.55
Stigmasterin	1.37	1.34	1.40	1.40	1.41	1.36	1.36	1.36
$\Delta^{5,7}$ -Stigmastadienol	1.78	1.73	1.75	1.85	1.90	1.98	2.02	1.90
$\Delta^{7,9}$ -Stigmastadienol	1.73	1.71	1.71	1.81	1.86	1.85	1.91	1.89
$\Delta^{7,14}$ -Stigmastadienol	1.68	1.62	1.63	1.71	1.78	1.77	1.83	1.82
$\Delta^8,14$ -Stigmastadienol	1.64	1.61	1.63	1.71	1.78	1.77	1.79	1.76
$\Delta^{14},22$ -Stigmastadienol	1.38	1.38	1.40	1.40	1.41	1.36	1.36	1.35
$\Delta^{7,22}$ -Stigmastadienol	1.55	1.58	1.60	1.67	1.69	1.68	1.72	1.73
$\Delta^{5,25}$ -Stigmastadienol	1.55	1.48	1.54	1.64	1.67	1.67	1.70	1.68
$\Delta^{7,25}$ -Stigmastadienol	1.72	1.72	1.73	1.90	1.96	2.02	2.06	2.04
$\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol	1.98	1.96	1.93	2.16	2.19	2.22	2.27	2.24
$\Delta^{5,24(28)E}$ -Stigmastadienol	1.65	1.58	1.61	1.70	1.76	1.74	1.74	1.76
$\Delta^{5,24(28)Z}$ -Stigmastadienol	1.68	1.61	1.65	1.75	1.84	1.83	1.83	1.86
$\Delta^{7,24(28)Z}$ -Stigmastadienol	1.86	1.85	1.85	2.04	2.13	2.17	2.19	2.20
$\Delta^{5,22,25}$ -Stigmastatrienol	1.40	1.28	1.35	1.48	1.53	1.55	1.56	1.55
$\Delta^{7,22,25}$ -Stigmastatrienol	1.58	1.52	1.56	1.80	1.85	1.87	1.92	1.92
Lanosterin	1.60	1.53	1.55	1.57	1.66	1.54	1.62	1.52
Dihydrolanosterin	1.49	1.39	1.40	1.31	1.31	1.19	1.24	1.14
β -Amyrin	1.75	1.74	1.55	1.70	1.74	1.76	1.76	1.63

Oft ist dieses Problem nur durch Kombination von Säulen mit unterschiedlicher Polarität und Selektivität zu lösen. Die Tabelle II gibt Anhaltspunkte zur Unterscheidung spezifischer Strukturmerkmale pflanzlicher Sterine. Sie enthält die Zusammenstellung einer Anzahl von C_{27} - C_{29} -Sterinen und drei Triterpenen mit charakteristischen Strukturmerkmalen sowie deren RRT-Werte auf acht verschiedenen stationären Phasen.

Die wenigen Beispiele aus dem Bereich der Triterpene lassen erkennen, dass auch auf diesem Gebiet durch Verwendung von Säulen unterschiedlicher Polarität gute Unterscheidungsmöglichkeiten gegeben sind. Da sie sich ebenso wie die 4-Methylsterine leicht dünn-schichtchromatographisch von den Desmethylsterinen abtrennen lassen⁹, besteht nicht die Gefahr der Verwechslung von Vertretern dieser drei Substanzklassen bei der GC-Untersuchung.

Trennfaktoren

Besser als aus dem Vergleich von RRT-Werten ist die Lösung spezifischer Trennprobleme aus den Trennfaktoren abzulesen, den Quotienten aus den RRT-

TABELLE III
TRENNAKTOREN VERSCHIEDENER STERINPAARE

Sterinpaare	QF-1	Dexsil 300	SE-30	OV-17	OV-25	HI-EFF- 8BP	Silar 5CP	SP-1000
<i>C₂₉-Sterine</i>								
$\Delta 5$ /gesättigt	0.93	0.96	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.05
$\Delta 5/\Delta 5,7$	0.92	0.90	0.91	0.86	0.85	0.80	0.78	0.82
$\Delta 5/\Delta 5,24(28)E$	0.99	0.99	0.99	0.94	0.91	0.91	0.90	0.89
$\Delta 5/\Delta 5,24(28)Z$	0.97	0.97	0.97	0.91	0.88	0.87	0.86	0.84
$\Delta 5/\Delta 5,25$	1.05	1.05	1.04	0.98	0.96	0.95	0.92	0.93
$\Delta 5/\Delta 5,22,25$	1.16	1.22	1.19	1.08	1.05	1.03	1.01	1.01
$\Delta 5/\Delta 7$	0.90	0.87	0.89	0.86	0.84	0.83	0.81	0.82
$\Delta 5/\Delta 7,9$	0.94	0.91	0.94	0.88	0.87	0.86	0.82	0.83
$\Delta 5/\Delta 7,14$	0.97	0.96	0.98	0.94	0.90	0.90	0.86	0.86
$\Delta 5/\Delta 8,14$	0.99	0.97	0.98	0.94	0.90	0.90	0.88	0.89
$\Delta 5/\Delta 7,22$	1.05	0.99	1.00	0.96	0.95	0.95	0.91	0.90
$\Delta 5/\Delta 7,24(28)Z$	0.88	0.84	0.86	0.78	0.76	0.73	0.72	0.71
$\Delta 5/\Delta 7,24(25)$	0.82	0.80	0.83	0.74	0.74	0.72	0.69	0.70
$\Delta 5/\Delta 7,25$	0.95	0.91	0.92	0.84	0.82	0.79	0.76	0.76
$\Delta 5/\Delta 7,22,25$	1.03	1.03	1.03	0.89	0.87	0.85	0.82	0.81
$\Delta 5,22/\Delta 5,22,25$	0.98	1.05	1.04	0.95	0.92	0.88	0.87	0.88
$\Delta 5,24(28)E/\Delta 5,24(28)Z$	0.98	0.98	0.98	0.97	0.96	0.95	0.95	0.95
$\Delta 7$ /gesättigt	1.03	1.11	1.12	1.17	1.19	1.20	1.23	1.28
$\Delta 7/\Delta 7,24(28)Z$	0.97	0.97	0.97	0.92	0.90	0.88	0.88	0.86
$\Delta 7/\Delta 7,25$	1.05	1.05	1.03	0.98	0.97	0.95	0.94	0.93
$\Delta 7/\Delta 7,24(25)$	0.91	0.92	0.93	0.87	0.87	0.86	0.84	0.85
$\Delta 7,22/\Delta 7,22,25$	0.98	1.04	1.03	0.93	0.91	0.90	0.90	0.90
$\Delta 7,22/\Delta 5,25$	1.00	1.07	1.04	1.02	1.01	1.01	1.01	1.03
$\Delta 7,14/\Delta 8,14$	1.02	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.02	1.03
<i>C₂₉/C₂₈-Sterine</i>								
$\Delta 5/\Delta 7$ -Campesterin	1.10	1.05	1.10	1.05	1.04	1.01	0.98	1.00
$\Delta 5,22$ /Campesterin	1.03	1.05	1.09	1.08	1.08	1.04	1.05	1.05
<i>C₂₈-Sterine</i>								
$\Delta 5/24$ -Methylencholesterin	1.02	1.02	1.02	0.94	0.92	0.92	0.90	0.90
$\Delta 8(9)/\Delta 8(14)$	1.02	1.09	1.06	1.03	1.02	1.06	1.01	1.06

Werten zweier Sterine, die sich nur durch eine funktionelle Gruppe unterscheiden¹⁰. Die Summe der Trennfaktoren sich nicht beeinflussender Strukturmerkmale eines Sterins ist ein Mass für das Retentionsverhalten des Gesamtmoleküls. Im Vergleich mit der Summe der Trennfaktoren eines anderen Sterins gibt es Anhaltspunkte für die Trennmöglichkeit dieser beiden Substanzen, die besonders wertvoll sind zur Auf-
findung optimaler Bedingungen zur Trennung kritischer Paare. In der Tabelle III sind einige Trennfaktoren von Sterinpaaren zusammengestellt unter besonderer Berücksichtigung der in Pflanzen vorwiegend vorkommenden C₂₉-Sterine. Vor allem die Trennung des Sitosterins von anderen C₂₉-Sterinen ist von Interesse neben einigen anderen speziellen und schwierigen Trennproblemen. Die Trennbedingungen der C₂₈-Sterine auf den verschiedenen Säulen sind ähnlich wie bei den C₂₉-Sterinen.

Je mehr der Faktor von 1.00 abweicht, desto besser ist die Trennung. Sterinpaare, deren Trennfaktor um 0.05 über oder unter 1.00 liegt, lassen sich im allgemeinen noch trennen. Die Grenze 0.05 gilt für Säulen mit einer grossen Anzahl theoretischer Böden. Aus der Tabelle III lässt sich leicht ablesen, auf welchen Säulen bestimmte Trennprobleme am besten zu lösen sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Die relativen Retentionszeiten von 49 pflanzlichen Sterinen wurden als TMS-Äther auf 8 verschiedenen stationären Phasen bestimmt. Aus dem gaschromatographischen Verhalten der verschiedenen Doppelbindungstypen und anderer Konstitutionsmerkmale liessen sich Trenncharakteristiken ableiten. Weitere Anhaltspunkte für die Wahl einer stationären Phase zur optimalen Trennung kritischer Paare liefern die Trennfaktoren.

LITERATUR

- 1 R. B. Clayton, *Biochemistry*, 1 (1962) 357.
- 2 N. Ikekawa und R. Watanuki, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1139.
- 3 G. W. Patterson, *Anal. Chem.*, 43 (1971) 1165.
- 4 H. E. Nordby und St. Nagy, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 187.
- 5 B. A. Knights, in E. Heftmann (Editor), *Modern Methods of Steroid Analysis*, Academic Press, New York and London, 1973, S. 103.
- 6 J. A. Ballantine, J. C. Roberts und R. J. Morris, *J. Chromatogr.*, 103 (1975) 289.
- 7 T. Itoh, T. Tamura, S. Ogawa und T. Matsumoto, *Steroids*, 25 (1975) 729.
- 8 A. Seher und H. Vogel, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 78 (1976) 106.
- 9 E. Homberg und A. Seher, *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.*, 148 (1972) 133.
- 10 R. B. Clayton, *Nature (London)*, 192 (1961) 524.
- 11 A. Kuksis, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 75 (1973) 420.
- 12 E. Heftmann, *Lloydia*, 38 (1975) 195.
- 13 E. C. Horning, E. O. A. Haahti und W. J. A. Vandenheuvel, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38 (1961) 625.
- 14 R. G. Mathews, R. D. Schwartz, C. D. Pfaffenberger, S.-N. Lin und E. C. Horning, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 51.
- 15 W. J. A. Vandenheuvel, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 85.