

CHROM. 18 675

## Note

### Dünnschicht-, Säulen- und Hochleistung-Flüssigkeitschromatographischer Auftrennung pflanzlicher Sterole an alkylsilylierten Kieselgelen

A. HIERMANN\* und K. MAYR

Institut für Pharmakognosie, Universität Graz, Universitätsplatz 4, A-8010 Graz (Austria)

(Eingegangen am 12. März 1986; geänderte Fassung eingegangen am 22. März 1986)

Über die Auftrennung und Quantifizierung pflanzlicher Sterole wird in der Literatur eingehend berichtet. In diesem Zusammenhang sei auf die umfassende Darstellung von Görög<sup>1</sup> verwiesen. Von den chromatographischen Methoden werden dabei vornehmlich Dünnschicht- (DC), Gas- (GC) und Hochleistung-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Die DC-Auftrennung der Phytosterole erfolgt im allgemeinen an imprägniertem (Paraffin<sup>2</sup>, AgNO<sub>3</sub><sup>3</sup>, Formamid<sup>4</sup>) Kieselgel sowie MgO<sup>5</sup>. Während in der Literatur über die DC-Auftrennung von Steroidhormonen an alkylsilylierten und NH<sub>2</sub> gebundenen Kieselgelschichten berichtet wird<sup>6,7-8</sup>, fanden wir über eine geeignete SC- und DC-Auftrennung pflanzlicher Sterole an RP-18 Schichten keine Hinweise. In der vorliegenden Arbeit wird über die DC- und Säulenchromatographische (SC)-Auftrennung pflanzlicher Sterole an RP-18 Schichten sowie deren Quantifizierung durch Remissionsmessung *in situ* berichtet. Da für die HPLC-Auftrennung pflanzlicher Sterole hauptsächlich RP-18 Säulen<sup>9,10</sup> verwendet werden, sollen auch Möglichkeiten zur Trennung dieser Verbindungen an RP-8 Säulen aufgezeigt werden.

#### MATERIAL UND METHODEN

##### *Dünnschichtchromatographie*

Die DC-auftrennung der freien Sterole (Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol, Ergosterol,  $\beta$ -Sitosterol und Cholesterol) erfolgt an RP-18 Schichten (Merck, Art. Nr. 13724) in Form der Durchlaufchromatographie nach Truter<sup>11</sup>. Zum Abdunsten des Fliessmittels ragt die DC-Platte (10 × 10 cm) einen Zentimeter aus der Entwicklungskammer. Die Abdeckung wird mit einem dem Querschnitt der DC-Platte entsprechenden Schlitz versehen. Als Fliessmittel dient *n*-Hexan gesättigt mit Acetonitril. Probelösung, authentische Vergleichssubstanzen und ein Testfarbstoffgemisch (Merck, Art. Nr. 9353) werden einen Zentimeter vom unteren Plattenrand aufgetragen. Die Platten werden solange entwickelt, bis der deutlich sichtbare Farbstoff Sudanrot *ca.* 3,5 cm vom Startpunkt entfernt ist. Die Entwicklungszeit beträgt ungefähr 80 min. Nach Vertreibung des Fliessmittels wird für die qualitative Analyse mit Liebermann-Burchard Reagens detektiert. Die Empfindlichkeit liegt bei *ca.* 0,3  $\mu$ g. Bei Betrachten im sichtbaren und UV-Licht (366 nm) erscheinen die Flecken blaugrau bis braunviolett. Die quantitative Analyse erfolgt durch Remissionsmes-

sung *in situ*. Dazu werden die entwickelten Chromatogramme kurz in Perchlorsäure-Naphtochinonsulfonsäure Reagens (0,22 g 1,2-Naphtochinon-4-sulfonsäure-Na, 44 ml Wasser, 50 ml Perchlorsäure 60% und 6 ml Formaldehyd 33% auf 1000 ml Äthanol aufgefüllt)<sup>12</sup> getaucht und eine Stunde im Vakuumtrockenschrank bei 70°C erhitzt. Anschliessend werden die interessierenden Sterolflecken (blau-braunviolett) bei 500 nm für Brassicasterol, 575 nm für Campesterol, 560 nm für Stigmasterol, 505 nm für Ergosterol, 610 nm für  $\beta$ -Sitosterol und 615 nm für Cholesterol densitometrisch vermessen. An Hand der zu erstellenden Eichkurven im Bereich von 0,1–1,7  $\mu\text{g}$  pro Substanz werden die Gehalte ermittelt. Die DC-Auftrennung der freien Sterole ist in Fig. 1 dargestellt.

### Säulenchromatographie

Eine präparative Auftrennung des kritischen Paares  $\beta$ -Sitosterol und Campesterol konnte an RP-18 LiChroprep-Säule erzielt werden. Dazu werden *ca.* 20 mg eines Gemisches von  $\beta$ -Sitosterol und Campesterol in 4 ml *n*-Hexan gesättigt mit Acetonitril in Lösung gebracht und unter Verwendung von *n*-Hexan gesättigt mit Acetonitril als mobile Phase über eine LiChroprep-Säule geschickt. Die Bereitung der Säule erfolgte durch Suspendierung von LiChroprep 40–63  $\mu\text{m}$  (Merck, Art. Nr. 13900) in *n*-Hexan gesättigt mit Acetonitril und anschliessendes Einschlämmen in die Glassäule (diameter 1,5 cm) bis zu einer Höhe von 22 cm. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 0,5 ml/min erschien  $\beta$ -Sitosterol im Fraktionsbereich 40–50 ml und Campesterol bei 60–80 ml.

### HPLC

Neben den bei der DC aufgeführten freien Sterolen wurden auch die Propionsäure-, Capronsäure-, Caprylsäure-, Caprinsäure- und Palmitinsäureester des  $\beta$ -Sitosterols und Campesterols mittels HPLC an RP-8 Säulen aufgetrennt. Die Auftrennung der freien Sterole erfolgte unter den nachstehenden Bedingungen. RP-8 Säule (Seibersdorf), 7  $\mu\text{m}$ , 25  $\times$  0,5 cm; Acetonitril-Isopropanol-Wasser (50:25:25); Durchflussrate 1,5 ml/min; Detektion bei 213 nm; Probelösung 3 mg pro Substanz/ml in Isopropanol; Einspritzvolumen 20  $\mu\text{l}$ . Die  $k'$ -Werte der aufgetrennten freien Sterole sind in Fig. 2 aufgezeigt.

Zur Auftrennung der  $\beta$ -Sitosterol- und Campesterolester wurden die HPLC-Bedingungen modifiziert. RP-8 Säule (Knauer), 5  $\mu\text{m}$ , 25  $\times$  0,5 cm; Tetrahydrofuran-Acetonitril-Isopropanol-Wasser (68:66:33:33); Durchflussrate 1,3 ml/min; Detektion 213 nm; Probelösung 3 mg pro Substanz/ml in *n*-Hexan; Einspritzvolumen 20  $\mu\text{l}$ . Die  $k'$ -Werte sind der Fig. 3 zu entnehmen.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei Verwendung von RP-18 Schichten gelingt eine gute DC-Auftrennung (Fig. 1) der häufig vorkommenden, pflanzlichen Sterole  $\beta$ -Sitosterol ( $hR_{\text{St}}$  174,8), Stigmasterol (162,0), Campesterol (149,1), Brassicasterol (138,8), Cholesterol (131,1) und Ergosterol (77,1), die üblicherweise nur an imprägnierten Kieselgelschichten erfolgt. Das Wegfallen der Imprägnierung erweist sich dabei als vorteilhaft. Eine quantitative densitometrische Auswertung nach Behandlung mit Perchlorsäure-Naphtochinonsulfonsäure ist im Bereich von 0,1–1,8  $\mu\text{g}$  möglich. Die im experimentellen Teil an-

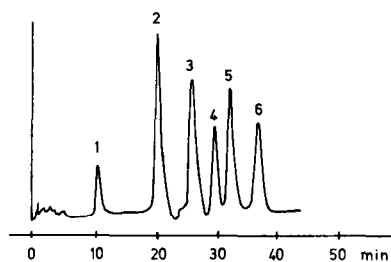
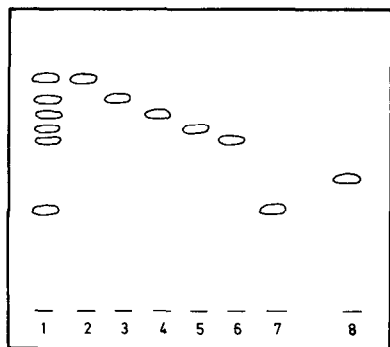


Fig. 1. DC-Auftrennung der freien Sterole an RP-18 Schicht. Gemisch 2-7 (1),  $\beta$ -Sitosterol (2), Stigmasterol (3), Campesterol (4), Brassicasterol (5), Cholesterol (6), Ergosterol (7), Testfarbstoffgemisch (8). Fliessmittel: *n*-Hexan gesättigt mit Acetonitril; Detektion: Liebermann-Burchard; Durchlaufentwicklung.

Fig. 2. HPLC-Auftrennung der freien Sterole an RP-8 Säule.  $k' = 7,75$ , Brassicasterol (1);  $k' = 9,66$ , Ergosterol (2);  $k' = 12,66$ , Cholesterol (3);  $k' = 14,66$ , Campesterol (4);  $k' = 16,0$ , Stigmasterol (5);  $k' = 18,53$ ,  $\beta$ -Sitosterol (6). Stationäre Phase: RP-8 (Seibersdorf) Säule  $7 \mu\text{m}$  ( $25 \times 0,5 \text{ cm}$ ); mobile Phase: Acetonitril-Isopropanol-Wasser (50:25:25); Durchflussrate: 1,5 ml/min; Detektion: 213 nm.

gegebenen Absorptionsmaxima wurden durch Aufnahme der Absorptionsspektren in situ ermittelt. Die relative Standardabweichung der Bestimmung beträgt  $\pm 2,8\%$  ( $n = 10$ ).

Da handelsübliches  $\beta$ -Sitosterol sehr oft mit Campesterol (bis zu 40%) verunreinigt ist, untersuchten wir die Möglichkeit der SC zur Trennung dieser beiden Verbindungen. Durch Anwendung von RP-18 LiChroprep als Adsorbens gelingt diese präparative Trennung unter den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen ohne größeren Zeitaufwand. Das dabei gewonnene  $\beta$ -Sitosterol zeigte die charakteristischen Spektraldaten.

Die Ergebnisse der HPLC-Auftrennung der freien Sterole sowie der aufgeführten Campesterol- und  $\beta$ -Sitosterolester sind in den Fig. 2 und Fig. 3 veranschaulicht.

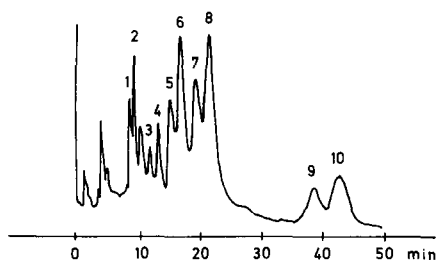


Fig. 3. HPLC-Auftrennung der Sterolester an RP-8 Säule.  $k' = 3,37$ , Campesterolpropionat (1);  $k' = 3,75$ ,  $\beta$ -Sitosterolpropionat (2);  $k' = 4,87$ , Campesterolcaproat (3);  $k' = 5,37$ ,  $\beta$ -Sitosterolcaproat (4);  $k' = 6,12$ , Campesterolcaprylat (5);  $k' = 6,75$ ,  $\beta$ -Sitosterolcaprylat (6);  $k' = 7,75$ , Campesterolcaprat (7);  $k' = 8,50$ ,  $\beta$ -Sitosterolcaprat (8);  $k' = 15,25$ , Campesterolpalmitat (9);  $k' = 17,25$ ,  $\beta$ -Sitosterolpalmitat (10). Stationäre Phase: RP-8 (Knauer) Säule  $5 \mu\text{m}$  ( $25 \times 0,5 \text{ cm}$ ); mobile Phase: Tetrahydrofuran-Acetonitril-Isopropanol-Wasser (68:66:33:33); Durchflussrate: 1,3 ml/min; Detektion: 213 nm.

licht. Sie zeigen, daß auch RP-8 Säulen zur Auftrennung dieser apolaren Verbindungen geeignet sind. Die  $k'$ -Werte der Sterolester erhöhen sich dabei mit zunehmender Kettenlänge der Säuren, wobei die Campesterolester vor den entsprechenden Sitossterolestern eluiert werden.

#### LITERATUR

- 1 S. Görög, *Quantitative Analysis of Steroids*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1983, p. 247.
- 2 N. J. De Souza und W. R. Nes, *J. Lipid Res.*, 10 (1969) 240.
- 3 R. Ikan und M. Cudzinovski, *J. Chromatogr.*, 18 (1965) 422.
- 4 H. E. Nordby und S. Nagy, *J. Chromatogr.*, 79 (1973) 147.
- 5 Th. Kartnig und G. Mikula, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 537.
- 6 E. von Arx und M. Faupel, *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 68.
- 7 U. A. Th. Brinkman und G. de Vries, *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 5 (1982) 476.
- 8 G. Grassini-Strazza und I. Nicoletti, *J. Chromatogr.*, 322 (1985) 149.
- 9 E. Heftmann and J. R. Hunter, *J. Chromatogr.*, 165 (1979) 283.
- 10 H. H. Rees, P. L. Dounahey und T. Goodwin, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 281.
- 11 E. V. Truter, *J. Chromatogr.*, 14 (1964) 57.
- 12 R. Wintersteiger und G. Gübitz, *Sci. Pharm.*, 46 (1978) 269.