

Nachweis von Sterinen mit Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens auf Kieselgelschichten*

Das sehr empfindliche Phosphormolybdänsäure-Reagens zur Sichtbarmachung von Lipoiden hat bei der Auftrennung von ungereinigten oder teilweise gereinigten Lipoidextrakten den Nachteil, dass es relativ unspezifisch ist und keine selektiven Farbreaktionen mit einzelnen Verbindungsklassen zeigt¹. Antimon(III)chlorid, das vielfach zum Nachweis von Steroiden herangezogen wird²⁻⁶ und dessen Nachweisgrenze für Cholesterin im entwickelten Chromatogramm in derselben Grössenordnung liegt wie die des Phosphormolybdänsäure-Reagens, gibt auch eine positive Reaktion mit anderen fettlöslichen Verbindungen, besonders mit Carotinoiden und Vitamin A^{7,8}. Die in der Dünnschicht-Chromatographie zur Anwendung kommenden anorganischen Adsorbentien machen auch die Verwendung aggressiver Reagentien mit anschliessendem Erhitzen zur Identifizierung von Substanzen möglich. Auf dem Steroidgebiet sind ausser dem LIEBERMANN-BURCHARD-Reagens 70%ige Perchlorsäure oder 98%ige Schwefelsäure⁹, 50%ige Schwefelsäure¹⁰, Kaliumbichromat-Schwefelsäure¹¹ und Chlorsulfonsäure-Eisessig^{5,6,12,13} zum Nachweis verwendet worden. Die Empfindlichkeit der Farbreaktion dieser Reagentien ist jedoch nur für Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure und Chlorsulfonsäure-Eisessig ausserordentlich gross.

In diesem Laboratorium wurde zum Nachweis von Sterinen in Dünnschicht-Chromatogrammen mit Erfolg das von ADAMS¹⁴ für histologische Zwecke entwickelte Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens verwendet. Dieses Reagens zeigt zwar wie das Vanillin-Schwefelsäure-Reagens mit Sterinen im U.V.-Licht keine Fluoreszenz, hat aber den Vorteil:

- (a) dass es mit 3β -Hydroxy-5-en- und 3β -Hydroxy-5,7-dien-Sterinen und ihren Estern eine spezifische Blaufärbung von starker Intensität ergibt,
- (b) dass die Reaktion ausserordentlich empfindlich ist,
- (c) dass andere in Lipoidextrakten auftretende Verbindungen diese Blaufärbung nicht zeigen,
- (d) dass der Farbton für längere Zeit beständig ist, wenn die Platten in einem Exsikkator über einem Trockenmittel aufbewahrt werden,
- (e) und dass das Reagens selbst für einige Wochen haltbar ist.

Fig. 1 zeigt an Hand von Cholesterin einen Vergleich der Empfindlichkeit des Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens mit der gebräuchlicher empfindlicher Sprühreagentien für Steroide. Wie zu erkennen ist, liegt die Nachweisgrenze von Cholesterin mit Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens (III) im entwickelten Chromatogramm bei $0.03 \mu\text{g}$. Diese hohe Empfindlichkeit wird von 40% Orthophosphorsäure nur bei Nachbehandlung mit Phosphormolybdänsäure (I) erreicht. TSCHESCHE UND SNATZKE¹³ geben als Nachweisgrenze für Cholesterin mit Chlorsulfonsäure-Eisessig $0.025 \mu\text{g}$ an. Der Nachweis von Cholesterin mit den anderen untersuchten Reagentien scheint etwas weniger empfindlich zu sein. Für Antimon(III)chlorid-Eisessig (II) liegt die Nachweisgrenze mit $0.05 \mu\text{g}$ in demselben Bereich, den auch SNATZKE⁶ für das Anfärbeverfahren von Cholesterin mit Antimon(III)chlorid und

* Mit Unterstützung der National Science Foundation, Research Grant GB 1084, und aus Mitteln, die der Purdue University von der Indiana Elks Association für Krebsforschung gestiftet wurden.

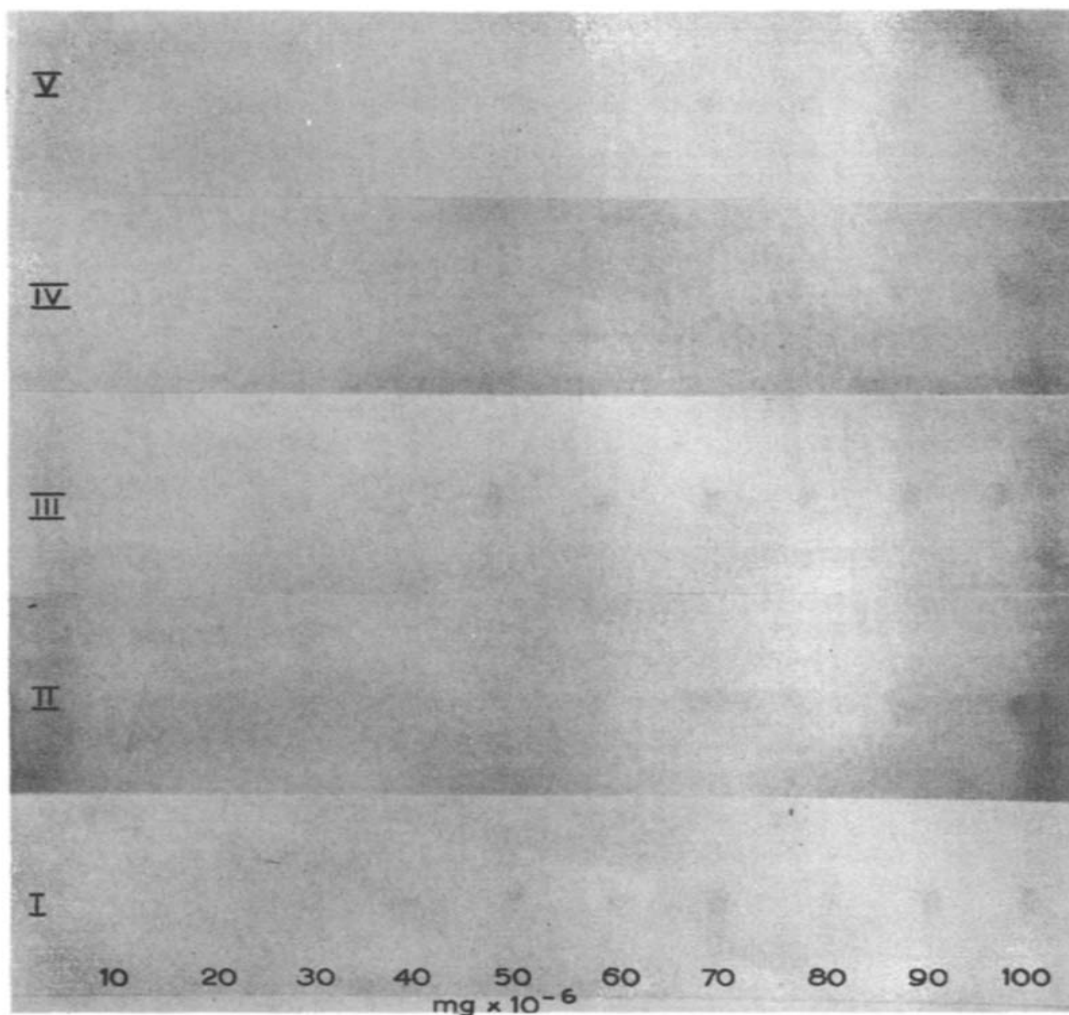


Fig. 1. Nachweisgrenze verschiedener Sprühreagentien für Cholesterin im entwickelten Chromatogramm. Adsorbens: Aktive Kieselgel G-Schichten nach den Standardbedingungen bereitet. Fliessmittel: Chloroform-Aceton (80:20). Laufzeit: 30 Min. R_F -Wert: 0.53. Anfärbung: I = 40% Orthophosphorsäure, nachbehandelt mit 1.5% alkoholischer Phosphormolybdänsäure; II = Antimon(III)chlorid-Eisessig; III = Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens; IV = Vanillin-Schwefelsäure; V = Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure.

Antimon(V)chlorid in Chloroform feststellte. BENNETT UND HEFTMANN¹⁰ geben als Nachweisgrenze für Sterine mit 50%iger Schwefelsäure 0.1 μg , DAVIDEK UND BLATTNA⁹ für Vitamin D₂ mit 70%iger Perchlorsäure 3 μg an.

Auf Grund seiner Spezifität und grossen Empfindlichkeit gelang es, mit dem Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens geringe Mengen Sterin in Lipoidextrakten, die in dem Lösungsmittelgemisch von WAGNER *et al.*^{15,16} chromatographiert worden waren, einwandfrei zu identifizieren. In diesem Fliessmittel wandern die schwach polaren Sterine dicht unter der Lösungsmittelfront. Der R_F -Wert betrug im Mittel aus 21 Trennungen 0.92. Von den mit der Front wandernden Neutralfetten liessen sich die Sterinflecken sicher unterscheiden, da Triglyceride mit dem Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens eine Braunfärbung ergeben. Natürliche Lecithine und Kephaline zeigen gelbe bis braune Farbtöne, während synthetisches β,γ -Dipalmitoyl-L- α -lecithin (Sigma Chemical Company) völlig farblos bleibt. Auch bei Auftrennung

von Lipoidextrakten in weniger polaren Fließmitteln erscheinen auf mit dem Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens besprühten Platten lediglich die Sterine als blaue Flecken. Freie Fettsäuren bleiben farblos oder zeigen eine schwache Gelb- bis Braunfärbung und auch Glyceride erscheinen gelb bis braun.

Methodik

Herstellung des Reagenses. 100 mg 1,2-Naphthochinon-2-sulfonsäure werden in 100 ml eines Gemisches Äthanol-60% Perchlorsäure-40% Formaldehyd-Wasser (2:1:0.1:0.9, V/V) gelöst.

Anwendung. Nach dem Chromatographieren werden die Platten getrocknet, um das Fließmittel aus den Schichten zu entfernen. Dann wird mit dem Reagens besprüht bis die Schichten gleichmässig durchfeuchtet sind. Durch anschliessendes Erhitzen bei 70–80° werden die Sterine sichtbar gemacht. Während des Erhitzens beobachtet man die Farbtöne. Die Sterinflecken erscheinen zuerst rosa. Bei weiterem Erhitzen vertieft sich der Farbton und geht allmählich in blassblau und dunkelblau über. Wird zu lange erhitzt, werden die Flecken braunschwarz. Die Geschwindigkeit der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, um so schneller verläuft die Entwicklung. Temperaturen über 100° sollten möglichst ver-

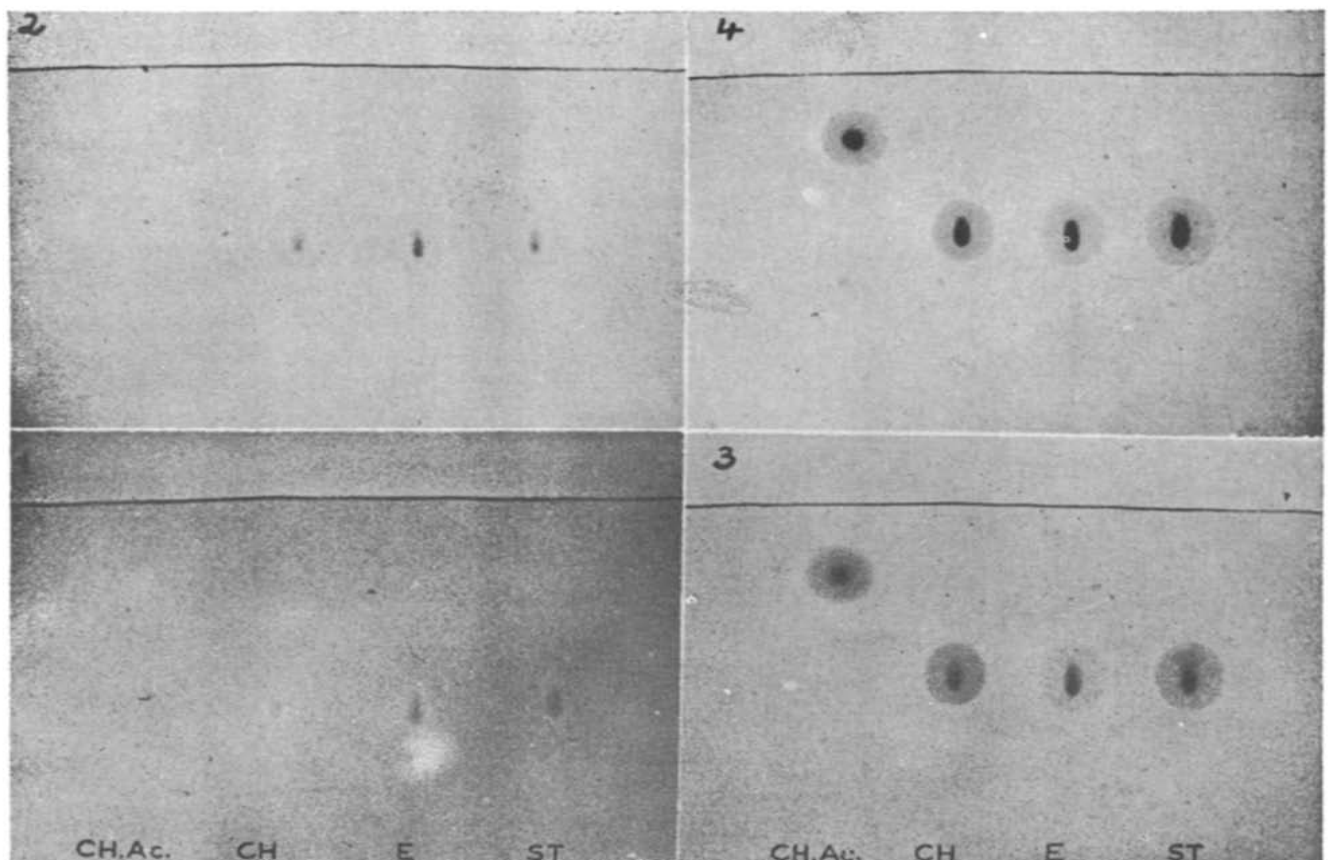


Fig. 2. Farbentwicklung verschiedener Sterine mit Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens im entwickelten Chromatogramm. Adsorbens: Aktive Kieselgel G-Schicht nach den Standardbedingungen bereitet. Fließmittel: Chloroform-Aceton (80:20). Laufzeit: 30 Min. Aufgetragen: je 50 µg CH. Ac. = Cholesterylacetat ($R_F = 0.81$); CH. = Cholesterin ($R_F = 0.52$); E. = Ergosterin ($R_F = 0.51$); ST. = Stigmasterin ($R_F = 0.52$).

TABELLE I

FARBENTWICKLUNG VERSCHIEDENER STERINE MIT PERCHLORSÄURE-NAPHTHOCHINON-REAGENS

Sterin	Nach 15 Min.	Nach 30 Min.	Nach 45 Min.	Nach 60 Min.
Ergosterin	tief rosa, bereits schwache Blaufärbung	tief blau	braunschwarz	tief braunschwarz
Stigmasterin	rosa	tief rosa, beginnende schwache Blaufärbung	blau	tief blau
Cholesterin	schwach rosa	rosa	tief rosa mit blauer Färbung	blau
Cholesterylacetat	kaum sichtbar	schwach rosa	tief rosa mit schwacher Blaufärbung	blassblau

mieden werden, da sonst der Übergang der Färbung in braunschwarz so schnell verläuft, dass die rosa und blauen Farbtöne kaum noch registriert werden können.

Fig. 2 veranschaulicht die Farbentwicklung von drei Sterinen und einem Sterinester mit Perchlorsäure-Naphthochinon-Reagens in einem Chromatogramm, das nach dem Besprühen bei 60° erhitzt und in Zeitabständen von 15 Min. photographiert wurde (Tabelle I).

Laboratory for Plant and Cell Physiology, Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, Lafayette, Ind. (U.S.A.)

E. RICHTER*

- 1 H. P. KAUFMANN UND Z. MAKUS, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 62 (1960) 1014.
- 2 R. ZELNIK UND L. M. ZITI, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 371.
- 3 T. GOLAB UND D. S. LAYNE, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 321.
- 4 R. TSCHESCHE UND G. LIPP, *Ann.*, 615 (1958) 210.
- 5 R. TSCHESCHE, W. FREYTAG UND G. SNATZKE, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 3053.
- 6 G. SNATZKE, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 110.
- 7 F. H. CARR UND E. A. PRICE, *Biochem. J.*, 20 (1926) 497.
- 8 V. E. LEVINE UND E. RICHMAN, *J. Biol. Chem.*, 101 (1953) 373.
- 9 J. DAVIDEK UND J. BLATNA, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 204.
- 10 R. D. BENNETT UND E. HEFTMANN, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 359.
- 11 E. HAAHTI UND T. NIKKARI, *Acta Chem. Scand.*, 17 (1963) 536.
- 12 R. TSCHESCHE, F. LAMPERT UND G. SNATZKE, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 217.
- 13 R. TSCHESCHE UND G. SNATZKE, *Ann.*, 636 (1960) 105.
- 14 C. W. M. ADAMS, *Nature*, 192 (1961) 331.
- 15 H. WAGNER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 63 (1961) 1119.
- 16 H. WAGNER, L. HÖRHAMMER UND P. WOLFF, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 175.

Eingegangen den 24. August 1964

* Gegenwärtige Anschrift: Sierichstrasse 72, 2000 Hamburg 39, Deutschland.