

# High-Performance Liquid Chromatographic Method with Evaporative Light Scattering Detection for Ceramides Analysis

J. S. Kim, J. H. Yang, S. W. Kim, Y. H. Lee

Doosan Corporation Biotech Business Unit, Quality Assurance Team, Iksan-City, R.O. Korea

Application of ceramides is popular in cosmetics and in dermatopharmacy. Ceramides present within the intercellular lipid lamellae of the stratum corneum have an important structural function in the water permeability barrier of the skin [1]. The aim of this study was to develop a simple, reliable HPLC/ELSD method for the routine analysis of ceramides: N-stearoylphyto-sphingosine(III) and N-oleoylphyto-sphingoside(IIIB). After a simple sonication step, ceramides were directly and effectively separated by HPLC-method. Two mobile phases with isocratic mode were compared and the evaporative light scattering detection (ELSD) was used, because the detection using ultraviolet absorption is insensitive. The silica column eluted ceramides through two mobile systems at a flow-rate of 1.0 ml/min: using Hexan : Chloroform : Methanol [76:20:4] with optimized ELSD condition (Temperatur 70 °C, gas flow 2.0) and Hexan:2-Propanol [85:15] with Temperatur 75 °C and gas flow 1.75. The Hexan/2-propanol phase was recommended because of the Peak resolution. Ceramides were successfully determined approximately with 10 min by this system. The Method was optimized for reproducibility, linearity range, and limit of detection.

## References

1. Zhou JY, Chaminade P, Gaudin K, Prognon P, Baillet A, Ferrier D (1999) *J Chromatogr A* 859: 99

## Bestimmung von Glucoraphanin und Glucoiberin sowie ihrer Abbauprodukte in Rotkohl

M. Meyer und S. T. Adam  
Institut für Chemie und Biologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

Tierexperimentelle Studien [1] und Untersuchungen an Zellkulturen [2] haben gezeigt, dass Sulforaphan, ein Abbauprodukt von Glucoraphanin, krebspräventive Wirkungen verursachen kann. Broccoli des deutschen Marktes enthält Glucoraphanin als Hauptkomponente der alkylsubstituierten Glucosinolatreihe und nur sehr geringe

Mengenanteile an Progoitrin, Glucoiberin und Sinigrin. Rotkohl hingegen enthält neben beträchtlichen Mengen an Glucoraphanin auch vergleichsweise hohe Konzentrationen von Glucoiberin, Progoitrin, Glucoerucin und Sinigrin.

Die Bestimmung dieser Glucosinolate erfolgt in der Regel nach enzymatischer Abspaltung der Sulfatgruppe unter Bildung der korrespondierenden Desulfoglucosinolate und HPLC-Trennung an einer Okta-decylumkehrphase, wobei Glucotropaolin als interer Standard dient [3]. Für die Paare Glucoraphanin/Sinigrin und Glucoiberin/Progoitrin werden gelegentlich Peaküberlappungen beobachtet, die eine präzise quantitative Zuordnung beeinträchtigen. Kommerzielle Vergleichsproben hoher Reinheit stehen nicht zur Verfügung, so dass empfohlene UV-Detektor-Reponsefaktoren zur Berechnung der Gehalte herangezogen werden müssen [3].

Die Richtigkeit der Gehaltswerte kann überprüft werden, wenn die blanchierten und gefriergetrockneten Rotkohlproben mit Hilfe von Myrosinase hydrolysiert und die entstandenen Produkte nach Extraktion mit Dichlormethan gaschromatographisch erfasst werden. Sulforaphan wird als Produkt von Glucoraphanin und Methylsulfinylbutylisothiocyanat als Produkt von Glucoiberin basisliniengetrennt nachgewiesen. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass Sulforaphan als authentische Reinsubstanz im Handel zur Verfügung steht und deshalb eine präzise Gehaltsbestimmung durch chromatographischen Vergleich möglich ist. Für Methylsulfinylpropylisothiocyanat kann mit guter Näherung der FID-Responsfaktor von Sulforaphan übernommen werden.

Der Gehalt an Glucoraphanin einer Rotkohlprobe konventioneller Herkunft, die im August 2002 bezogen wurde, betrug 23,0 mmol/kg Trockensubstanz (TS) und der Gehalt an Sulforaphan 20,1 mmol/kg TS. Für Glucoiberin wurde ein Wert von 10,9 mmol/kg TS und für das korrespondierende Abbauprodukt ein Gehalt von 8,7 mmol/kg TS ermittelt. Die um 13% bzw. 20% niedrigeren Werte für die Hydrolyseprodukte der Präkursoren sind so gering, dass auf eine nahezu vollständige Umsetzung zu den Isothiocyanato-Produkten geschlossen werden kann.

## Literatur

1. Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3147.
2. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2399.
3. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, Nr. L 170/28, 3.7.90.