

262. Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie auf Steroide

von M. Barbier, Horst Jäger, H. Tobias und E. Wyss

(23. IX. 59)

In den letzten Jahren ist die Adsorptionschromatographie an aktiviertem Al_2O_3 oder Silicagel zu analytischen Methoden ausgearbeitet worden, welche die Trennung sehr kleiner Mengen von Substanzgemischen in die einzelnen Komponenten erlaubt. In Anlehnung an die in der Papierchromatographie gesammelten Erfahrungen wurden zu diesem Zwecke zunächst Filtrierpapierstreifen mit Al_2O_3 oder Silicagel imprägniert¹⁾. Später wurde dazu übergegangen, das Adsorptionsmittel vermischt mit Gips²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ oder Stärkekleister⁵⁾⁶⁾⁷⁾ in dünner Schicht auf Glasplatten aufzuziehen.

Im Laufe synthetischer Arbeiten hatten wir Gelegenheit, diese sogenannte Dünnschicht-Chromatographie auf Steroide anzuwenden. Wir erhielten dabei zum Teil sehr gute Resultate, indem sie vor allem mit sehr schwach polaren Steroiden Trennungen erlaubte, die uns bisher im Papierchromatogramm nicht gelangen. Für den Nachweis der Steroide haben sich das Besprühen mit SbCl_3 -Lösung in Chloroform⁸⁾, saurer Dinitrophenylhydrazin-Lösung⁹⁾ (im Falle von Ketonen) oder Phosphormolybdänsäure¹⁰⁾ bewährt.

Für die Dünnschicht-Chromatographie schwach polarer Steroide haben wir bisher ausschliesslich Kieselgel vermischt mit Gips³⁾¹¹⁾ verwendet. Als Fließmittel haben sich Essigester-Cyclohexan-Gemische bewährt, wobei sich das Verhältnis der Polarität des zu untersuchenden Gemisches anzupassen hat. Die Herstellung und Aktivierung der Platten ist im experimentellen Teil beschrieben. Beispiele von Trennungen, die auf diese Weise erhalten wurden, sind in der Tabelle und in den Fig. 1 und 2 zusammengestellt. – Für die Trennung von Cholsäure und Desoxycholsäure hat sich eine Platte hergestellt nach REITSEMA⁶⁾ mit Essigester als Fließmittel gut bewährt. Für Cholsäure wurde dabei ein R_f -Wert¹²⁾ von $0,32 \pm 0,01$ und für Desoxycholsäure ein solcher von $0,62 \pm 0,03$ erhalten.

¹⁾ J. E. MEINHARD & N. F. HALL, *Analyt. Chemistry* **21**, 185 (1948); J. G. KIRCHNER & G. J. KELLER, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 1867 (1950); I. E. BUSH, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952).

²⁾ E. STAHL, *Pharmazie* **11**, 633 (1956).

³⁾ E. STAHL, *Chemiker Zeitung* **82**, 323 (1958).

⁴⁾ E. STAHL, *Parfümerie Kosmetik* **1958**, Heft 9.

⁵⁾ R. A. BERNHARD, *Nature* **182**, 1171 (1958).

⁶⁾ R. H. REITSEMA, *Analyt. Chemistry* **26**, 960 (1954).

⁷⁾ L. H. BRYANT, *Nature* **175**, 556 (1955); E. DEMOLE, *J. Chromatography* **1**, 24 (1958), vgl. auch *Chromat. Review* **1**, 1 (1959).

⁸⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **34**, 2278 (1951); D. F. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952).

⁹⁾ L. R. AXELROD, *J. biol. Chemistry* **205**, 173 (1952).

¹⁰⁾ D. KRITCHEVSKY & M. R. KIRK, *Arch. Biochemistry Biophysics* **35**, 346 (1951).

¹¹⁾ Die fertige Mischung wurde bei der Firma MERCK AG., Darmstadt (Kieselgel G nach STAHL für Dünnschicht-Chromatographie) bezogen.

¹²⁾ In Anlehnung an die bei der Papierchromatographie üblichen Symbole wird mit R_f das Verhältnis der Laufstrecke der Substanz zur Laufstrecke des Lösungsmittels bezeichnet.

Die Zuordnung und Unterscheidung der Substanzen erstreckt sich nicht nur auf die Laufstrecke. Die verschiedenen Farbnuancen, die mit SbCl_3 in sichtbarem und UV.-Licht erhalten wurden, erlauben es, Substanzen mit sehr nahe beieinander liegenden Laufgeschwindigkeiten zu unterscheiden. Obwohl z. B. die Substanzen 1

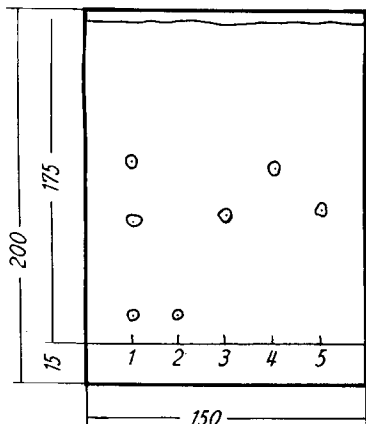


Fig. 1. Beispiel der analytischen Trennung von fünf Steroid-Derivaten auf Kieselgel-G-Platten System: Essigester: Cyclohexan (30:70); Laufzeit 2 Std.; Entwicklung mit SbCl_3

- 1: 0,10 mg Gemisch der Substanzen 8, 9 und 10, Tab. 1.
- 2: 0,05 mg $3\beta, 12\beta$ -Dihydroxy-5 β -ätiansäure-methylester (8, Tab. 1).
- 3: 0,05 mg 3β -Acetoxy-12 β -hydroxy-5 β -ätiansäure-methylester (9, Tab. 1).
- 4: 0,05 mg $3\beta, 12\beta$ -Diacetoxy-5 β -ätiansäure-methylester (10, Tab. 1).
- 5: 0,05 mg $3\beta, 12\beta$ -Diacetoxy-14 β -hydroxy-5 β -ätiansäure-methylester (11, Tab. 1).

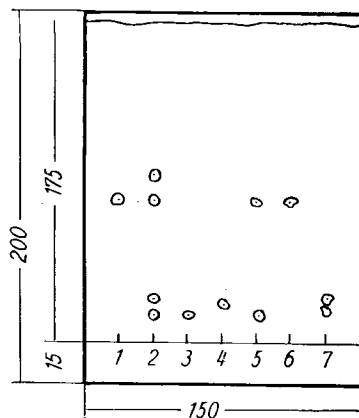


Fig. 2. Beispiel der analytischen Trennung eines Reaktionsgemisches auf Kieselgel-G-Platte System: Essigester: Cyclohexan (30:70); Laufzeit 2 Std.; Entwicklung mit SbCl_3

- 1: 0,05 mg 3β -Acetoxy-5 β -ätien-(8,14)-säure-methylester (2, Tab. 1).
- 2: 0,10 mg neutrales Rohprodukt aus Benzopersäureoxydation eines Gemisches von 3β -Acetoxy-5 β -ätien-(8,14)-säuremethylester (2, Tab. 1) und 3β -Acetoxy-5 β -ätien-(14,15)-säure-methylester (1, Tab. 1).
- 3: 0,05 mg 3β -Acetoxy-14,15 α -oxido-5 β -ätiansäure-methylester (5, Tab. 1).
- 4: 0,05 mg 3β -Acetoxy-8,14 α -oxido-5 β -ätiansäure-methylester (6, Tab. 1).
- 5: Gemisch von je 0,05 mg 5 und 3, Tab. 1.
- 6: 0,05 mg 3β -Acetoxy-5 β -ätiansäure-methylester (3, Tab. 1).
- 7: Gemisch von je 0,05 mg 5 und 6, Tab. 1.

und 2 oder 1 und 3 der Tab. 1 den gleichen R_f -Wert zeigen, können sie, wenn sie als Gemisch vorliegen, auf Grund der unterschiedlichen Entwicklung der Farbreaktion mit SbCl_3 , deutlich getrennt erkannt werden. Die relativ grossen Fehlerbreiten der Laufstrecken machen es notwendig, dass dieselben auf eine geeignete Standardsubstanz bezogen werden.

Wir danken Herrn Prof. T. REICHSTEIN, unter dessen Leitung die Arbeit ausgeführt wurde, für die Förderung des Problems und Herrn Dr. O. SCHINDLER für seine Unterstützung bei der experimentellen Durchführung und die Hilfe bei der Abfassung des Manuskriptes.

Experimentelles. – Als Trägerplatten dienten solche aus 5 mm dickem Pyrex-Glas, 15×20 cm. Die Platten wurden auf einer möglichst horizontalen Unterlage mit dem Brei bestrichen, der durch gleichmässiges Vermischen von «Kieselgel G»¹¹⁾ mit ca. 3 Teilen Wasser er

Tabelle 1. Beispiele der analytischen Trennung von Steroid-Derivaten auf Kieselgel-Platte

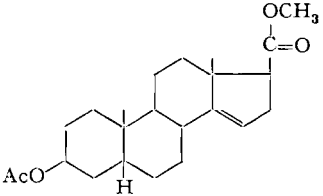
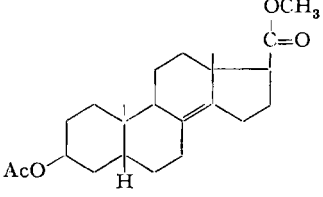
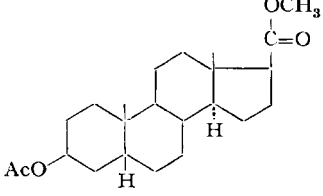
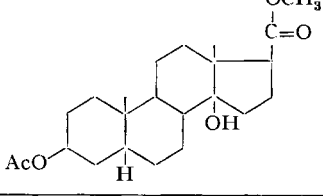
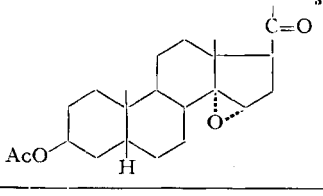
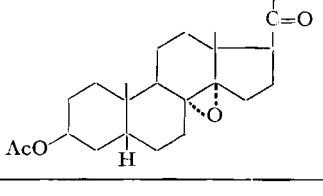
Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Rf-Wert
1		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,47 ± 0,1
2		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,47 ± 0,1
3		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,47 ± 0,1
4		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,22 ± 0,05
5		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,23 ± 0,05
6		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,18 ± 0,05

Tabelle 1 (Fortsetzung)

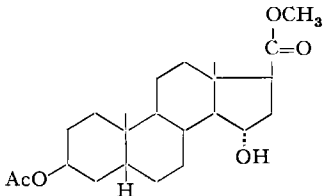
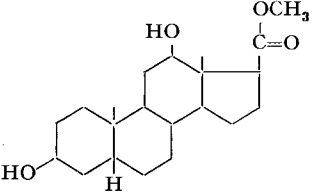
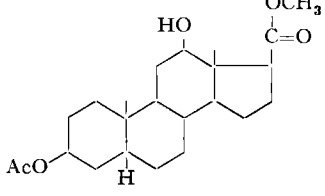
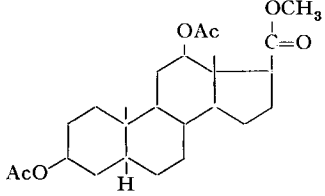
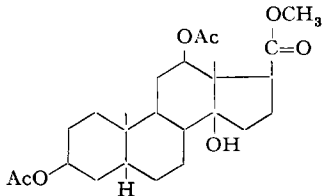
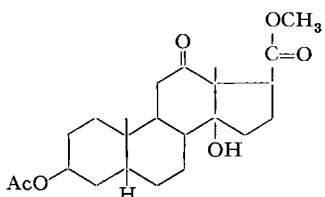
Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Rf-Wert
7		Essigester: Cyclohexan (15:85)	0,16 ± 0,05
8		Essigester: n-Hexan (75:25) Essigester: Cyclohexan (30:70)	0,54 ± 0,1 0,08 ± 0,05
9		Essigester: Cyclohexan (30:70)	0,40 ± 0,07
10		Essigester: Cyclohexan (30:70)	0,52 ± 0,1
11		Essigester: Cyclohexan (30:70)	0,42 ± 0,07
12		Essigester: Cyclohexan (25:75)	0,41 ± 0,07

Tabelle 1 (Fortsetzung)

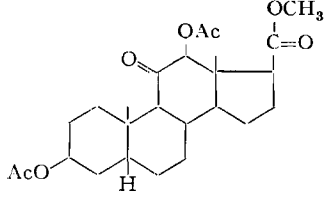
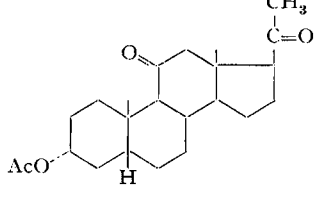
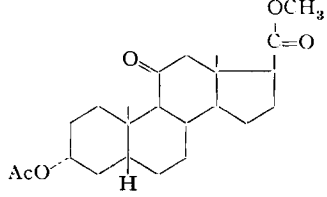
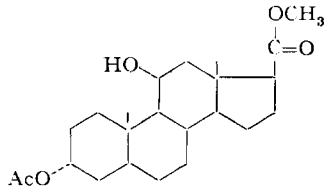
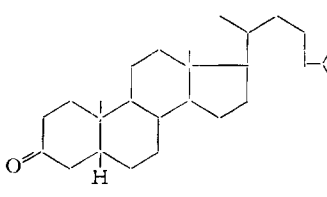
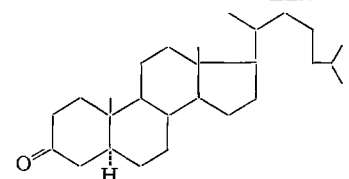
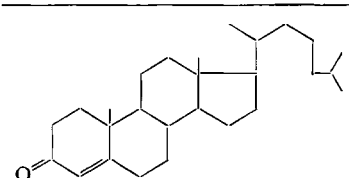
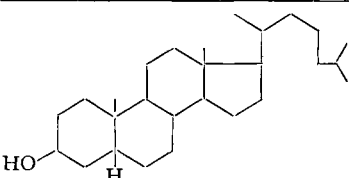
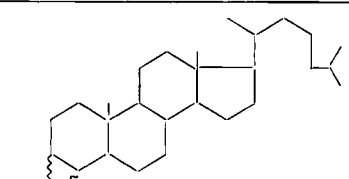
Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Rf-Wert
13		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,48 ± 0,1
14		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,32 ± 0,05
15		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,43 ± 0,07
16		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,58 ± 0,1
17		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,52 ± 0,1
18		Essigester:Cyclohexan (15:85)	0,71 ± 0,05

Tabelle 1 (Schluss)

Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Rf-Wert
19		Essigester:Cyclohexan (15:85)	0,86 ± 0,05
20		Essigester:Cyclohexan (15:85)	0,63 ± 0,05
21		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,16 ± 0,05
22		Essigester:Cyclohexan (30:70)	0,85 ± 0,1

halten wurde, wobei es sich als günstig erwiesen hat, das Bestreichen der Platten im Augenblick des beginnenden Abbindens des Gipsanteiles vorzunehmen. Zur Herstellung hinreichend gleichmässig dicker Platten genügt das in Fig. 3 skizzierte, aus Plexiglas leicht herzustellende Streichgerät; mit diesem einfachen Gerät gelingt es, Platten zu erhalten, deren Schichtdicke gleichmässig ca. 0,3 mm beträgt. Hierauf wurden die Platten $\frac{1}{2}$ Std. bei 20° vorgetrocknet und anschliessend in einem Ofen 1 Std. auf ca. 100–110° erwärmt, im Exsikkator über CaCl_2 abkühlen gelassen und bis zur Verwendung dort aufbewahrt. In einer Entfernung von 15 mm vom unteren Rand wurden in Abständen von 2 cm die Substanzen in Chloroform oder Aceton gelöst aufgetragen und hierauf die Platten in einem geeigneten Gestell in die Kammer mit dem Lösungsmittel gestellt. Die Platte soll dabei nicht bis zur Startlinie (15 mm vom unteren Rand), sondern nur ca. 5 mm eintauchen. Bevor die Lösungsmittelfront den oberen Rand der Platte erreichte, wurde diese herausgenommen, die Front des Lösungsmittels markiert und bei ca. 100° während 10 Min. getrocknet.

Wenn weniger als 0,01 mg Substanz zur Verfügung standen, verwendeten wir Chromatographieplatten, deren Schichtdicke geringer als 0,3 mm war. Diese wurden durch Besprühen mit dem frisch bereiteten, noch dünnflüssigen Brei erhalten. Die relative Laufstrecke wurde dabei vergrössert.

Für die Herstellung der Chromatographieplatten nach REITSEMA⁶⁾ hat sich folgende Herstellungsvorschrift bewährt: 28,5 g Kieselsäure (bezogen von MALLINCKRODT, CHEMICAL WORKS New York, USA.), 1,5 g Reisstärke und 54 ml destilliertes Wasser wurden vermischt und auf der

freien Flamme unter gutem Umschütteln erwärmt, bis die Lösung dickflüssig wurde (ca. 5 Min.). Unter Fortsetzen des Umschüttelns wurde abgekühlt, mit 20 ml Wasser verdünnt und durch Umschütteln homogenisiert. Das Aufbringen auf die Glasplatten wurde wie bei den Kieselgelplatten beschrieben durchgeführt. Die bestrichenen Platten wurden ca. 30 Min. auf 100° erwärmt. Für die Trennung der Cholsäure und Desoxycholsäure hat es sich als nötig erwiesen, die Platten nicht im Exsikkator, sondern durch Liegenlassen auf dem Tisch abkühlen zu lassen.

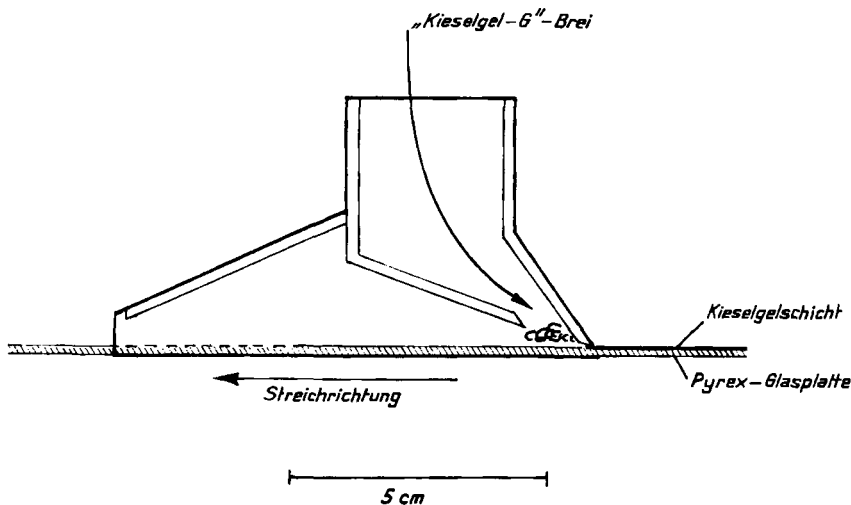


Fig. 3. Gerät zum Bestreichen der Glasplatten für Kieselgelchromatographie

Für die Entwicklung mit SbCl_3 wurden analog dem Vorgehen beim Entwickeln von Papierchromatogrammen⁸⁾ mit der Lösung von 20 g SbCl_3 in 67 ml Chloroform besprüht und für kurze Zeit auf ca. 100° erwärmt. Durch verschiedene Farbnuancen im sichtbaren und im UV.-Licht wurden die einzelnen Komponenten gut charakterisierbar.

Bei carbonylhaltigen Derivaten wurde mit der mit Wasser auf 100 ml aufgefüllten Lösung von 150 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 25 ml Wasser und 22 ml konzentrierter HCl besprüht. Die Farben wurden dabei als orangerote bis braunrote Farbzonen auf gelbem Hintergrund sichtbar. Für den Nachweis mit Phosphormolybdänsäure¹⁰⁾ wurde eine 10-proz. Lösung in Alkohol aufgesprüht und hierauf 1 Min. auf ca. 110° erwärmt. Dabei wurden auf gelbgrünem Hintergrund blaugrüne Farben erhalten.

Zusammenfassung

Für die analytische Trennung von Steroiden, insbesondere für schwach polare Vertreter dieser Stoffklasse, hat sich die Dünnschichtchromatographie nach STAHL bewährt.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel