

CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR PAPIER DES ACÉTATES DE STÉROÏDES PEU POLAIRES

J. R. PASQUALINI ET M. F. JAYLE

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine, Paris (France)

(Reçu le 17 juillet 1960)

(Modifié le 30 août 1960)

De nombreux systèmes de solvants ont été proposés pour réaliser la chromatographie des mono-acétates des stéroïdes présentant au moins 3 oxygènes et des diacétates des stéroïdes ayant au moins 4 oxygènes¹⁻⁴.

En revanche, les monoacétates des stéroïdes dioxygénés et les diacétates de stéroïdes trioxygénés ne peuvent être séparés dans les systèmes aussi lents que: méthylcyclohexane/propanediol, ligroïne/méthanol-eau, heptane/propamediol, triméthyl-2,2,4 pentane/méthanol-eau; car l'expérience prouve qu'ils migrent avec le front du solvant ou au voisinage de celui-ci, c'est ainsi que nous n'avons pas réussi à séparer les acétates des isomères de la 3 ξ ,21-diol dihydroxy 5 ξ pregnane 20-one dans ces systèmes.

Il en est de même pour les acétates des stéroïdes dioxygénés en C₁₉: toutefois, NEHER ET WETTSTEIN⁵ et SAVARD⁶ en utilisant comme phase stationnaire le phénylcellosolve ont réussi à séparer les acétates d'androstérome et d'épiandrostérome avec des R_F voisins: 0.34 et 0.29 respectivement.

La difficulté de la séparation des acétates des isomères peu polaires, nous a amenés à les déposer sur du papier Whatman No. 1 non imprégné par une phase stationnaire et à tenter leur séparation en faisant passer les solvants suivants: ligroïne, heptane, triméthyl-2,2,4 pentane, méthylcyclohexane et décaline. Cela revenait, en fait, à utiliser le papier comme un adsorbant et à réaliser une véritable chromatographie d'adsorption sur papier avec des solvants peu polaires.

Les acétates des stéroïdes utilisés dans ce travail sont:

4 diacétates de stéroïdes trioxygénés*:

- (1) 5 β pregnane 3 α ,21-diol, 20-one
- (2) 5 α pregnane 3 β ,21-diol, 20-one
- (3) 5 β pregnane 3 β ,21-diol, 20-one
- (4) pregna 5-ène 3 β ,21-diol, 20-one

5 monoacétates de stéroïdes dioxygénés:

- (5) 5 α androstane 3 α -ol, 17-one
- (6) 5 β androstane 3 α -ol, 17-one
- (7) 5 α androstane 3 β -ol, 17-one
- (8) 5 β androstane 3 β -ol, 17-one
- (9) androsta 5-ène 3 β -ol, 17-one

* Le stéroïde 5 β pregnane 3 α ,21-diol, 20-one a été envoyé par le Dr. W. TAYLOR, le stéroïde 5 α pregnane 3 β ,21-diol, 20-one par le Dr. A. ZAFFARONI, le stéroïde 5 β pregnane 3 β ,21-diol, 20-one par le Dr. S. K. FIGDOR et le pregna 5-ène 3 β ,21-diol, 20-one par le Dr. W. KLYNE; nous les remercions tous vivement.

MODE OPÉRATOIRE

Acétylation

200 μg de chaque stéroïde ont été acétylés en présence de 0.20 ml de pyridine et 0.20 ml d'anhydride acétique pendant 18 h à température ambiante. La solution est évaporée à sec et les traces des réactifs éliminés par addition et évaporation de benzène, puis de méthanol.

Dépôt des acétates de stéroïdes

Dans nos premières expériences, nous avons dissous les acétates dans l'éthanol et nous avons constaté qu'une grande partie demeurait sur la ligne de départ; cet inconvénient était en grande partie supprimé en utilisant le mélange acétone-acétate d'éthyle 1:1 v/v; dans nos essais plus récents, nous avons réussi à chromatographier la totalité du dépôt en procédant de la façon suivante: au niveau de la ligne de départ, le papier est imbibé avec un mélange de méthanol-propanediol 2:1 v/v sur une hauteur de 2 cm et l'acétate est déposé dans cette région, de sorte qu'on a au démarrage une chromatographie de partage à laquelle succède une chromatographie d'adsorption sur le papier.

On dépose de 3 à 8 μg de chaque acétate dans 4-10 μl . Les cuves sont équilibrées avec les différents solvants pendant 24 h à $24^\circ \pm 1^\circ$.

La chromatographie descendante se poursuit selon le cas pendant 3 à 4 h pour les quatre premiers solvants et pendant 8 h pour la décaline.

Les réactions suivantes sont utilisées pour la détection des taches:
réaction au bleu de tétrazolium pour les stéroïdes α -cétoïques;
réaction de Zimmermann pour les 17-cétostéroïdes.

RÉSULTATS

Nous n'avons pas constaté de traînées pour les différents acétates lorsque les quantités chromatographiées sont de 3 à 8 μg ; la tache est circulaire, ayant un diamètre de 1.5 à 3 cm.

Le Tableau I donne les résultats de la chromatographie pour cinq solvants utilisés avec trois isomères de diacétates de tétrahydro-désoxycorticostérone: 5β

TABLEAU I

Diacétate	Structure	R_T $5\beta,3\alpha$ TH-DOC-diacétate				
		Ligroïne	Heptane	Méthylcyclohexane	Triméthylpentane	Décaline
$5\beta,3\alpha$ TH-DOC	$3\alpha,5\beta$	1 (8 cm/h)	1 (9 cm/h)	1 (7.5 cm/h)	1 (4 cm/h)	1 (3.5 cm/h)
$5\alpha,3\beta$ TH-DOC	$3\beta,5\alpha$	0.56	0.55	0.85	0.42	0.77
$5\beta,3\beta$ TH-DOC	$3\beta,5\beta$	0.54	0.59	0.82	0.40	0.75
Pregna 5-ène						
$3\beta,21$ -diol, 20-one	$3\beta,4^b$	0.58	0.55	0.77	0.41	0.69

pregnane $3\alpha,21$ -diol, 20-one ($5\beta,3\alpha$ TH-DOC), 5α pregnane $3\beta,21$ -diol, 20-one ($5\alpha,3\beta$ TH-DOC), 5β pregnane $3\beta,21$ -diol, 20-one ($5\beta,3\beta$ TH-DOC), et le pregna 5-ène $3\beta,21$ -diol, 20-one.

On constate que les deux stéroïdes isomères ayant un hydroxyle équatorial sont nettement séparés dans ces systèmes; le stéroïde de structure $3\alpha,5\beta$ est moins polaire que l'isomère $3\beta,5\alpha$.

Les vitesses de migration des stéroïdes de structure $3\beta,5\beta$ (axiale), $3\beta,5\alpha$ (équatoriale) et du stéroïde non saturé sont très voisines.

Le Tableau II indique les résultats obtenus dans les différents solvants avec les monoacétates des 17-cétostéroïdes suivants: androstérone (5α androstane 3α -ol, 17-one); épiandrostérone (5α androstane 3β -ol, 17-one); étiocholanolone (5β androstane 3α -ol, 17-one); et déhydroépiandrostérone (androsta 5-ène 3β -ol, 17-one).

TABLEAU II

Monoacétate	Structure	R_T étiocholanolone-monoacétate				
		Ligroïne	Méthyl-cyclohexane	Heptane	Décaline	Triméthyl-pentane
Androstérone	$3\alpha,5\alpha$	0.97	1.03	0.98	0.97	0.91
Étiocholanolone	$3\alpha,5\beta$	1 (8 cm/h)	1 (9 cm/h)	1 (6 cm/h)	1 (3 cm/h)	1 (5 cm/h)
Épiandrostérone	$3\beta,5\alpha$	0.72	0.85	0.73	0.79	0.51
3β Étiocholanolone	$3\beta,5\beta$	0.73	0.83	0.85	0.80	0.59
Déhydroépiandrostérone	$3\beta, \Delta^5$	0.69	0.79	0.84	0.80	—

On constate le même phénomène que précédemment, à savoir que les deux isomères ayant un hydroxyle équatorial sont bien séparés l'un de l'autre. Le stéroïde de structure $3\beta,5\alpha$ est plus polaire que son isomère $3\alpha,5\beta$. Les deux isomères axiaux sont également bien séparés l'un de l'autre.

La migration du stéroïde de structure $3\beta,5\alpha$ est voisine de celle de son isomère $3\beta,5\beta$ et de celle de la déhydroépiandrostérone ($3\beta, \Delta^5$).

La migration du stéroïde de structure $3\alpha,5\alpha$ est voisine de celle de son isomère $3\alpha,5\beta$.

DISCUSSION

Les résultats précédents indiquent qu'il est possible de réaliser sur une feuille de papier Whatman une chromatographie d'adsorption qui est assez lente pour séparer des substances aussi peu polaires que les monoacétates des stéroïdes dioxygénés et les diacétates des stéroïdes trioxygénés, pour lesquelles les systèmes habituels ne conviennent pas.

Il est bien établi depuis les travaux de SAVARD^{6,7} et NEHER⁸ que la chromatographie de partage permet de bien séparer les deux stéroïdes isomères axiaux des isomères équatoriaux à l'état libre. Cette séparation est également possible dans le

cas des acétates de 11-oxo-étiocholanolone ($3\alpha,5\beta$) et de 11-oxo-androstérone ($3\alpha,5\alpha$) ou encore dans des diacétates de tetrahydrocortisol ($3\alpha,5\beta$) et allo-tetrahydrocortisol ($3\alpha,5\alpha$) et de diacétate de tetrahydrocortisone ($3\alpha,5\beta$) et allo-tetrahydrocortisone ($3\alpha,5\alpha$)⁹.

Il est intéressant de comparer l'ordre de migration des acétates des isomères de la TH-DOC dans notre méthode (Tableau I) avec l'ordre de migration des mêmes stéroïdes libres dans les différents systèmes de chromatographie de partage (Tableau III).

Nous pouvons faire les remarques suivantes :

(1) La migration de l'isomère $3\beta,5\beta$ par rapport à celle de l'isomère $3\alpha,5\beta$ est inversée dans les deux systèmes. En chromatographie de partage, l'isomère $3\alpha,5\beta$ est plus polaire que l'isomère $3\beta,5\beta$ à l'état libre, alors que dans les systèmes d'adsorption pour les acétates, c'est le stéroïde de structure $3\beta,5\beta$ qui est plus polaire que son isomère $3\alpha,5\beta$.

(2) En chromatographie de partage des stéroïdes libres, il est difficile, voire impossible, de séparer les deux isomères axiaux et les deux isomères équatoriaux l'un de l'autre. Dans la méthode proposée, on obtient une bonne séparation des acétates correspondant aux deux isomères axiaux et aux deux isomères équatoriaux.

(3) En revanche, dans la méthode décrite, l'isomère $3\beta,5\beta$ et l'isomère $3\beta,5\alpha$ à l'état d'acétates ont une migration très voisine, de même les isomères $3\alpha,5\alpha$ et $3\alpha,5\beta$; c'est le contraire dans le cas de la chromatographie de partage des stéroïdes libres.

Le schéma suivant montre la différence de polarité des stéroïdes axiaux et équatoriaux à l'état libre et acétylé.

		<i>Polarité croissante →</i>	
Stéroïde	Libre	$3\alpha,5\alpha \equiv 3\beta,5\beta < 3\alpha,5\beta \equiv 3\beta,5\alpha$	(systèmes de chromatographie de partage)
	Acétylé	$3\alpha,5\alpha \equiv 3\alpha,5\beta < 3\beta,5\beta \equiv 3\beta,5\alpha$	(systèmes de chromatographie décrits)
		axiaux équatoriaux	
		axial équatorial axial équatorial	

TABLEAU III

Stéroïde	<i>R_T 5β,3α TH-DOC</i>				
	<i>Ligroïne/ propanediol</i>	<i>Heptane/ formamide</i>	<i>Tétraline/ propanediol</i>	<i>Décaline/ propanediol</i>	<i>Décaline/ méthanol-cau</i>
5β,3α TH-DOC	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5α,3β TH-DOC	0.92	0.85	0.94	0.87	1.17
5β,3β TH-DOC	1.66	1.83	1.17	1.91	2.00
Pregna 5-ène 3β,21-diol, 20-one	0.68	0.65	0.84	0.62	0.93

CONCLUSION

En utilisant une méthode de chromatographie d'adsorption sur feuille de papier pour monoacétates et diacétates de stéroïdes peu polaires, on obtient des R_F qui sont plus faibles que ceux des systèmes de chromatographie de partage les plus lents. En outre, les vitesses de migrations relatives des diacétates de différents stéroïdes sont très différentes de celles que l'on trouve dans les systèmes de chromatographie de partage.

En associant la chromatographie de partage de stéroïdes libres à la chromatographie d'adsorption sur papier de leurs acétates, on dispose d'un moyen qui permet de séparer et par suite d'identifier des stéroïdes isomères ayant un hydroxyle axial ou équatorial.

Dans une première étape on sépare par chromatographie de partage dans des systèmes appropriés les isomères axiaux ($3\alpha,5\alpha$ et $3\beta,5\beta$) des isomères équatoriaux ($3\alpha,5\beta$ et $3\beta,5\alpha$). Dans une deuxième étape ces stéroïdes sont acétylés et leurs acétates sont à nouveau chromatographiés dans les systèmes d'adsorption sur papier, ce qui permet la séparation des deux isomères de chaque catégorie.

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent une méthode de chromatographie d'adsorption sur papier avec des solvants peu polaires permettant la séparation des mono- et diacétates de stéroïdes di- ou trioxygénés.

Ce procédé permet de séparer les deux isomères ayant en C_3 un hydroxyle axial ainsi que les deux isomères ayant un hydroxyle équatorial en C_3 .

SUMMARY

A method for the separation of mono- and diacetates of di- and trioxygenated steroids is described. This procedure involves chromatographic adsorption on paper with less polar solvents.

Of the steroids that have a C_3 hydroxyl group it was possible to separate the two isomers with an axial configuration as well as the two isomers with an equatorial configuration.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ I. E. BUSH, *Biochim. J.*, 50 (1952) 370.
- ² W. R. EBERSTEIN ET A. M. BONGIOWANNI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 90.
- ³ A. ZAFFARONI, *Recent Progr. in Hormone Research*, 8 (1953) 51.
- ⁴ W. R. MATTOKS, H. L. MASON ET A. ADIERT, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 359.
- ⁵ R. NIEBER ET A. WITTSCHEN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 276.
- ⁶ K. SAWARD, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 457.
- ⁷ K. SAWARD, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 185.
- ⁸ R. NIEBER, *Manographie de chimie organique*, III, Vol. III, Masson et Cie, Paris, 1960, p. 165.
- ⁹ I. E. BUSH ET W. B. MANNESH, *Biochim. J.*, 71 (1959) 705.