

ÜBER DIE CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG VON HARNSTEROIDEN ZUR DARSTELLUNG IM INFRAROTSPEKTRUM

KLAUS DÖNGES UND WOLFGANG STAIB

Institut für Physiologische-Chemie der Medizinischen Akademie,
Düsseldorf (Deutschland)*

(Eingegangen den 24. August 1961)

Die Identifizierung von Steroiden ist in den letzten 10–20 Jahren durch die Infrarot-Spektroskopie wesentlich vereinfacht worden. Da die Mehrzahl der im Harn ausgeschiedenen Steroidmetaboliten bekannt ist, wird sich ihre Identifizierung zumeist auf einen Vergleich mit Referenzsubstanzen gründen. Für die Auswertung im Infrarot (I.R.)-bereich müssen die Substanzen weitgehend gereinigt sein, sie brauchen jedoch nicht unbedingt in kristalliner Form vorzuliegen.

Bei säulenchromatographischer Fraktionierung z.B. von Harn-17-Ketosteroiden (17-KS) kann es öfters trotz exakten Standardisierens des Aluminiumoxyds zu Verschiebungen in der Elutionsgeschwindigkeit der einzelnen Steroide kommen. Dann ist eine weitere Aufklärung der verschiedenen Fraktionen notwendig. In vielen Fällen werden hier papierchromatographische Methoden und Gruppenbestimmungen wie Digitoninfällung, Girard-T-Umsatz etc., und auch Schwefelsäure- und U.V.-Spektren ausreichen. Einen eindeutigen Identitätsbeweis wird man aber erst zusätzlich durch das Infrarotspektrum erwarten können.

Zur I.R.-Messung ziehen wir die Kaliumbromid-Pressstechnik¹ der Methode mit organischen Lösungsmitteln vor, da letztere durch zahlreiche Eigenabsorptionen der Lösungsmittel nur in eingeschränkten Spektralbereichen verwendbar ist. Ausserdem ist auch beim Gebrauch der uns zur Verfügung stehenden Mikroküvetten eine relativ grosse Steroidmenge von 2–5 mg erforderlich.

Allerdings müssen wir auf einige bekannte Nachteile der KBr-Pressstechnik hinweisen. So ist z.B. der HO-Bereich oftmals durch die im KBr vorhandenen Wassermengen schlecht auswertbar; weiterhin besteht die Möglichkeit, dass beim Pressen labiler Steroide auch Artefakte entstehen können. Und schliesslich sind die in KBr aufgenommenen Spektren selten quantitativ auswertbar, da die Substanz in KBr trotz intensiven Mischens (z.B. mit Vibratoren oder im Mörser) unregelmässig verteilt ist. In unserem Falle steht aber die Identifizierung mehr im Vordergrund als die quantitative Auswertung, so dass der letzte Einwand hier vernachlässigt werden kann. In Zweifelsfällen sollte man jedoch zusätzliche I.R.-Spektren der zu identifizierenden Substanzen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln anfertigen.

Die Herstellung klarer und durchsichtiger KBr-Presslinge mit Fraktionen von Extrakten aus Körperflüssigkeiten bereitet oftmals grössere Schwierigkeiten. Aus diesem Grunde berichten wir in der vorliegenden Arbeit von unseren Erfahrungen in

* Direktor: Prof. Dr. K. HINSBERG.

der Darstellung sauberer I.R.-Spektren von Steroidmetaboliten aus menschlichem Harn.

Bei der üblichen Methode zur Aufnahme von Substanzspektren in KBr benötigt man für einen Pressling von 13 mm Durchmesser und etwa 1 mm Schichtdicke 200–300 mg Kaliumbromid und 1–2 mg Substanz. Da eine solche Substanzmenge aber oftmals nicht zur Verfügung steht, verwendeten wir eine Presstechnik, bei der man mit etwa 50–100 γ Steroid noch auswertbare Spektren erhält. Hierzu verwendeten wir runde aus Papierchromatographie-Karton ausgeschnittene Blättchen mit einem Durchmesser von 13 mm, in deren Mitte ein Fenster von 2.4×7 mm zur Aufnahme des KBr gestanzt wurde. Auf diese Weise liess sich die Substanz in 20–30 mg KBr genau auf den Strahlenspalt konzentrieren. Mit 100 γ Steroid-Reinsubstanz konnten trotz Gitterkompensation des Vergleichsstrahles Spektren von ausgezeichneter Auflösung erreicht werden. Selbst 50–60 γ Steroidmengen ergaben unter diesen Bedingungen noch auswertbare Spektren (Fig. 1).

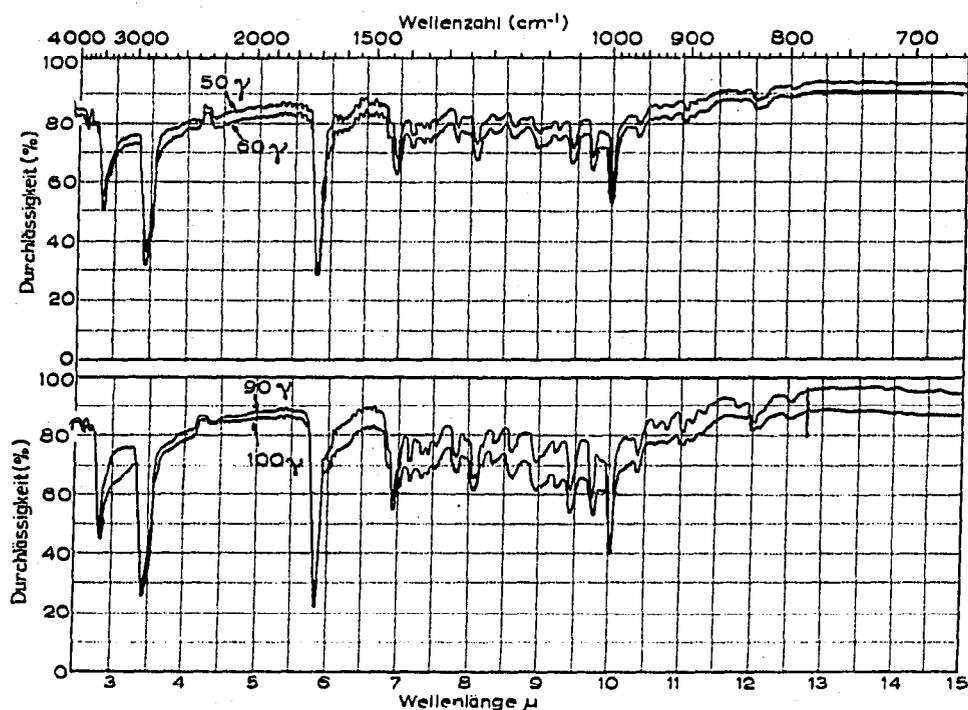


Fig. 1. Androsteron-Spektrum mit reduziertem Pressling; 50, 60, 90 und 100 γ .

Im Anschluss an diese Untersuchungen hofften wir, aus Eluaten von Papierchromatogrammen direkt zur Infrarotmessung übergehen zu können. Hierzu führten wir zunächst (a) Lösungsmittel- und (b) Papiereluat-Leerversuche durch.

(a) Nach Eindampfen von 15 ml Lösungsmittel (Petroläther, Hexan, Chloroform, Toluol, Äthylacetat, Butanol, Methanol, Eisessig, Wasser) zeigten die Eindampfrückstände mit Ausnahme von Wasser und Methanol — die beide im Hydroxylbereich bei 2.8 und 6.2 μ absorbieren — im Spektrum von 2.5–15 μ keinerlei Banden.

(b) Von den verwendeten Papieren wurde nach verschiedenen Reinigungsstufen (siehe methodischer Teil) jeweils ein gleichgrosses Stück entnommen und mit Chloroform-Methanol eluiert. Im Spektrum der Eindampfrückstände traten jedesmal

Banden bei 2.9; 3.4; 5.8–6.2 und bei 7.2 μ von zum Teil beträchtlicher Intensität auf. Aus diesen Leerversuchen geht hervor, dass einwandfreie I.R.-Spektren direkt aus Papiereluaten nicht möglich sind. Trotz mehrerer Reinigungsstufen gelang es nicht, die immer wieder an typischer Stelle auftretenden Absorptionsbanden zu beseitigen.

Deshalb musste an die Papierchromatographie eine weitere Reinigungsstufe angeschlossen werden. Wir verwendeten dazu eine Aluminiumoxyd-Mikrosäule. Das nach BROCKMANN standardisierte Aluminiumoxyd (Woelm) wurde mit steigender Konzentration Äthanol in Benzol eluiert. Die Reinsubstanz-Spektren aus Papiereluaten zeigten nach dieser Reinigung keine Überlagerung mehr durch Verunreinigungen aus dem Papier.

Versuche mit papierchromatographisch charakterisierten und an Aluminiumoxyd gereinigten Steroidfraktionen aus Harnextrakten scheiterten aber für freie ebenso wie für konjugierte 17-KS. Die Aluminiumoxyd-Mikrosäule führte zwar zu einer weiteren Reinigung; die eingedampften Eluatfraktionen waren jedoch nur selten frei von schmierigen Begleitstoffen. Daher versuchten wir die Papiereluate durch Verteilungschromatographie an Celite-Säulen zu reinigen. Es gelang uns, im System VII von SCHNEIDER UND LEWBART² (Äthylacetat-Toluol-*n*-Hexan-*n*-Butanol-Eisessig-Wasser, 12:15:8:5:12:28) Androsteron-glucuronid und Ätiocholanolon-glucuronid aus Harnextrakten so weitgehend zu reinigen, dass die I.R.-Spektren mit denen der chemisch dargestellten Vergleichssubstanzen³ identisch waren.

Nach diesem guten Ergebnis mit der Verteilungschromatographie übertrugen wir das gleiche Verfahren auf die Reinigung der freien Steroide aus Harnextrakten. Zur Elution dienten uns verschiedene BUSH-Systeme⁴ und in den eingedampften Säulenfraktionen fanden wir häufig sogar kristallinen Rückstand. Die Auflösung der damit aufgenommenen I.R.-Spektren war ausgezeichnet und völlig identisch mit denen entsprechender Referenzsubstanzen (Fig. 2).

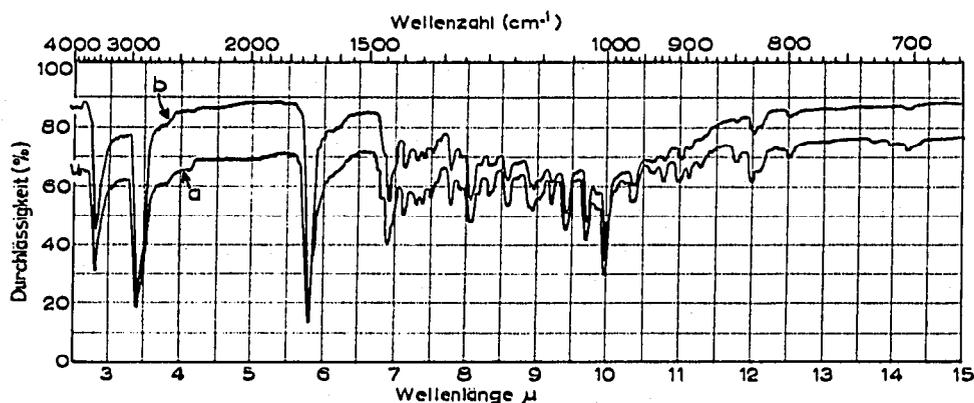


Fig. 2. (a) Androsteronfraktion aus einem Harnextrakt isoliert. (b) Androsteron (Schering) als Vergleichssubstanz.

Eine weitere Methode, um Steroide zu reinigen und zu charakterisieren bzw. zu identifizieren, wurde kürzlich von BREUER⁵ beschrieben. Er verwendete dazu das *Sublimationsverfahren* von KOFLER⁶. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass manche Steroide bei hohen Temperaturen strukturelle Umwandlungen erleiden. Wir achteten darauf, möglichst weit (20–30 %) unterhalb des Schmelzpunktes zu

bleiben. Die unter vorsichtigen Bedingungen (siehe Methodik) sublimierten Kristalle von Androsteron, Epiandrosteron, Ätiocholanolon und Testosteron ergaben einwandfreie I.R.-Spektren, die auch mit den Spektren von Referenzsubstanzen übereinstimmen. Sobald die Temperatur jedoch bis in den näheren Schmelzbereich steigt, bilden sich leicht Spaltprodukte. In Fig. 3 wurden diejenigen von Androsteron papierchromatographisch voneinander getrennt; Ätiocholanolon zeigt unter diesen Bedingungen im I.R.-Bereich starke zusätzliche Banden bei 6.15 ; 6.3 ; 7.45 und 11.65μ .

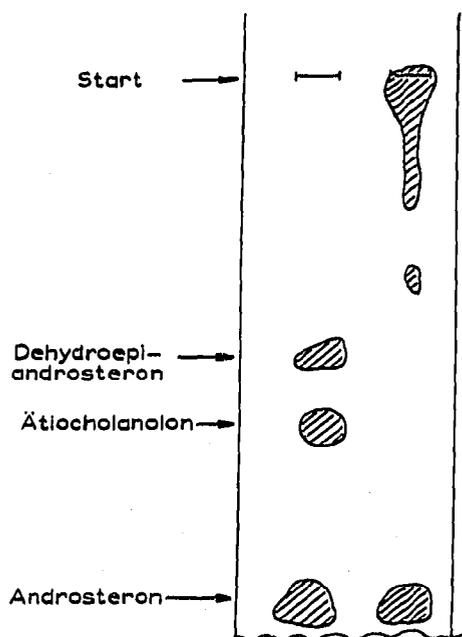


Fig. 3. Rechts: Absteigendes Chromatogramm von erhitztem Androsteron (bis ungefähr 175°). Links: Referenzsubstanzen.

In Weiterführung dieser Ergebnisse sublimierten wir Papiereluat von Reinsubstanzen, die im SAVARD-System⁷ entwickelt worden waren. Androsteron und Epiandrosteron konnten auf diese Art aus Sublimations-Kristallen im I.R. rein dargestellt werden.

Neue Möglichkeiten präparativer Reinigung von Steroiden liegen in der Dünnschicht-Chromatographie nach STAHL⁸ vor. Erste Versuche führten hier zu erfreulichen Ergebnissen. Mit unpolaren Lösungsmitteln lassen sich die Steroide gut aus dem Kieselgel eluieren und im I.R. spektroskopieren.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Für die Aufnahme der I.R.-Spektren diente das Gerät: "Infracord", Modell 137, der Firma Perkin-Elmer (U.S.A.).

1. Zur Presstechnik des Kaliumbromids

Die klarsten Presslinge erhielten wir, wenn die Extraktückstände in fester Form dem KBr zugegeben, im Achatmörser sorgfältig verrieben und gemischt, dann mit 300 at unter 60 Torr in der von Perkin-Elmer gelieferten Pressapparatur gepresst wurden.

Demgegenüber führten die in gelöster Form auf das KBr gegebene Extrakte nach Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen im Lyophilisator häufiger zu Trübungen des Presslings, was die Durchlässigkeit der Probe manchmal erheblich verringerte. Besonderer Aufmerksamkeit bedarf das Einfüllen des KBr in den Spalt des Kartonplättchens: hierbei ist eine möglichst gleichmässige Verteilung erforderlich, da andernfalls sehr leicht Trübungen durch ungleichmässige Schichtdicke zustande kommen.

2. Lösungsmittel- und Papiereluat-Leerversuche

(a) Die verwendeten Lösungsmittel waren pro-analyse Substanzen der Firma Merck. Es wurden 15 ml unter Stickstoff eingedampft und der mögliche Rückstand in wenigen Tropfen des jeweiligen Lösungsmittels auf KBr gegeben, danach zur Entfernung von Restfeuchtigkeit bis zu 18 Stunden bei 0.08 Torr getrocknet (lyophilisiert), im Achatmörser wieder pulverisiert, dann gepresst.

(b) Chromatographie-Papier (Whatman No. 1) wurde zuerst ungereinigt, dann nach zusätzlichem Waschen in Eisessig, Wasser und Methanol (absteigend eluiert) in jeweils einer Fläche von 30 cm² eluiert und weiterhin wie unter (a) behandelt und in KBr gepresst.

3. Aluminiumoxyd-Mikrosäule

Die Aluminiumoxyd-Mikrosäulen hatten einen inneren Durchmesser von 5 mm. Das Aluminiumoxyd Merck, standardisiert nach BROCKMANN, wurde in dest. Benzol in die Glassäule unter leichtem Klopfen bis zu einer Höhe von 15 cm eingeschlemmt. Als Abschluss diente eine Schicht von 2–3 mm Cellulosepulver No. 123 (Schleicher und Schüll). Nach 5 ml Benzolvorlauf wurde das papierchromatographisch isolierte Steroid in 3 ml Benzol gelöst, quantitativ auf das Aluminiumoxyd gegeben. Die Elution erfolgte mit steigender Konzentration von frisch destilliertem Äthanol in Benzol, wobei der Durchlauf in 5 ml Portionen fraktioniert wurde.

(1) 5 ml Benzol;

(2) 10 ml 0.5 % Äthanol in Benzol;

(3) 10 ml 0.75 % Äthanol in Benzol;

(4) 10 ml 1 % Äthanol in Benzol zur Kontrolle, ob das Steroid vollständig ausgewaschen war.

Nach Eindampfen des Lösungsmittels wiesen wir die Steroid-enthaltenden Fraktionen durch Tupfprobe mittels Zimmermann-Reaktion auf dem Papier nach.

4. Celite Säulen

Es wurden 35 cm lange Glassäulen mit Schliff am oberen Ende zum Aufsetzen eines Lösungsmittel-Reservoirs verwendet. Das Celite No. 535 (Johns Manville Intern. Corp., New York; bezogen durch Serva Entwicklungslabor) wurde vor Gebrauch zur Entfernung von Verunreinigungen mit konz. Salzsäure gekocht, dann mit Wasser neutral gewaschen und über Nacht bei 110° über Silicagel getrocknet. Das mit stationärer Phase entsprechender BUSH-Chromatographie-Systeme⁴ (A, B, C) oder andere² zu 60 % gesättigte Celite wurde 2 Stunden geschüttelt. Dann wurde die mobile phase zugegeben und abermals 2 Stunden geschüttelt. Mit Hilfe eines V2A-Stampfers wird das Celite in Schichten von 2–3 mm bis zu insgesamt

20 cm Höhe in der Säule gepackt. Mit Neutralrot kann eine Elutionsprobe zur Prüfung gleichmässigen Packens vorgenommen werden. Der Farbstoff sollte am Säulenende eine Ausdehnung von 3–4 cm nicht überschreiten. Bis zu 5 mg Substanz können ohne nennenswerte Schwanzbildung in 50 mg Celite als oberste Packlage auf die Säule gegeben werden. Zur Erreichung gleichmässiger Elutionsbedingungen sollte die Tropfgeschwindigkeit von 5–10 Tropfen/Min eventuell mit Stickstoffdruck eingestellt werden. Die Fraktionierung geschieht am automatischen Sammler in 5 ml Fraktionen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels ist an dem teilweise sogar kristallinen Rückstand die Steroidfraktion zu erkennen. Zur Kontrolle führten wir aber jedesmal eine Tupfreaktion auf Papier aus.

Die im I.R.-Spektrum dargestellte Harnfraktion (Fig. 2) ist nach folgendem Schema isoliert worden: (a) β -Glucuronidase- und kalte Säurehydrolyse eines frischen 24 Stunden Harnes, (b) Ätherextraktion, (c) Gradienten-Elution⁹, (d) Papierchromatographie im SAVARD-System, (e) Celite-Säule (System A von BUSH), (f) I.R.-Spektrum.

5. Sublimation

Die Sublimation wurde mit dem Mikroskop-Heiztisch der Firma Leitz ausgeführt. Der das Thermometer tragende Objektisch wurde nach den Angaben von BREUER zentral durchbohrt, um ein rundes Glasnäpfchen von 10 mm Innendurchmesser und 8 mm lichter Höhe aufnehmen zu können. Der obere nach aussen gebogene Rand ist plangeschliffen und mit einem Mikroskopier-Deckgläschen abgeschlossen.

Die Steroid-Reinsubstanzen und Papiereluate wurden gelöst, in Chloroform-Methanol auf den Boden des Gefässes gegeben und zur Trockene gebracht. Die Sublimationstemperatur lag ungefähr 30 % bei Normaldruck unterhalb des Schmelzpunktes der Substanz. Die Sublimation dauerte 3–5 Stunden. Nach dieser Zeit konnten die Kristalle zur Schmelzpunktskontrolle und für die I.R.-Aufnahme vom Deckglass abgenommen werden.

6. Dünnschicht-Chromatographie

Auf eine Glasplatte von 16 × 19 cm wurde das Kieselgel (für Dünnschicht-Chromatographie nach STAHL der Firma Merck) in einer Schicht von 0.6 mm aufgetragen. Als Streichgerät diente uns das von BARBIER *et al.*¹⁰ angegebene Modell. Die Substanz (500 γ Androsteron) wurde in einer Breite von 10 cm auf das Kieselgel aufgetropft und in Hexan-Essigester (2:1) aufsteigend chromatographiert. Nach 4 Stunden Laufzeit wurde die Platte an der Luft getrocknet und die Randzone mit alkalischem *m*-Dinitrobenzol¹¹ angesprüht. Die Substanz hatte einen R_F -Wert von 0.32 und zeigte keine Schwanzbildung. Der nicht gefärbte Anteil wurde vom Glas abgeschabt und in einer Fritte G3 mit Äther extrahiert und in KBr gepresst. Eine eindeutige Übereinstimmung mit der Referenzsubstanz war gegeben.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für ein Stipendium (K. DÖNGES), für das Infrarotgerät von der Firma Perkin-Elmer, für einen Leitz-Mikroskop-Heiztisch und für Sachbeihilfen. Herrn Dr. A. E. KELLIE (London), den Herren

Dozenten Dr. H. SCHRIEFERS und Dr. H. BREUER (Bonn) danken wir für die Einweisung in die Technik der Verteilungssäulen und der Sublimation.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Reinigung und Isolierung von Harn-17-Ketosteroiden werden Methoden beschrieben, mit denen die einzelnen Steroide in einwandfreien Infrarotspektren identifiziert werden können. Ausserdem wird eine einfache Methode beschrieben, durch welche die Spektren von Substanzmengen bis herab zu 50 γ ohne zusätzliche Apparaturen im Infrarot (Perkin Elmer, Modell 137) aufgenommen werden können.

SUMMARY

Methods are described for the purification and isolation of urinary 17-keto-steroids, with which the individual steroids can be identified by means of reliable infra-red spectra. A description is also given of a simple method which permits the recording of spectra of small amounts of substance, down to 50 γ , in the Infracord apparatus (Perkin-Elmer, model 137), without additional apparatus being necessary.

LITERATUR

- ¹ U. SCHIED UND H. REINWEIN, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 270.
- ² J. J. SCHNEIDER UND M. L. LEWBART, *Recent Progr. Hormone Research*, 15 (1959) 201.
- ³ W. STAIB UND K. DÖNGES, vorgetragen auf der gemeinsamen Tagung der deutschen, französischen und schweizerischen Biochemiker in Zürich vom 10.-12. Okt., 1960.
- ⁴ I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 50 (1952) 370.
- ⁵ H. BREUER, *Referat I. Intern. Congr. Endocrinology*, Kopenhagen, 18.-23. Juli, 1960.
- ⁶ L. KOFLER UND A. KOFLER, *Mikromethoden*, Universitätsverlag, Innsbruck, 1948.
- ⁷ K. SAVARD, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 457.
- ⁸ E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- ⁹ W. STAIB UND W. SCHILD, *Klin. Wochschr.*, 36 (1958) 166.
- ¹⁰ M. BARBIER, H. JÄGER, H. TOBIAS UND E. WYSS, *Helv. Chim. Acta*, 42 (1959) 2440.
- ¹¹ H. PELZER UND W. STAIB, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 407.

J. Chromatog., 8 (1962) 25-31