

# ÜBER EIN NEUES LÖSUNGSMITTELSYSTEM ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHIE SCHWACH POLARER STEROIDVERBINDUNGEN

GERHARD LANGBEIN UND MANFRED MEYER

*Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm,  
Jena (Deutschland)*

(Eingegangen am 22. Dezember 1961)

Zahlreiche Lösungsmittelkombinationen sind zur papierchromatographischen Analyse von Steroiden mit Erfolg erprobt und beschrieben worden. Zu den noch unbefriedigend gelösten Aufgaben gehört vor allem die Trennung wenig polarer Steroide.

Bei der Synthese des Prednisons aus Schweinegalle standen wir vor der Aufgabe, das schwach polare  $3\alpha,6\alpha$ -Diacetoxypregnan-20-on (XV) von seinem  $\Delta^{17,20}$ -20-Enolacetat (IX) papierchromatographisch trennen zu müssen. Die bei der Prüfung bekannter Systeme erhaltenen unbefriedigenden Ergebnisse veranlassten uns, das Interesse auf Lösungsmittelsysteme zu richten, deren stationäre Phase starke Polarität aufweist, für die in Frage kommenden Steroide gute Lösungseigenschaften besitzt und bei Zimmertemperatur wenig flüchtig ist.

## EXPERIMENTELLES

Die Prüfung verschiedener Systeme<sup>1</sup>, besonders solcher mit umgekehrten Phasen<sup>2</sup>, wobei das Papier mit Silikonöl, Paraffinöl oder Vaseline hydrophobiert wurde, führte zu wenig befriedigenden Ergebnissen. Äthylenglycolmonophenyläther (Phenylcellosolve), mit dem gute Trennungen bei wenig polaren Substanzen beschrieben worden sind<sup>3</sup>, stand nicht zur Verfügung.

Nach den geforderten Eigenschaften für eine erfolgsversprechende stationäre Phase erschien uns die Verbindung Äthencarbonat sehr geeignet. Die Dielektrizitätskonstante des Äthencarbonats beträgt<sup>4</sup>:  $\epsilon_{40^\circ} = 89.6$ . Sie ist demnach grösser als die Dielektrizitätskonstante des Wassers ( $\epsilon_{40^\circ} = 73.4$ ). Äthencarbonat zeigt ausreichende Lösungseigenschaften für alle bekannten Steroide und ist bei Raumtemperatur kaum flüchtig (Fp.  $39^\circ$ ; Kp.  $236^\circ$ ). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen unter Anwendung von Äthencarbonat als stationäre Phase werden im folgenden beschrieben.

### *Arbeitsmethode*

*Vorbereitung des Papiers.* Äthencarbonat wird in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel unter kurzem Erwärmen gelöst. Wir verwendeten dazu Methanol. Das ausgestanzte Papier wird kurz durch die Lösung gezogen. Danach lässt man das Methanol verdunsten, wozu 10-15 Minuten ausreichen. Nach dem Auftragen der Substanz wird mit der entsprechenden mobilen Phase absteigend chromatographiert. Es wurden

Papiere von Schleicher & Schüll Nr. 2043b verwendet. Die Fleckenzeichnung ist bei allen in der Tabelle I angeführten Verbindungen sehr scharf. Nur bei wenigen der von uns untersuchten Verbindungen (z.B.  $3\alpha,6\alpha$ -Diacetoxy-16(17)-pregnen-20-on), die in Tabelle I nicht aufgeführt sind, wurde S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Schweifbildung beobachtet. Die Lösungsmittelfront legt in etwa 3 Stunden bei den Systemen A bis D der Tabelle I bei einer Arbeitstemperatur von 18–27° eine Laufstrecke von etwa 10–15 cm zurück. Der  $R_F$ -Wert und der Trenneffekt bei ähnlich polaren Verbindungen ist durch Erhöhung des Anteils an stationärer Phase auf dem Papier stark beeinflussbar<sup>5</sup>. Für Äthencarbonat fanden wir ähnliche Abhängigkeiten. Man erzielt unterschiedliche Mengen Äthencarbonat auf dem Papier, indem man das Chromatogramm mit Äthencarbonat-Methanol-Lösungen verschiedener Konzentration tränkt oder indem man das Chromatogramm nach dem Verdunsten des Methanols ein zweites Mal durch die Lösung der stationären Phase zieht. Da Äthencarbonat bei Raumtemperatur im festen Aggregatzustand vorliegt, lässt sich die stationäre Phase sehr gut dosieren. Man kann die auf das Papier aufgetragene Menge Äthencarbonat nach dem Verdunsten des Methanols durch Wägung bestimmen. Wir gelangten zu folgenden Werten:

Bei einmaligem Tauchen des Papiers in einer Lösung von 100 g Äthencarbonat in 200 ml Methanol erhält man 0.7 g Äthencarbonat pro dm<sup>2</sup> Papier. In einer Lösung von 100 g Äthencarbonat in 37.5 ml Methanol erhält man 1.4 g pro dm<sup>2</sup>.

Der Einfluss, den die Äthencarbonatmenge auf dem Papier auf die Laufzeit der Substanzen ausübt, sei an dem Beispiel der ausserordentlich wenig polaren Verbindungen  $3\alpha,6\alpha$ -Diacetoxy-24,24-diphenyl-23(24)-cholen (II) und  $3\alpha,6\alpha$ -Diacetoxy-24,24-diphenyl-20(22),23(24)-choladien (IV) erläutert.

Auf einem in eine Lösung von 100 g Äthencarbonat in 37.5 ml Methanol getauchten Chromatogramm (System A der Tabelle I) befinden sich II und IV beim Eluieren mit Schwerbenzin nach sechsstündiger Laufzeit und einer Laufgeschwindigkeit von etwa 12 cm in 180 Minuten ca. 3–5 cm hinter der Lösungsmittelfront. Wird jedoch das Papier durch zweimaliges Tauchen in die angegebene Lösung vorbehandelt, so befinden sich die genannten Verbindungen bei einer Laufstrecke von 5 cm etwa 15 cm hinter der Lösungsmittelfront.

*Nachweisreaktionen.* Verbindungen mit Cholestanseitenkette wurden nach CAVINA<sup>6</sup> angefärbt. Die übrigen in der Tabelle angeführten Verbindungen wurden nach der von SCHINDLER UND REICHSTEIN<sup>7</sup> angeführten Methode sichtbar gemacht. Deutliche Flecken wurden bei vielen Verbindungen erst dann erzielt, wenn die Konzentration des *m*-Dinitrobenzols in Benzol auf mindestens 15% (Gewicht/Volumen) erhöht wurde.

### Zu Tabelle I

In der Tabelle I sind die in den Systemen A–E untersuchten Steroidverbindungen ihrer Polarität nach so geordnet, dass die Laufgeschwindigkeit von oben nach unten abnimmt. Die ursprünglich beabsichtigte Trennung der Verbindungen IX und XV, die beispielsweise nach der Enolisierung des  $3\alpha,6\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-ons<sup>8</sup> im Gemisch vorliegen, kann einwandfrei durchgeführt werden. Darüber hinaus lassen sich bisher schwer trennbare Verbindungen gut analysieren. Die Verbindung IV wandert infolge ihrer zusätzlichen Doppelbindung langsamer als II. Ebenso lassen sich die Cholestadienone III und V vom 4-Cholesten-3-on (I) trennen.

$3\alpha,6\alpha$ -Diacetoxypregnan-20-on (XV) läuft im System B der Tabelle I etwas



XVIII	Progesteron	0.65		X	X	
XIX	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxyprogesteron	0.23		X	X	X
XX	6 $\beta$ -Acetoxypregnan-3,20-dion	0.14	1.58		X X	X
XXI	Cortexonacetat	0.12	1.30	X	X	X
XXII	17 $\alpha$ -Acetoxyprogesteron	0.10	1.14	X	X	X
XXIII	Pregnan-3,11,20-trion	0.09	1.00	1.00	X X X	X X X
XXIV	5 $\alpha$ -H-Pregnan-3,6,20-trion		0.80	0.85	X X X	X X X
XXV	5 $\alpha$ -H-Pregnan-3,11,20-trion		0.72	0.80	X X X	X X X
XXVI	Pregnan-3,6,20-trion		0.68	0.80	X X X	X X X
XXVII	6 $\alpha$ -Tosyloxy-17 $\beta$ -acetyandrostan-3-on		0.71			
XXVIII	3,17 $\alpha$ ,21-Triacetoxo-2-pregnen-11,20-dion		0.40		X X	X X X
XXIX	3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Ditosyloxypregnan-20-on		0.31		X X	X
XXX	3,17 $\alpha$ ,21-Triacetoxo-3,5-pregnadien-11,20-dion		0.29		X X	X X X

A: S = Cholesterin

Stationäre Phase: Lösung von 10 g Äthencarbonat in 3.75 ml Methanol  
 Mobile Phase: Schwerbenzin (Kp. 180-190°).

C: S = Pregnan-3,11,20-trion

Stationäre Phase: Lösung von 10 g Äthencarbonat in 20 ml Methanol  
 Mobile Phase: Schwerbenzin (Kp. 180-190°).

B: S = 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Diacetoxypregnan-20-on

Stationäre Phase: Lösung von 10 g Äthencarbonat in 20 ml Methanol  
 Mobile Phase: Schwerbenzin (Kp. 180-190°).

D: S = Pregnan-3,11,20-trion

Stationäre Phase: Lösung von 10 g Äthencarbonat in 3.75 ml Methanol  
 Mobile Phase: Cyclohexan.

E: S = Pregnan-3,11,20-trion.

Stationäre Phase: Lösung von 10 g Äthencarbonat in 3.75 ml Methanol  
 Mobile Phase: Toluol.

langsamer als die entsprechende  $3\alpha,6\beta$ -Diacetoxyverbindung (XIV). Genügend scharfe Trennungen werden erreicht zwischen  $5\alpha$ H- und  $5\beta$ H-Steroiden bei Vorhandensein von nur einer Carbonylfunktion im Ring A. Auch bei stärker polaren Verbindungen, wie z.B. XXVIII und XXX, ist der Unterschied zwischen einem konjugierten Dien und einer Verbindung mit isolierter Doppelbindung gross genug, um einen Trenneffekt zu bewirken. Durch Erhöhung der Äthencarbonatmenge gegenüber System A auf dem Papier laufen extrem lipophile Steroide wie  $3\alpha,6\alpha$ -Diacetoxy-24,24-diphenyl-23(24)-cholen (II) oder 4-Cholesten-3-on (I) mehrere cm hinter der Lösungsmittelfront.

Auf Grund dieser Tatsache gibt es durch Kombination verschiedener Lösungsmittel in der mobilen Phase mit unterschiedlichen Mengen Äthencarbonat pro dm<sup>2</sup> Papier im Sinne der angeführten Vorschriften, besonders für die Trennung der schwach polaren Verbindungen noch mehr Möglichkeiten, als durch die in der Tabelle I angeführten Systeme gezeigt worden ist. So lassen sich die  $R_S$ -Werte gleicher Substanzen durch Anwendung verschieden hoch siedender Benzinfraktionen in der mobilen Phase so verändern, dass die Trennwirkung um so grösser wird, je höher der Siedepunkt des verwendeten Benzins ist.

In einigen orientierenden Versuchen prüften wir die Verwendbarkeit des Systems Äthencarbonat (stationäre Phase) und Toluol (mobile Phase) zur Papierchromatographie des stark polaren Trihydroxysteroids  $11\alpha,17\alpha,21$ -Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion (Kendall's *epi*-F). Die Laufstrecke dieser Substanz beträgt im Durchlaufchromatogramm 3 cm bei einer Laufzeit von 12 Stunden. Dieses Beispiel zeigt, dass bei entsprechender Abwandlung der Bedingungen sowohl sehr stark polare als auch sehr wenig polare Steroide bei Verwendung von Äthencarbonat als stationäre Phase papierchromatographisch untersucht werden können.

## DISKUSSION

Die hohe Trennfähigkeit der Äthencarbonatsysteme kommt am besten durch den Vergleich mit anderen Systemen zum Ausdruck. Aus den Angaben von ZANDER und Mitarbeitern<sup>9</sup> lassen sich für verschiedene Bush-Systeme, die im Hinblick auf ihre Eignung besonders für Progesteron und ähnlich polare Steroide entwickelt wurden, die in Tabelle II angegebenen  $R_F$ -Verhältnisse entnehmen. Gegenübergestellt sind unsere Ergebnisse nach System B der Tabelle I, deren wesentlich grössere Werte ein direktes Mass der höheren Trennleistung darstellen.

TABELLE II

VERGLEICH DER RELATIVEN  $R_F$ -WERTE ( $R_S$ ) EINIGER STEROIDVERBINDUNGEN IN VERSCHIEDENEN CHROMATOGRAPHIESYSTEMEN ( $R_S$  Cortexonacetat = 1.00)

Substanz	Absteigende <sup>9</sup> Methode		Aufsteigende <sup>9</sup> Methode		System B der Tabelle I (Absteigende Methode)
	System a	System b	System c <sub>1</sub>	System c <sub>2</sub>	
Cortexonacetat	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Progesteron	1.33	1.46	1.62	1.89	5.42
Cholesterin	1.72	1.88			24.9
$3\beta$ -Acetoxy-5-pregnen- 20-on			2.38	3.48	25.8

REINEKE<sup>10</sup> gibt ein Verhältnis der  $R_S$ -Werte für 4-Pregnen-3,11,20-trion ( $R_S = 1.00$ ) zu Pregnan-3,20-dion ( $R_S = 3.5$ ) von 1:3.5 an. Demgegenüber steht das  $R_S$ -Verhältnis im System B der Tabelle I der entsprechenden Verbindung ohne konjugierte Doppelbindung im Ring A, des Pregnan-3,11,20-trions (XXIII) ( $R_S = 0.09$ ) zum Pregnan-3,20-dion (XII) ( $R_S = 1.33$ ) von 1:14.8.

Die in der Tabelle I angegebenen  $R_S$ -Werte der ausgewählten Verbindungen sind gut reproduzierbar. Sie vermitteln den Eindruck weitgehend konstanter Beiträge einzelner funktioneller Gruppen zur Polarität des Steroidmoleküls. Für die Polarität der untersuchten Acetoxygruppen ergibt sich folgende Abstufung:



Es wurde gefunden, dass Tosyloxygruppen unter den angeführten funktionellen Gruppen den grössten Beitrag zur Polarität der Verbindung liefern. Die Beispiele der Tabelle lassen die grössere Polarität der 20-Ketogruppe gegenüber der 11-Ketogruppe erkennen. Den geringsten, aber gerade noch deutlichen Einfluss unter den angeführten Gruppen haben Doppelbindungen, wobei ein konjugiertes Dien langsamer läuft als eine entsprechende Verbindung mit isolierter Doppelbindung. Auf Grund der festgestellten Abstufungen lässt sich der Einfluss der einzelnen Gruppen auf die Polarität des Grundmoleküls ( $C_{21}$ -Steroid) folgendermassen festlegen:



NEHER<sup>11</sup> gibt die ähnliche Reihenfolge:



an.

Es zeigt sich, dass bei Anwendung von Äthencarbonat als stationäre Phase gegenüber bisherigen Arbeiten keine wesentlichen Verschiebungen in der Reihenfolge auftreten, obwohl es sich bei den angegebenen Beispielen mit Ausnahme des Cholesterins um Verbindungen ohne Hydroxylgruppen handelt und im ganzen System nur noch die Cellulose des Papiers Hydroxylgruppen besitzt, während die stationäre Phase ein cyclischer Ester ist und als mobile Phasen verschiedene Kohlenwasserstoffe angewendet worden sind.

Bemerkenswerterweise sind bei Anwendung solcher Systeme die Abstufungen deutlicher. Damit ist die Trennmöglichkeit bei Verbindungen sehr ähnlicher Polarität grösser geworden.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Zur Papierchromatographie sehr wenig polarer Steroide (z.B. 4-Cholesten-3-on) wird Äthencarbonat als neue stationäre Phase vorgeschlagen, die es gestattet, sehr gute Trenneffekte zu erzielen.

#### SUMMARY

A method is described for the improved resolution of weakly polar steroids (e.g. separation of 4-cholesten-3-one from 1,4-cholestadien-3-one) by paper chromatography, using ethylene carbonate impregnated papers, which have hitherto not been applied.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> R. NEHER, *Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen*, Elsevier Amsterdam, 1958, S. 47, Fig. 4, System 2-6; S. 79, Tabelle 47.
- <sup>2</sup> F. MARKWARDT, *Arch. Pharm.*, 288 (1955) 82; *Naturwiss.*, 41 (1954) 139. Weitere Literatur siehe bei R. NEHER<sup>1</sup>.
- <sup>3</sup> R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 276.
- <sup>4</sup> R. F. KEMPA UND W. H. LEE, *J. Chem. Soc.*, (1961) 100.
- <sup>5</sup> J. GASPARIC, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 27 (1961) 221.
- <sup>6</sup> G. CAVINA, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 31 (1955) 1668.
- <sup>7</sup> O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 108.
- <sup>8</sup> K. R. BHARUCHA, *Experientia*, 14 (1958) 5.
- <sup>9</sup> J. ZANDER, H. SIMMER, A. M. V. MÜNSTERMANN UND E. MARX, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 529.
- <sup>10</sup> L. M. REINEKE, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1853.
- <sup>11</sup> R. NEHER, *Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen*, Elsevier, Amsterdam, 1958, S. 87.

*J. Chromatog.*, 8 (1962) 442-448