

CHROM. 17,385

Note

Die Bestimmung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion in Fermentationslösungen mittels Dünnschichtchromatographie

WOLFGANG SCHADE* und ALFRED KRAINHÖFNER

Akademie der Wissenschaften der D.D.R., Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena, 6900 Jena (D.D.R.)

(Eingegangen am 6. November 1984)

9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD) wird neben anderen C₁₉- und C₂₂-Steroiden bei der mikrobiellen Umwandlung von Sterolen durch bestimmte Mutanten von Mykobakterien gebildet¹. Dieser mikrobielle Seitenkettenabbau natürlich vorkommender Sterole hat für die Partialsynthese von Steroidhormonen in jüngster Zeit Bedeutung erlangt^{2,3}.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur mikrobiellen Umwandlung von β -Sitosterol in 9-OH-AD wurde für die Kontrolle des Fermentationsprozesses ein einfaches und schnelles Verfahren zur Bestimmung des gebildeten 9-OH-AD neben anderen Abbauprodukten in Fermentationslösungen benötigt.

Für die Analytik von Steroiden in biologischen Materialien ist die Gaschromatographie (GC) im allgemeinen gut geeignet^{4,5}. In unserem Fall versagte diese Methode, weil das 9-OH-AD unter den Bedingungen der GC nicht stabil ist, und die Derivatisierung zum Silyläther nicht einheitlich verläuft. Wir haben deshalb ein dünn-schichtchromatographisches (DC) Verfahren mit anschließender UV-spektrophotometrischer Detektion des 9-OH-AD entwickelt, das im Folgenden beschrieben wird.

EXPERIMENTELLES

Materialien

Für die Dünnschichtchromatographie wurde Silufol-UV 254, 20 × 20 cm (Kavalier, Sklárny, Tschechoslowakei) verwendet, die Folien wurden vor Gebrauch mit Methanol-Chloroform-Aceton (1:1:1) im Durchlauf gereinigt und anschließend bei Zimmertemperatur getrocknet. Der Probenauftrag erfolgte mit Mikroliter-Kapillaren, die Lösungsmittel hatten analytischen Reinheitsgrad. Für die Aufstellung von Eichkurven wurden Standardlösungen mit einem Gehalt von 20, 16, 12, 8 und 4 mg 9-OH-AD in 10 ml Äthanol (96%) zur UV-Spektroskopie hergestellt. Die UV-Messungen wurden mit einem Spektralphotometer VSU-P₂ der Firma Carl Zeiss (Jena, D.D.R.) durchgeführt.

Bestimmungsmethode

Fermentationslösung (1 ml) wird zur Abtötung der Mikroorganismen mit 1

ml Aceton versetzt, gut durchgeschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem sich die Zellmasse abgesetzt hat, werden die Analysenproben direkt aus dem Überstand der Fermentationslösung auf die DC-Folien aufgetragen. Der Probenauftrag erfolgt strichförmig in Laufrichtung, die Probenvolumina betragen $5 \mu\text{l}$ und sollen $2\text{--}10 \mu\text{g}$ 9-OH-AD enthalten. Nach dem Verdunsten der Lösungsmittel wird die Substanz durch einen Probenvorlauf mit Aceton auf eine neue Startlinie konzentriert. Die anschließende Entwicklung erfolgt in einer ungesättigten Normalkammer mit dem Laufmittel Benzen-Methanol (9:1) bei Raumtemperatur, die Laufstrecke beträgt 12 cm. Nach erfolgter Auftrennung werden die Folien 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zur quantitativen Bestimmung des 9-OH-AD werden die Substanzflecken im UV-Licht bei 254 nm markiert und mit einem Locheisen ausgestanzt. Die Folienplättchen werden in Schliffreagenzgläsern mit jeweils 2 ml Äthanol (96%) zur UV-Spektroskopie versetzt und unter Schütteln während 10 min bei Raumtemperatur eluiert. Die Extinktionsmessung der Lösungen erfolgt bei 241 nm, 22°C , Schichtdicke 1 cm gegen reines Äthanol, Blindproben und Standardproben werden in gleicher Weise wie die Substanzproben behandelt und vermessen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ein typisches DC-Chromatogramm von Fermentationslösungen zeigt Fig. 1. Das 9-OH-AD lässt sich unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen eindeutig von Nebenprodukten und anderen Inhaltsstoffen der Fermentationslösungen abtrennen.

In Fig. 2 ist eine Eichkurve dargestellt, für die das Lambert-Beersche Gesetz

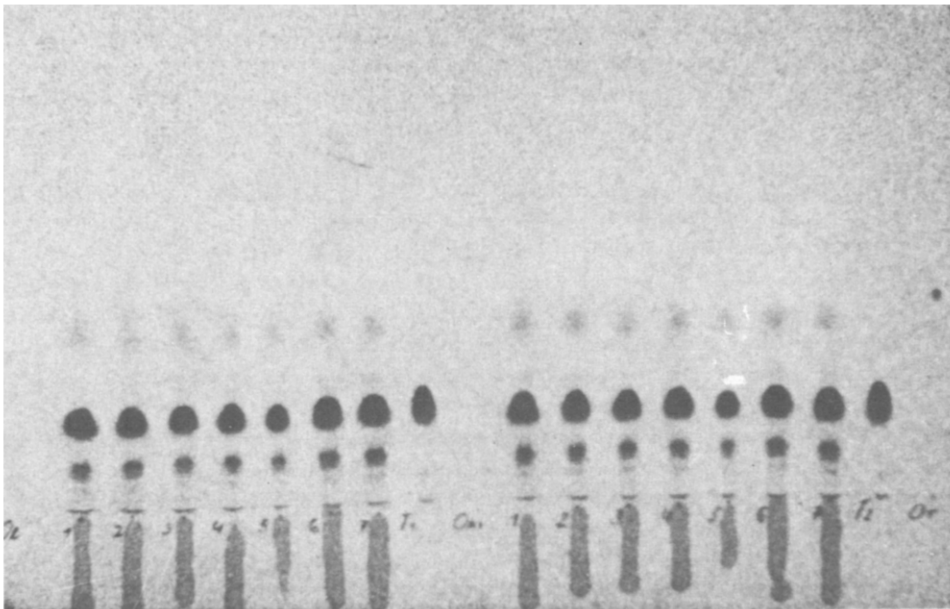


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm von Fermentationslösungen, Proben 1–7; Testlösungen 9-OH-AD T_1 , T_2 ; Blindproben O_1 , O_2 , O_3 ; Probenauftrag nach data pair-Technik.

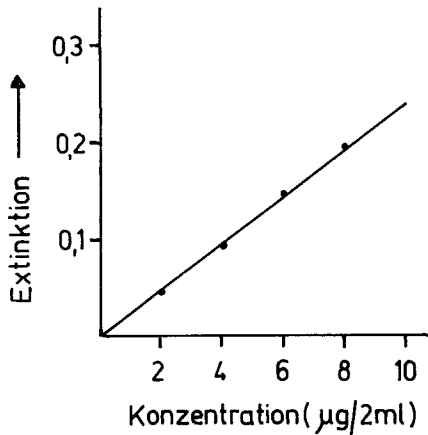


Fig. 2. Eichkurve für die UV-spektrophotometrische Bestimmung des 9-OH-AD.

im Konzentrationsbereich von 2 bis 10 μg pro 2 ml Messlösung ($0,05 < E < 0,3$) gilt. Die Standardabweichung s wurde für die Konzentrationen 2 μg und 10 μg pro 2 ml Messlösung ermittelt und ergab bei $n = 10$, $s = 0,12$ bzw. $s = 0,29$. Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe des Standards zu Fermentationslösungen überprüft und betrug im mittleren Eichkurvenbereich 95%.

Das beschriebene Verfahren ist einfach, zeitsparend und gut reproduzierbar. Sterilisation und Extraktion der Fermentationslösungen sind für die Bestimmung nicht notwendig. Durch Zusatz von Aceton werden die Mikroorganismen sicher abgetötet und das 9-OH-AD wird in Lösung gehalten, so dass eine Auftragung der Probe direkt aus der Fermentationslösung möglich ist. Die strichförmige Auftragung mittels Kapillare und der anschließende Probenvorlauf mit Aceton führen zu einer Konzentrierung der Probe auf eine scharfe Startlinie, wodurch eine gute Auftrennung des Substanzgemisches unter Ausbildung scharf abgegrenzter Flecken, die sich gut ausstanzen lassen, erreicht wird. Das Verfahren ist besonders für Untersuchungen geeignet, bei denen viele Bestimmungen gleichzeitig in kurzer Zeit durchgeführt werden müssen.

LITERATUR

- 1 M. G. Wovcha, F. J. Antosz, J. C. Knight, L. A. Kominek and Th. R. Pyke, *Biochim. Biophys. Acta*, 531 (1978) 308–321.
- 2 Ch. K. A. Martin, *Advan. Appl. Microbiol.*, 22 (1977) 29–58.
- 3 Ch. K. A. Martin and F. Wagner, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 2 (1976) 243–255.
- 4 K. B. Eik-Nes and E. C. Horning, *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.
- 5 M. B. Lipsett, *Gas Chromatography of Steroids in Biological Fluids*, Plenum Press, New York, 1965.