

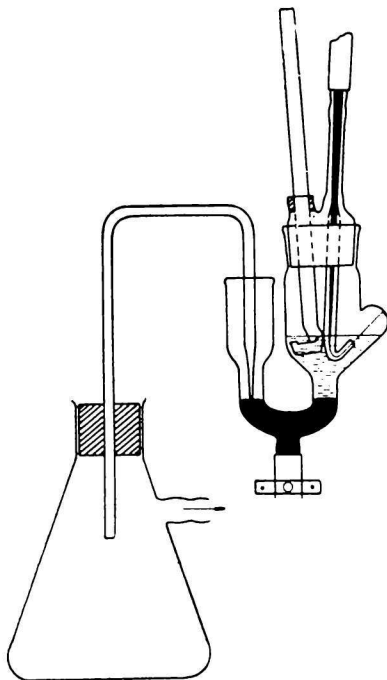
OSCILOGRAFICKÁ POLAROGRAFIE STEROIDŮ

VLADIMÍR MORÁVEK

Biochemický ústav Přírodovědecké fakulty university v Brně

Ve vodě nerozpustné steroidy lze kvantitativně stanovit oscilopolarografickou metodou v kyselých alkoholických roztocích. Je sledován vliv různých substituentů na celkový tvar křivky $dE/dt = f_1(E)$.

Sledujeme-li derivaci potenciálu podle času jako funkci potenciálu [1], dostaneme u mnohých organických látek na oscilogramu deformace křivky, způsobené změnou kapacity elektrodové dvojrůstvy v důsledku adsorpce těchto látek na rtuťové elektrodě v určitém rozmezí potenciálů. Měříme-li křivku methanolu, ethanolu, *isopropanolu*, butanolu a amylalkoholu, dostaneme různé vzájemně analogické oscilogramy. Také směsi těchto alkoholů skýtají oscilogramy, které se však tvarem poněkud liší od křivek jednotlivých složek. Když rozpustíme v alkoholu některý steroid, jejichž oscilopolarografické chování je předmětem této práce, získáme roztok, který po přidání základního

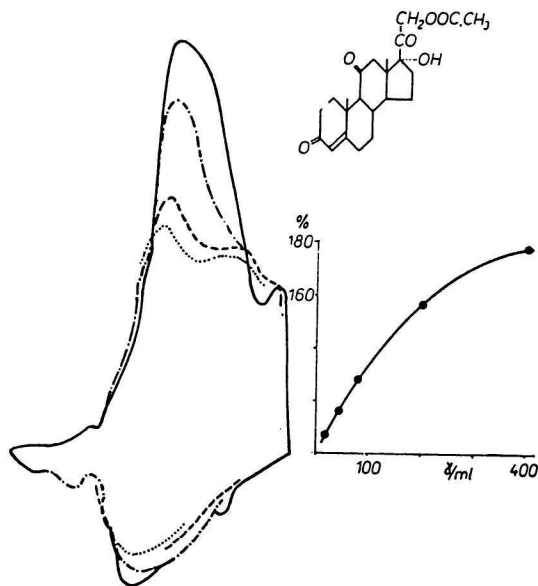


Obr. 1. Tryskavá elektroda.

elektrolytu poskytne charakteristický oscilogram. Jako elektrolytu používáme vždy HCl v konečné koncentraci 1 M. Tento elektrolyt poskytuje řadu výhod: mísí se s uvedenými alkoholy, v použité koncentraci nesráží steroidy, během měření za teploty 30 °C nehydrolysuje estery a nemění konfiguraci molekuly steroidů.

Po mnohých pokusech se stacionárními elektrodami jsme zjistili, že jsou pro naše účely nevhodné; podobně také elektrody z jiných kovů s obnovovaným povrchem skýtaly technické obtíže.

Vedle rtuťové kapkové elektrody byla použita též elektroda trysková vlastní konstrukce (obr. 1), jejíž výhodou je malá spotřeba roztoku (2—3 ml). Další výhodou spočívá v tom, že se na dně nádoby nehromadí rtuť, neboť je vodní pumpou stále odsávána; tím je zaručena konstantní délka sloupce tryskající rtuť, což má za následek stálý, naprosto klidný oscilogram. Spotřeba rtuť je poměrně velmi malá a nádobka dovoluje použití různých referentních elektrod, jako rtuťové, stříbrné nebo platinové. Jako referentní elektroda sloužily plíšky některých kovů (hlavně Pt nebo Ag) a grafit. Různé referentní elektrody skýtají poněkud od sebe sa lišící oscilogramy kapacitních jevů, způsobených alkoholy, a také roztoky steroidů, takže navzájem se dají srovnat jen ty řady, které jsou měřeny na témž druhu elektrod a s týmž alkoholem [2, 3, 4, 5, 6]. Naopak, rozdíl mezi kvalitou referentní elektrody můžeme využít pro hledání nových vztahů mezi steroidy. Různé referentní elektrody s alkoholickými roztoky steroidů se liší ve vzájemné výšce I. a II. deformace (maxima, vrcholu) a v absolutní výšce těchto maxim. Vedle tvorby zářezů si totiž všímáme též celkového vzhledu křivky; maximem nebo vrcholem definuje-



Obr. 2. Oscilogram závislosti $dE/dt = f_1(E)$ kortisonu v 1 M-HCl.

Oscilogram:

- samotný isopropanol
- - - - $5 \cdot 10^{-5}$ M kortison (20,2 μg v 1 ml)
- . - . - $1 \cdot 10^{-4}$ M kortison
- $1 \cdot 10^{-3}$ M kortison

Graf:

- abscissa: μg kortisonu v 1 ml
- ordináta: zvýšení maxima kortisonu v procentech, je-li výška maxima isopropanolu od potenciálové osy = 100

me onu část křivky, při níž hodnota derivace dosahuje maximální hodnoty (kapacita elektrodové dvojvrstvy dosahuje v tomto případě minimálních hodnot). Typické schody a zářezy mohou být vyvinuty jen u některých referentních elektrod a konečně jsou tyto elektrody různě citlivé na koncentraci steroidu v roztoku.

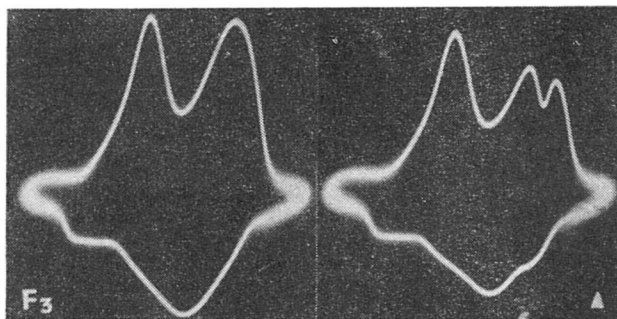
Použití směsí alkoholů je výhodné u nejtěžších rozpustných látek. Ty jsou např. rozpustné až v amylalkoholu a teprve tento roztok snese zředění s nižším alkoholem, který může být opět vhodnější k vyvolání typické deformace oscilogramu. Směs alkoholů působí vždy odlišně než jednotlivé alkoholy. Tak ethanol skýtá poměrně nízká maxima, u *iso*-propanolu pozorujeme maxima stejného tvaru, ale vyšší. Směs obou dává maxima tak vysoká jako *isopropanol*, ale I. maximum je výše než druhé, kdežto u samotných alkoholů je to naopak.

Prvé pokusy na oscilografické polarografii steroidů vykonali L. Molnár [7], J. Nosek a M. Ledvína [8]. V našem ústavu jsme vyzkoušeli vliv alkalického elektrolytu, a sice 1 M-KOH na ethanol, kde ve vyšší koncentraci než 60 % nastává jeho rozklad, u *iso*-propanolu již při 40 %. Tím pro těžko rozpustné sloučeniny, jako jsou steroly, není použitelný; stejně tak pro labilní estery, které hydrolysuje. V kyselém prostředí s HCl se alkohol ani steroidy nerozkládají a poskytují tak neměnné oscilogramy i při déle trvajícím měření v malých objemech.

K účelům analytickým může být sestrojena kalibrační křivka, znázorňující závislost výšky maxima na křivce na koncentraci [9]. Se značnou citlivostí a přesností bylo tak zjištěno množství steroidu (obr. 2), ovšem za předpokladu chemicky čisté látky. V některých případech jsme již vyzkoušeli určování steroidních hormonů ve směsi [10].

Vzhled oscilogramu je odvislý od struktury steroidu. Tento vztah byl zjištěn pro některé jednoduché substituce na jádře steranu [11]. Je-li steroid bohatý různými substitucemi a dvojnými vazbami, interferují tyto mezi sebou a k poznání takových vztahů je potřeba přeměřit ještě velmi mnoho dalších látek. Klíč k dělení steroidů začíná proměřením na tryskové elektrodě.

Všechny steroidy, které mají na 3 C hydroxyl volný nebo esterifikovaný, dávají na katodické větvi křivky při použití tryskové elektrody dvojrucholový oscilogram (obr. 3). Všechny steroidy, které mají na 3 C ketonickou skupinu nebo ketal, dávají trojvrcholovou katodickou větev. Ketoskupina na jiném uhlíku za předpokladu, že na 3 C je hydro-

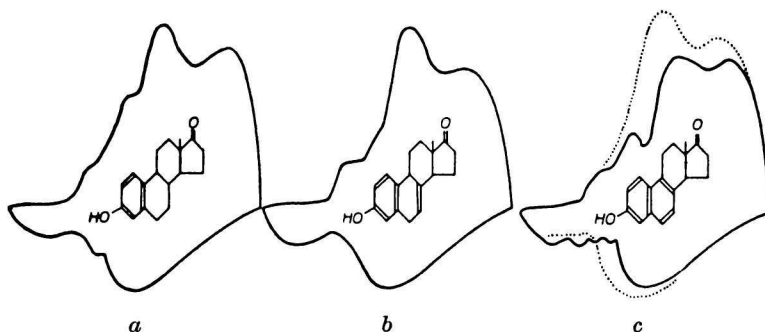


Obr. 3. Oscilogram závislosti $dE/dt = f_1(E)$ steroidů se substituentem na 3 C. Tryskavá elektroda v 1 M-HCl.

Oscilogramy:

dvojrucholový, —OH na 3 C, $5 \cdot 10^{-4}$ M methylandrosterdiol
trojvrcholový, =O na 3 C, $5 \cdot 10^{-4}$ M methyllestosteron

xyl, nedává trojvrcholový obraz, jak bylo přezkoušeno na látkách s ketoskupinou na 7 C, 11 C, 17 C a 20 C. Třetímu vrcholu u negativních potenciálů při použití tryskové elektrody odpovídá nový zářez nebo schod u negativního potenciálu při použití elektrody kapkové.

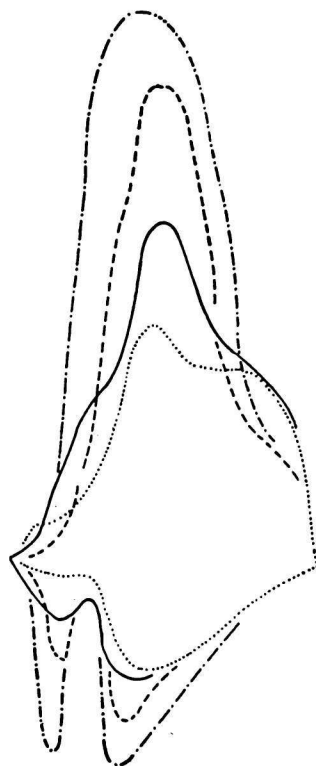


Obr. 4. Oscilogram závislosti $dE/dt = f_1(E)$ steroidů s ketoskupinou na 17 C. Kapková elektroda v 1 M-HCl. Schod až zářez na levé části katodické větve; $1 \cdot 10^{-3}$ M ($270 \mu\text{g}$ v 1 ml); a) steron, b) ekvilin, c) ekvilenin, isopropanol.

U estrogenů, mají-li současně ketoskupinu na 17 C, nebo v menší míře u steroidů na 20 C, vyskytuje se schod až zářez jen při užití kapkové (obr. 4) elektrody v levé části katodické větve oscilogramu a zářez se prohlubuje až zdvojuje s přibýváním dvojných vazeb na A-kruhu a na B-kruhu. Zářezy jsou vyvinuty také na odpovídajícím místě anodické větve.

Substituce hydroxyly snižuje maxima, naopak působí substituce ketoskupinami. Esterifikace [12] jak na 3 C, tak i na jiných místech a stejně tak prodlužování alifatického řetězu na 17 C vždy maxima zvyšuje (obr. 5). Tyto jevy jsou neodvislé od rozpustnosti dotčené látky. Poloha *cis* a *trans* je naznačena určitými odchylkami ve tvaru oscilogramu, ale pro nedostatek srovnávacího materiálu nečiníme ještě jednoznačný závěr.

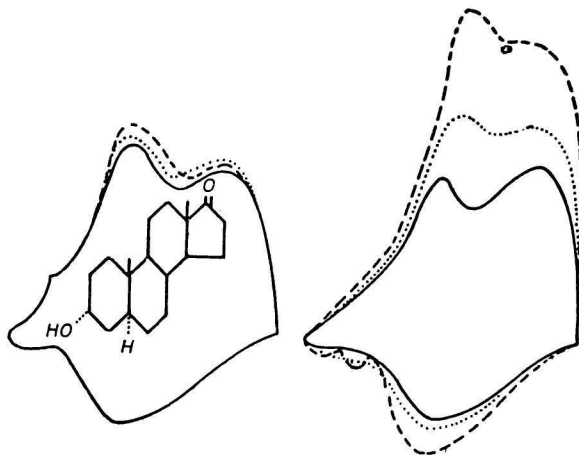
Zmínil jsem se, že reakce funkčních skupin steroidů závisí kromě elektrod také na rozpustidle. Tak v isopropanolu při použití rtuťové referenční elektrody ve shodě s právě



Obr. 5. Oscilogram závislosti $dE/dt = f_1(E)$ v 1 M-HCl esterů cholesterolu.

- isopropanol
 - cholesterol
 - - - cholesterylacetát
 - . - . cholesterylkapronát
- Koncentrace $2 \cdot 10^{-3}$ M.

uvedenými vztahy mezi konstitucí steroidu a tvarem oscilogramu jsou velmi podobné obrazce u androsteronu, testanonolacetátu, dehydroepiandrosteronu a methylandrosterodiolu. Když tyto látky určíme v ethanolu při stříbrné referenční elektrodě, můžeme prvé tři z nich dobře rozlišit a kvantitativně hodnotit, díky ketoskupině na 17 C. U čtvrté látky, kde je na tomto místě hydroxyl oscilogram snižující, našli jsme (obr. 6), že se tato látka



Obr. 6. Oscilogram závislosti $dE/dt = f_1(E)$ androsteronu v 1 M-HCl.
 a) v isopropanolu, rtuťové dno, b) v ethanolu, stříbrná referenční elektroda.
 koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M
 - - - koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ M
 — základní roztok

od oscilogramu ethanolu téměř neodlišila. Není tím ovšem řečeno, že další kombinací v elektrodách a rozpustidlech by se pro tento případ nenašla vhodnější sestava. Vždy je třeba pátrat po dalších pokusných sestavách, neboť změna jednoho faktoru přináší i jiné vztahy, které se ukáží na oscilogramu.

Při rozvrhu dalších temat vycházíme z této pracovní hypotézy: Při oscilografické polarografii steroidů v kyselém alkoholickém roztoku jde většinou o adsorpční jevy závislé na potenciálu elektrody; resultující tvar oscilogramu je dán hlavně těmito faktory: elektrolytem, kvalitou neelektrolytu nebo jeho směsí, to je rozpustidla a organické látky, kvalitou referenční elektrody, dále vzájemnou koncentrací všech látek v elektrolytické nádobce a elektrickými veličinami měřicího zařízení. Z empiricky zjištěných kapacitních jevů na elektrodě je možno vyvozovat závěry, které jsou použitelné pro kvantitativní a konstituční mikroanalýsu steroidů a které najdou aplikaci pro většinu organických sloučenin.

ОСЦИЛЛОГРАФИЧЕСКАЯ ПОЛЯРОГРАФИЯ СТЕРОИДОВ

ВЛАДИМИР МОРАВЕК

Биохимический институт Естественного факультета университета в Брно

Выводы

Стероиды можно количественно определить в кислых спиртовых растворах осциллополярграфическим методом. Изучалось не только творение зубцов, но и общий вид

кривых; максимумом называется та часть кривой, которой выражение dE/dt достигает максимального значения (емкость электродного двойного слоя достигает на этом месте минимального значения).

Вид осциллограмм обусловлен заместителями на стероидном скелете. Так напр. при применении струйчатого электрода гидроксильная или эфирная группа на 3 C проявляется двумя максимумами, затем что кетогруппа на 3 C тремя. При некоторых условиях можно определить различные стероиды возле себя. В работе описан новый тип струйчатого электрода с сосудом для 2мл раствора, который дает стабильные осциллограммы.

OSZILLOGRAPHISCHE POLAROGRAPHIE DER STEROIDE

VLADIMÍR MORÁVEK

Biochemisches Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Universität in Brno

Zusammenfassung

Die Steroide können quantitativ in sauren alkoholischen Lösungen oszillographisch bestimmt werden. Auser der Bildung der Einschnitte wird auch die gesammte Gestalt der Kurve beobachtet; als ein Maximum wird der Teil der Kurve bezeichnet, bei dem der Wert der Ableitung dE/dt einen Maximalwert erreicht (die Kapazität der Elektrodendoppelschicht erlangt hier minimale Werte).

Die Form der Oszillogramme deutet die Substitution am Steranskelet an. So z. B. bei der Anwendung der strömenden Elektrode bietet eine Hydroxyl- oder eine Estergruppe an 3 C eine Kurve mit zwei Maxima, während eine Ketogruppe an 3 C eine Kurve mit drei Maxima zeigt. Einige andere Verhältnisse erlauben es eine Reihe anderer Steroide zu unterscheiden: Es wird eine strömende Elektrode mit einem Gefäss für 2 ml beschrieben, die vollkommen ruhige Oszillogramme bietet.

OSCILLOGRAPHIC POLAROGRAPHY OF STEROIDS

VLADIMÍR MORÁVEK

Institute of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences
of the University, Brno

Summary

Steroids can be quantitatively determined oszillographically in acidic alcoholic solutions. From the shape of the curves certain substitutions can be distinguished at the sterane skeleton. Thus e. g. when using the streaming electrode hydroxyl or ester on 3 C yield a doublepeak oscillogram, while the keto group on 3 C yield a triplepeak curve. Some further relations enable us to distinguish a number of other steroids. A streaming electrode vessel for 2 ml of solution yielding a quiet and stable oscillogram is shown and described.

LITERATURA

1. Heyrovský J., Kalvoda R., *Oszillographische Polarographie mit Wechselstrom*, Berlin 1960. — 2. Salajka E., *Diplomová práce, Biochem.*, Brno 1959. — 3. Tůma A.,

Diplomová práce, Biochem., Brno 1959. — 4. Bumba J., *Diplomová práce, Biochem.*, Brno 1959. — 5. Jakubíčková J., *Diplomová práce, Biochem.*, Brno 1960. — 6. Vyhnaříková J., *Diplomová práce, Biochem.*, Brno 1960. — 7. Molnár L., *Chem. zvesti* 8, 912 (1954). — 8. Nosek J., Ledvina M., *Sborník prací VLA I*, 97 (1956). — 9. Morávek V., *Publ. Fac. Sci. Univ., Brno*, No. 400, 23 (1959). — 10. Morávek V. a spol., Referát na II. biochem. sjezdu, Praha 1960.

11. Morávek V., Kadaňka Z., Minářová L., *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk., Brno*, No. 387, 401 (1957). — 12. Morávek V., *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk., Brno*, No. 398, 389 (1958).

Diskusní příspěvky

L. Molnár je toho názoru, že není výhodné používat kyselá prostředí, kde vznikají většinou jen deformace původní křivky, když je známo, že v alkalických prostředích vznikají pěkně měřitelné zářezy.

V. Morávek ve své odpovědi uvádí, že v alkalickém prostředí lze sledovat jen omezené množství látek, právě pro jejich špatnou rozpustnost a rozklad alkoholu použitého jako rozpustidla. Vzhledem k tomu, že je sledována velká řada sloučenin, bylo nutno pracovat v prostředí vyhovujícím všem zkoumaným sloučeninám.

P. Zuman doporučuje porovnat pozorované účinky s vlivem těchto látek na kyslíková nebo jiná maxima v klasické polarografii. Otázce vztahu mezi konstitucí a adsorbovatelností bude i nadále nutno věnovat velkou pozornost. Zřejmě se zde jeví souvislost mezi rozpustností a adsorbovatelností těchto sloučenin. Zatím co —OH skupina způsobuje zvýšení rozpustnosti, —OC skupina působí opačně a tudíž zvyšuje adsorbovatelnost.

V. Morávek podotýká, že nepozoroval ve všech případech souvislost mezi adsorbovatelností a rozpustností sloučeniny.

G. Dušínský, podobně jako řada dalších diskutujících, podotýká, že je velmi obtížné sledovat steroidy v biologickém materiálu i roztocích KOH, kde tyto látky skýtaly velmi pěkné zářezy, natož potom v prostředích kyselých, kde jevy na křivce jsou velmi komplikované, neboť v roztoku jsou ještě další látky skýtající kapacitní účinek.

L. Molnár doplňuje, že v biologickém prostředí není jen obtíž při pozorování kapacitních zářezů, ale i zářezů redukčních, např. u anorganických depolarisátorů.

V. Morávek v odpovědi uvádí, že prozatím zkoušel pouze směsi čistých látek. U biologického materiálu bude třeba asi nejprve provést chromatografickou izolaci. Úkol vyřešit stanovení těchto látek v biologickém materiálu je velmi obtížný, zato však velmi důležitý.

R. Pleticha — Lánský doporučuje věnovat velkou péči isolačním metodám, neboť je velmi mnoho příkladů, kdy látka v „čistém“ stavu skýtá dobře vyvinuté zářezy, zatím co za přítomnosti technických materiálů je vzhled zářezy silně ovlivňován a stanovení znemožněno.

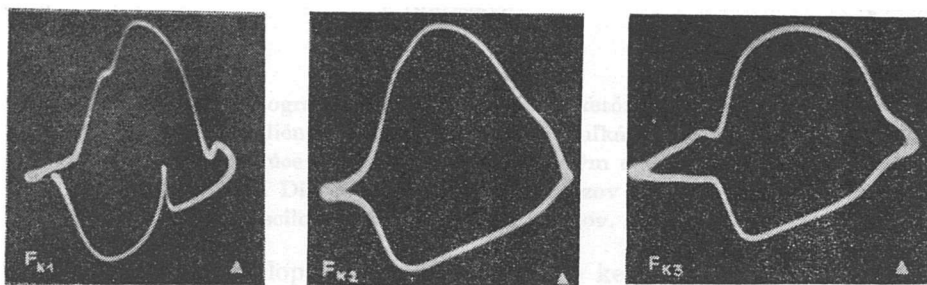
R. Kalvoda závěrem diskutuje otázku podstaty vlivu referentní elektrody na vzhled křivky. (Tento diskusní příspěvek je uveden zvlášť.)

Robert Kalvoda

Diskusní příspěvek k práci V. Morávka Oscilografická polarografie steroidů

Změny tvaru oscilopolarografických křivek při použití různých referentních elektrod jsou způsobeny změnou stejnosměrné složky. Referentní elektroda totiž ovlivňuje celkový stejnosměrný proud procházející roztokem, proto se může v některých případech, kdy vzhled křivky, příp. tvorba některých zářezů je značně závislá na síle stejnosměrného

proudu, stát, že s různými referentními elektrodami získáme různé křivky. Toto si můžeme demonstrovat na pokusu, kdy při použití různých referentních elektrod v roztoku 0,5 M-HCl obsahujících methanol—amylalkoholický roztok desoxykortikosteronacetátu získáme u každé referentní elektrody při různých stejnosměrných složkách v podstatě tři typy křivek (oscilogram 1a—c). Z tab. 1 je patrné, že vzhled křivky závisí na stejnosměrné



Oscilogram 1. Vliv změny stejnosměrné složky na vzhled křivky desoxykortikosteronacetátu v 0,5 M-HCl za přítomnosti methanolu a amylalkoholu. Údaje ke křivkám A, B, C jsou v tab. 1.

Tabulka 1

Vliv stejnosměrné složky na tvar oscilogramu

Referentní elektroda	Typ křivky	Nastavená stejnosměrná složka (μA)	Změřená stejnosměrná složka (μA)
Hg-dno	A_1	4,1	2,6
	B	8,0	4,8
	C	11,5	7,0
grafit	A_2	4,1	1,6
	B	8,0	3,7
	C	11,5	5,9
Pt	A_1	4,1	2,4
	B	8,0	4,8
	C	11,5	6,6
Sn—Cu	A_2	2,0	2,0
	B	4,1	3,7

Poznámka: Z řady fotografických záznamů bylo zjištěno, že křivky jsou jen tehdy zcela shodné, je-li shodná i stejnosměrná složka. Objeví-li se při nastavení stejné stejnosměrné složky na panelu přístroje malé odchýlky v tvarech křivky (projevující se např. různou hloubkou zářezů), je vždy možno naměřit rozdílné hodnoty stejnosměrného proudu v polarisačním obvodu (viz křivky A_1 a A_2 příp. rozdíly u elektrody Sn—Cu v tab. 1).

složce. Vhodným nastavením stejnosměrné složky příslušným ovládacím knoflíkem můžeme změny vyvolané jinou referentní elektrodou vykompenzovat, takže získáme opět křivky stejného vzhledu.

Adresa autora:

Prof. dr. Vladimír Morávek, Brno, Kotlářská 2, Biochemický ústav Přírodovědecké fakulty.

