

IZOLÁCIA Δ^4 -PREGNÉN-17 α ,20 α ,21-TRIOL-3,11-DIÓNU ENDOGENNEHO PÔVODU

MICHAL Š. KANDRÁČ

Laboratórium pre endokrinológiu a metabolizmus Karlovej univerzity v Prahe

Desiatky biochemických prác svedčia o tom, že pečeň obsahuje enzýmy, ktoré rozličným spôsobom menia štruktúru prirodzených alebo umelých steroidov. V pokusoch in vitro [1—14] a in vivo [15, 16] sa zistilo, že pečeň obsahuje veľmi aktívnu steroidnú Δ^4 -3-ketoreduktázu [1, 2, 7, 8, 10], ktorá redukuje Δ^4 -3-ketoskupinu 19-uhlíkatých, ako aj 21-uhlíkatých steroidov. Okrem toho sa v pečeni zistila i 20-ketoreduktáza [6, 8, 10—14] a 11-ketoreduktáza nadobličkových steroidov [6, 12, 14].

Napriek uvedeným zisteniam nebol dosiaľ podaný in vivo priamy dôkaz o tom, že by sa u ľudí vyskytoval určitý endogénny steroid, ktorý by v dôsledku štruktúrnych charakteristík dokazoval platnosť vyvođených záverov enzymatického štúdia in vitro alebo by odobril niektoré zistenia in vivo, vyplývajúce z metabolickej premeny exogénnych označených steroidov [15—17].

V tejto práci uvádzame izolačný postup a identifikáciu endogénneho steroidu vylučovaného močom u ľudí, ktorým je Δ^4 -pregnén-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-dión. Tento steroidný metabolit vylučovaný močom pri niektorých cirkózach v množstve až 700 μ g za deň objasňuje defekt metabolizmu nadobličkových steroidov u ľudí s cirkózou pečene.

Názvoslovné poznámky

Adrenosterón = Δ^4 -androstén-3,11,17-trión.

Kortizol = (Kendallova) F látka = Δ^4 -pregnén-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dión.

Kortizón = (Kendallova) E látka = Δ^4 -pregnén-17 α ,21-diol-3,11,20-trión.

Reichsteinova U látka = Δ^4 -pregnén-17 α ,20 β ,21-triol-3,11-dión.

Experimentálna časť

Extrakcia moču

Priebehom 24 dňov sa celodenné množstvo moču po okyslení na pH 1,5—2,0 (HCl) okamžite extrahovalo trikrát 2/3 objemom destilovaného chloroformu. Chloroformové extrakty sa pretrepali jedenkrát 1/20 objemu 0,1 N-NaOH a dvakrát 1/20 objemu vody. Po vysušení bezvodým síranom sodným sa chloroformový extrakt každý deň odparil do sucha.

Izolácia steroidu

Olejovité odparky rozpustené v metanole sa naniesli na 22 papierových chromatogramov Whatman 1 v preparatívnom meradle (24 $\times$ 46 cm). Po strane chromatogramov sa naniesla štandardná vzorka Reichsteinovej U látky, inokedy len vzorky kortizolu a kortizónu. Chromatogramy sa impregnovali roztokom 30 % formamidu v acetóne

a vyvíjali sa zostupne chloroformom $2\frac{1}{2}$ až $3\frac{1}{2}$ hodiny. Každý chromatogram sa detegoval ultrafialovou kontaktnou fotografiou [18], pričom ako zdroj ultrafialového žiarenia sa použila 30 W germicidálna lampa značky Philips TUV s UG 5 filtrom. Na chromatogramoch sa ceruzkou vyznačila zóna absorbujúca v ultrafialovej oblasti pri rovnakom R_f ako štandard Reichsteinovej U látky. (Pohyblivosť izolovaného steroidu pozri v tab. 1.)

Tabuľka 1

Pohyblivosť Δ^4 -pregnén- $17\alpha,20\alpha,21$ -triol-3,11-diónu (izolovaná látka) a Reichsteinovej U látky (štandardná vzorka)

	R_f	R_F	R_E	cm/h	R_f	R_F	R_E	cm/h
	Izolovaná látka				Reichsteinova U látka			
formamid 30 %/chloroform	0,52	1,54	0,78	7,4	0,505	0,149	0,76	7,3
propylénglykol 20 %/toluén	—	0,84	—	0,104	—	0,75	—	0,094
(70 hodín)								
etylénglykol 30 %/benzén—	0,132	—	—	1,8	0,116	—	—	1,6
—chloroform (1 : 1)								
etylénglykol 30 %/benzén—	—	1,0	—	0,508	—	0,885	—	0,450
—chloroform (4 : 1) (24 hodín)								
Bushov C systém pri 22 °C								
(toluén—etylacetát—metanol—	0,154	0,56	0,32	2,2	0,154	0,56	0,32	2,2
—voda 9 : 1 5 5)								
20 $\alpha,21$ -diacetát					20 $\beta,21$ -diacetát			
formamid 30 %/ <i>n</i> -hexán—benzén	0,104	—	—	1,85	0,104	—	—	1,85
(1 : 1)								
benzén—cyklohexán—metanol—	0,488	—	—	5,27	0,488	—	—	5,27
—voda (4 : 4 : 2 : 1) pri 22 °C								

Vysvetlivky: R_F = relatívna pohyblivosť voči kortizolu; R_E = relatívna pohyblivosť voči kortizónu. Použitý papier Whatman 1.

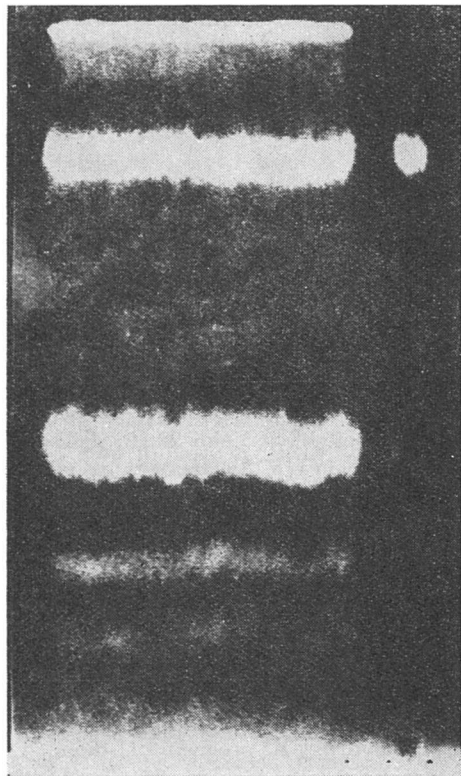
Z vystrihnutého pásika sa ultrafialovo absorbujúce látky eluovali 80 % metanolom a eluáty sa odparili do sucha. Zvyšok sa 30 minút vákuoval pri teplote 60—70 °C.

Suchý zvyšok sa rozpustil v metanole a naniesol sa na 16 preparatívnych chromatogramov Whatman 1 (premytých 80 % metanolom) o rozmerech 21 × 46 cm. Chromatografovalo sa v systéme Bush C [19] pri 22 °C. Detegovalo sa kontaktnou ultrafialovou fotografiou. V systéme Bush C sa od izolovanej látky (R_f 0,154) oddelilo niekoľko ďalších látok s vyššími R_f hodnotami. Niektoré z nich patria medzi močové pigmenty. Príklad chromatogramu v tomto systéme je na obr. 1.

Zóny izolovaného steroidu absorbujúce ultrafialové svetlo po označení na chromatogramoch sa vystrihali a eluovali metanolom. Časť získanej látky sa použila na zistenie pohyblivosti v rozličných chromatografických systémoch (tab. 1). Metanol sa oddestiloval za zníženého tlaku pri teplote pod 45 °C.

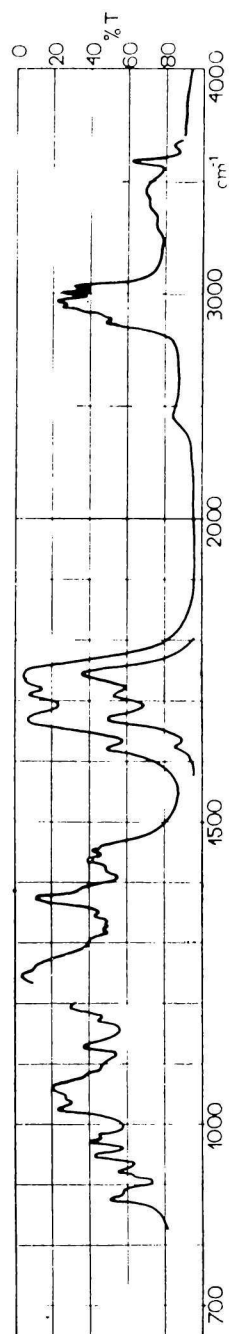
Chromatografia na stĺpci Florisilu

Sušina sa rozpustila v 20 ml chloroformu a chromatografovalo sa na stĺpci Florisilu o rozmeroch 6 × 0,8 cm. Použil sa Florisil fy Floridin Company, Tallahassee, Florida, USA kvality 60/100 Mesh. Prvý eluát 30 ml chloroformu neobsahoval nijakú zlúčeninu.



Obr. 1. Preparatívny chromatogram steroidu izolovaného v systéme Bush C pri 22 °C.

Vpravo štandard 1⁴-pregnén-17 α ,20 β ,21-triol-3,11-diónu; papier Whatman 1, ultrafialová kontaktná fotografia.



Obr. 2. Infračervené spektrum 20 α ,21-diacetoxi-17 α -hydroxy-1⁴-pregnén-3,11-diónu (asi 10 % roztok v chloroforme).

Látka sa desorbovala zo stĺpca Florisilu kvantitatívne zmesou 60 ml chloroform—acetónu (1 : 1). Ďalšie eluáty (60 ml acetónu a 40 ml metanolu) už neobsahovali nijakú látku. Pri pokusoch o kryštalizáciu z rozličných rozpúšťadiel sa z metanolu získali drobné ihličkovité kryštálky, ktoré mali vyšší bod topenia než Reichsteinova *U* látka (b. t. 212—216 °C).

Acetylácia a čistenie na stĺpci silikagél

Po dôkladnom vysušení sa izolovaný steroid (9,9 mg) 24 hodín acetyloval zmesou 1,7 ml pyridínu a 1,0 ml anhydridu octového pri izbovej teplote. Po pridaní 10 ml metanolu sa zmes odparila do sucha vo vákuu. Acetylovaná látka sa prečistila chromatografiou na stĺpci silikagél (60—120 Mesh) o rozmeroch 4 × 0,8 cm. Prvý eluát 25 ml zmesi metylénchlorid—petroléter (b. v. 60—80 °C) v pomere 1 : 1 neobsahoval nijakú zlúčeninu. Acetylovaná látka sa získala v druhom eluáte 25 ml metylénchloridu s obsahom 4 % metanolu. Kryštalizáciou acetylovanej látky zo zmesi acetón—éter (1 : 1) sa získalo 11,4 mg bielych šupinovitých kryštálikov, ktoré mali b. t. 268—271 °C (Koflerov blok, bez korekcie).

Skupinové charakteristiky

Okrem uvedených vlastností sa zistilo, že izolovaná látka má maximum v ultrafialovom svetle pri 240 m μ (Beckman, 1 cm, metanol). Pri detekcii NaOH [19] fluoreskuje v ultrafialovom svetle. Látka neredukovala alkalický roztok modrého tetrazólia, čo svedčilo proti prítomnosti α -ketolovej skupiny. Negatívna Porter—Silberova reakcia [29] nesvedčila o prítomnosti pobočného reťazca dihydroxyacetónového typu. Pri oxydácii kyselinou jodistou [22] vznikal adrenosterón (zistený chromatograficky). V systémoch 30 % formamid/*n*-hexán—benzén (1 : 1) a benzén—cyklohexán—metanol—voda (4 : 2 : 1) 20,21-diacetát izolovanej látky mal rovnakú pohyblivosť ako 20 α ,21-diacetoxy-17 α -hydroxy- Δ^4 -pregnén-3,11-dión, pripravený acetyláciou 11 β ,17 α ,20 α ,21-tetrahydroxy- Δ^4 -pregnén-3-ónu a ďalšou oxydáciou zmesou pyridín—CrO₃ [20].

Tieto výsledky poukazujú na to, že izolovaným steroidom je Δ^4 -pregnén-17 α ,20 ξ ,21-triol-3,11-dión. Vyšší bod topenia izolovaného steroidu, než je bod topenia Reichsteinovej *U* látky [23—25], ako aj vyšší bod topenia 20,21-diacetátu izolovanej látky svedčil pre 20 α -epimér.

Meranie infračerveného spektra

Infračervené spektrum 20,21-diacetátu sa meralo v 10 % chloroformovom roztoku v 0,1 mm kyvete na spektrofotometri firmy Zeiss model UR-10 (obr. 2). Spektrum bolo úplne identické so spektrom 20 α ,21-diacetoxy-17 α -hydroxy- Δ^4 -pregnén-3,11-diónu, vyobrazenom v atlase infračervených spektier steroidných zlúčenín [26, 27]. Tvar infračerveného spektra v charakteristickej „fingerprint“ oblasti (800—1400 cm⁻¹) 20,21-diacetátu izolovaného steroidu súhlasil s tvarom spektra 20 α ,21-diacetoxy-17 α -hydroxy- Δ^4 -pregnén-3,11-diónu a líšil sa od tvaru spektra 20 β ,21-diacetátu Reichsteinovej *U* látky, teda 20 β -epiméru. Infračervené spektrum nasvedčovalo aj tomu, že izolovaná látka je 20 α -epimér Reichsteinovej *U* látky.

Diskusia a záver

Steroid izolovaný z moču u ľudí je podľa uvedeného 20 α -epimér Reichsteinovej *U* látky. Táto látka sa dosiaľ zistila len v extraktoch z nadobličiek ošípaných a hovädzieho dobytku [21]. R. Neher a spolupracovníci [21] uvádzajú bod topenia 20 α ,21-diacetátu (z éter—acetónu 1 : 1) 277—280 °C.

V ľudskom moči po podávaní adrenokortikotropného hormónu N. J. Holness a spolupracovníci [23] zistili látku, ktorá mala rovnaké R_f hodnoty ako Reichsteinova U látka, teda 20 β -epimér. Uvedení autori však nezískali látku v čistom stave, preto je možné, že takisto šlo o 20 α -epimér. Ako totiž vidieť v tab. 1, R_f hodnoty obidvoch epimérov sú v niektorých chromatografických systémoch úplne rovnaké, inde sa líšia len nepatrne. Výskyt Δ^4 -pregnén-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-diónu v moči pri niektorých cirhózach vo veľkom množstve poukazuje na zvýšenie aktivity 11 β -hydroxysteroidnej dehydrogenázy, ako aj 20-ketoreduktázy. O tom však budeme hovoriť v ďalších publikáciách. Naše zistenie okrem toho vysvetľuje jednu z príčin zvýšeného vylučovania tzv. „formaldehyd uvoľňujúcich látok“ v moči pri cirhózach [28].

Ďakujem inž. J. Píthovi a S. Vašíčkovej z Fyzikálno-chemického ústavu ČSAV Prahe za zmeranie infračerveného spektra.

Ďakujem dr. D. H. Petersonovi, The Upjohn Company, Kalamazoo, USA, dr. A. Wettsteinovi, CIBA, Bazilej, Švajčiarsko, prof. T. Reichsteinovi, ETH, Bazilej, Švajčiarsko, dr. T. F. Gallagherovi, Sloan-Kettering Institute, New York, USA, dr. W. Klyneovi, Postgraduate Medical School, London, Anglicko za poskytnutie štandardných vzoriek steroidov.

Súhrn

Opisuje sa izolácia a identifikácia Δ^4 -pregnén-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-diónu vylučovaného močom u ľudí. Nový endogénny steroid sa pri niektorých chorobách vylučuje vo vysokej (až 700 $\mu\text{g}/\text{deň}$) koncentrácii.

ИЗОЛЯЦИЯ Δ^4 -ПРЕГНЕН-17 α ,20 α ,21-ТРИОЛ-3,11-ДИОНА ЭНДОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

МИХАЛ Ш. КАНДРАЧ

Лаборатория эндокринологии и метаболизма Карлового университета
в Праге

Приводим описание изоляции и идентификации Δ^4 -прегнен-17 α ,20 α ,21-триол-3,11-диона выделенного мочей у людей. Новый эндогенный стероид выделяется при некоторых болезнях во высокой концентрации (даже 700 $\mu\text{г}/\text{сутки}$).

Поступило в редакцию 25. 10. 1961 г.

ISOLIERUNG DES Δ^4 -PREGNEN-17 α ,20 α ,21-TRIOL-3,11-DIONS ENDOGENEN URSPRUNGS

MICHAL Š. KANDRÁČ

Laboratorium für Endokrinologie und Metabolismus an der Karls-Universität
in Prag

Es wird die Isolierung und Identifizierung des im Menschenharn ausgeschiedenen Δ^4 -Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-dions beschrieben. Das neue endogene Steroid wird bei einigen Krankheiten in hoher Konzentration (bis zu 700 $\mu\text{g}/\text{Tag}$) ausgeschieden.

In die Redaktion eingelangt den 25. 10. 1961

LITERATÚRA

1. Schneider J. J., Horstman P. M., J. Biol. Chem. 191, 327 (1951). — 2. Schneider J. J., J. Biol. Chem. 199, 235 (1952). — 3. Fish C. A., Hayano M., Pincus G., Arch. Biochem. Biophys. 42, 480 (1953). — 4. Amelung D., Hubener H. J., Roka L., Meyersheim G., Klin. Wschr. 31, 386 (1953). — 5. Eisenstein A. B., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 27 (1953). — 6. Hubener H. J., Fukushima D. K., Gallagher T. F., J. Biol. Chem. 220, 499 (1956). — 7. Tomkins G. M., J. Biol. Chem. 225, 13 (1957). — 8. DeCourcy C., Schneider J. J., J. Biol. Chem. 223, 865 (1956). — 9. DeCourcy C., J. Biol. Chem. 229, 935 (1957). — 10. Recknagel R. O., J. Biol. Chem. 227, 273 (1957).
11. Caspi E., Lindberg M. C., Hayano M., Cohen J. L., Matsuba M., Rosenkrantz H., Dorfman R. I., Arch. Biochem. Biophys. 61, 267 (1956). — 12. Caspi E., Levy H., Hechter O. M., Arch. Biochem. Biophys. 45, 169 (1953). — 13. Caspi E., Hechter O. M., Arch. Biochem. Biophys. 61, 299 (1956). — 14. Axelrod L. R., Miller L. L., Arch. Biochem. Biophys. 60, 373 (1956). — 15. Peterson R. E., Wyngaarden J. B., Guerra S. L., Brodie B. B., Bunim J. J., J. Clin. Invest. 34, 1779 (1955). — 16. Peterson R. E., J. Clin. Invest. 36, 920 (1957). — 17. Fukushima D. K., Bradlow H. L., Abstr. I. medzinár. kongr. endokrinológie, Kodaň 1960, 753. — 18. Haines W. J., v *Recent Progress in Hormone Research VII*, New York 1952, 255. — 19. Bush I. E., Biochem. J. 50, 370 (1952). — 20. Poos G. I., Arth G. E., Beyler R. E., Sarett L. H., J. Am. Chem. Soc. 75, 422 (1953).
21. Neher R., Wettstein A., Helv. Chim. Acta 39, 2062 (1956). — 22. Wilson H., J. Clin. Endocr. 13, 1465 (1953). — 23. Holness N. J., Lunnon J. B., Gray C. H., J. Endocr. 14, 138 (1956). — 24. Fieser L. F., Fieser M., *Natural Products Related to Phenanthrene*, New York 1949. — 25. Shoppee C. W., *Chemistry of the Steroids*, London 1958. — 26. Dobriner K., Katzenellenbogen E. R., Jones R. N., *Infrared Absorption Spectra of Steroids I*, New York 1953. — 27. Roberts G., Gallagher B. S., Jones R. N., *Infrared Absorption Spectra of Steroids II*, New York 1958. — 28. Schedl H. P., Bean W. B., Franklin M., Ditto K., Metabolism 9, 971 (1960). — 29. Porter C. C., Silber R. H., J. Biol. Chem. 185, 201 (1950).

Do redakcie došlo 25. 10. 1961

Adresa autora:

MUDr. RNDr. Michal Š. Kandrác, Č. Sc., Praha 2, U nemocnice 1, Laborať pro endokrinologii a metabolismus KU.