

Kvantitativní stanovení esterů 7-dehydrocholesterolu a dalších steroidů chromatografií v tenké vrstvě kysličníku hlinitého*

J. BEŠTOVÁ

Východočeské chemické závody — Synthetia, n. p., Pardubice—Semtín

Adsorpční sloupcová chromatografie provitaminů a vitamínů skupiny D a některých produktů, vznikajících při jejich syntéze, je propracována zejména se zřetelem na dělení těchto látek z biologických materiálů a farmaceutických směsí. V posledních letech bylo uveřejněno několik prací i o chromatografii těchto směsí na tenké vrstvě Al_2O_3 či silikagelu s pojidlem [1, 2] nebo v tenké vrstvě Al_2O_3 bez pojidla [3, 4]. Tenkých vrstev adsorbentu bylo použito k semi-quantitativnímu či kvantitativnímu stanovení ergokalciferolu a z jiných steroidů k stanovení progesteronu a testosteronu, které byly stanoveny spektrofotometricky po chromatografii v tenké vrstvě Al_2O_3 či silikagelu a po eluci [3, 5].

V našem případě jsme použili chromatografie v tenké vrstvě Al_2O_3 bez pojidla ve spojení se spektrofotometrií ke kvantitativnímu vyhodnocování reakčních směsí syntézy vitamínu D_3 , zejména směsí po dehydrobromaci esteru 7-bromcholesterolu na ester 7-dehydrocholesterolu. Směs přicházející k analýze je roztokem reakcí vzniklých steroidů ve výševroucím, zpravidla aromatickém rozpouštědle, obsahujícím navíc látky nesteroidní, sloužící jako dehydrobromační činidlo (pyridinové báze, deriváty anilínu atd.). Směs steroidů se skládá z 30—55 % esteru 7-dehydrocholesterolu, 15—35 % esterů dalších cholestadienolů, zbytek činí estery cholesterolu, jeho hydroxyderivátů, eventuálně bromderivátů a izomerní cholestatrieny. Vzájemná interference těchto látek nedovoluje přímé spektrofotometrické vyhodnocování dehydrobromačního procesu, který je nejdůležitější fází syntézy vitamínu D_3 .

Kromě hlavní složky je možno stanovit po eluci příslušných skvrn i ostatní produkty spektrofotometrickým proměřením eluátu buď přímo v ultrafialové oblasti, nebo ve viditelné oblasti po vyvolání barevné reakce.

Experimentální část

Zařízení

Tenká vrstva byla nanášena na skleněné desky $245 \times 100 \times 2$ mm. Stěrka byla rozdělena proužky $3 \times$ otočené spofaplasti na úseky po 24 mm. K nanášení směsí na

* Prednesené na Seminári o kvantitatívnych metódach v chromatografii na papieri v Bratislave 25. apríla 1963.

chromatogram se používalo mikropipety s mikrometrickým šrouben (výrobce Glaswerke Illmenau). Eluční kolonky měly světlost 6 mm, délku 70 mm. Horní část byla rozšířena v nálevku a spodní vytažena do špičky, do níž se před použitím vkládal chomáček vaty.

Měření se prováděla na spektrofotometru SF 4; použily se 1 cm kyvety.

Chemikálie

K přípravě tenké vrstvy se používalo Al_2O_3 pro chromatografii, který byl předem neutralizován a aktivován na aktivitu IV. Pro ředění směsi a vyvíjecí soustavu se používalo rozpouštědel n. p. Lachema, Brno, pro eluce z tenké vrstvy spektrálního etanolu.

Příprava detekčního činidla [6]

Základní roztok: 2,5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve 100 ml 85 %-ní H_3PO_4 . Činidlo se připraví doplněním 8 ml základního roztoku na 100 ml H_2SO_4 konc.

Pracovní postup

Stěrkou rozdělenou úzkými proužky spofaplasti se vytvoří na desce 3 pruhy Al_2O_3 o šířce 24 mm. Na start prvního a druhého pruhu se nanáší po 500 μg derivátů esteru cholesterolu ve 100 μl cyklohexanu či petroléteru, kterým se pro nanášení ředí reakční směs; třetí pruh je volný. Nanášení stejných množství na start srovnávacího a měrného úseku je nutné, protože R_F dělených látek závisí na naneseném množství.

Chromatogram sa vyvíjí ve tmě soustavou petroléter—chloroform 10 : 1. Během 20 minut urazí čelo dráhu cca 22 cm. Poté se soustava nechá tékat ve tmě za normální teploty 10 minut a dalších 10 minut v sušárně při 40 °C.

Na chromatogramu se směs rozdělí na 3 zóny:

R_F 0,85 : 2,4,6-, (3,5,7-) a 4,6,8(14)-cholestatrieny. Eluát se měří v oblasti 280—310 $m\mu$, ve které neinterferují nesteroidní látky (xylen, pyridinové báze), přítomné na chromatogramu v téže zóně.

R_F 0,4—0,5 : estery izomerních cholestadienolů [5,7-dehydrocholesterolu, 4,6- a 6,8-(14)-cholestadien-3 β -olu] a cholesterolu s maximy v oblasti 228—294 $m\mu$, jež se na chromatogramu nedokonale od sebe dělí, jež však je možno spektrofotometricky vedle sebe dobře stanovit.

Start: estery hydroxyderivátů a bromderivátů cholesterolu, neesterifikované steroly a některé nesteroidní látky, přítomné v analyzované směsi.

Prostřední pruh chromatogramu se deteguje pokapáním detekčním činidlem. Stejně velké úseky na obou postranních pruzích, odpovídající uvedeným zónám, převedou se do elučních kolonek, kde se eluují 8 ml etanolu nejprve beztlakově, po projití první kapky pod tlakem dusíku do odměrných baněk 10 ml. Spektrofotometricky se proměří eluáty měrného úseku proti slepému úseku.

Stanovení bylo vypracováno pro zmíněné deriváty benzoátu a acetátu cholesterolu, přesnost metody byla stanovena pro benzoát a acetát 7-dehydrocholesterolu.

Při použití prodejného (alkalického) Al_2O_3 pro chromatografii docházelo jednak k hydrolyze esterů, jednak k částečné deformaci spektra esteru dehydrocholesterolu. Úbytek benzoátu 7-dehydrocholesterolu po chromatografii a eluci z prodejného Al_2O_3 pro chromatografii byl v průměru 12 %, přičemž odchylky jednotlivých stanovení dosahovaly ± 6 %.

Neutrální Al_2O_3 nemá vliv na stabilitu stanovovaných látek. Průběh spektra esterů 7-dehydrocholesterolu po eluci z chromatogramu a při přímém měření je totožný. Na velké ploše chromatogramu jsou však dělené látky citlivější na působení světla, teploty a vzdušného kyslíku než v pevném stavu. Vyžadují pro zachování uvedené přesnosti vyvíjení ve tmě, nízkou teplotu při tékání soustavy (do 40 °C) a co nejkratší styk plochy skvrny se vzduchem, zejména na světle.

Při použití neutrálního Al_2O_3 byl variační koeficient $v = 1,6 \%$ (ze souboru 30 stanovení), ve srovnání s analýzou čistého produktu bez použití chromatografie. Z toho variační koeficient pro nanášení vzorku je 0,1 %.

Rychlost provedení umožňuje použití této metody pro běžnou analytickou kontrolu.

Na experimentální části spolupracovala H. Sáagnerová.

Souhrn

Byla vypracována metoda na stanovení acetátu nebo benzoátu 7-dehydrocholesterolu v reakční směsi ze syntézy vitamínu D_3 vedle dalších steroidů a přítomných nesteroidních látek. Steroidní látky se stanoví po rozdělení na tenké vrstvě neutrálního Al_2O_3 bez pojidla a po eluci etanolem spektrofotometricky. Variační koeficient metody je 1,6 % pro benzoát 7-dehydrocholesterolu.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРА 7-ДЕГИДРОХОЛЕСТЕРОЛА И ДАЛЬНЕЙШИХ СТЕРОИДОВ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА ТОНКОМ СЛОЕ ОКИСИ АЛЮМИНИЯ

Я. Бештова

Восточночешские химические заводы — Synthesia, н. п., Пардубице—Семтин

Был разработан метод для определения ацетата или бензоата 7-дегидрохолестерола в реакционной смеси после синтеза D_3 витамина возле дальнейших стероидов и присутствующих нестероидных веществ. Стероидные вещества определяются после распределения на тонком слое нейтрального Al_2O_3 без соединительного вещества и элюции этанолом спектрофотометрическим методом. Вариационный коэффициент метода 1,6 % для бензоата 7-дегидрохолестерола.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTER VON 7-DEHYDROCHOLESTERIN UND WEITERER STEROIDE MITTELS DER DÜNNSCICHT-CHROMATO- GRAPHIE VON ALUMINIUMOXID

J. Beštová

Ostböhmsche Chemische Werke — Synthesia, Nationalunternehmen, Pardubice—Semtín

Es wurde eine Methode zur Bestimmung des Acetats oder Benzoats von 7-Dehydrocholesterin im Reaktionsgemisch aus der Synthese des Vitamins D_3 neben weiteren

Steroiden und anwesenden nichtsteroiden Stoffen ausgearbeitet. Die steroiden Stoffe werden nach der chromatographischen Trennung auf der Dünnschicht aus neutralem Al_2O_3 ohne Bindemittel und nach der Elution mittels Äthanol spektrophotometrisch bestimmt. Der Variationskoeffizient dieser Methode beträgt 1,6 % für Benzoat von 7-Dehydrocholesterin.

LITERATURA

1. Janecke H., Maass-Goebels I., *Z. anal. Chem.* **178**, 161 (1960).
2. Peerboom J. W. C., Beekes H. W., *J. Chromatography* **9**, 316 (1962).
3. Blattná J., Manoušková J., *Sborník XIX. celostátního chemického sjezdu*, 88. Brno 1962.
4. Davídek J., Blattná J., *J. Chromatography* **7**, 204 (1962).
5. Matthews J. S., Pereda V. A. L., Aguilera P. A., *J. Chromatography* **9**, 331 (1962).
6. Rosenthal H. L., Pfluke M. L., Buscaglia S., *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 318 (1957).

Do redakcie došlo 21. 5. 1963

Adresa autora:

Inž. Jana Beštová, VChZ — Synthesia, oddělení technického rozvoje, n. p., Pardubice—Semin.