

POLSKA  
RZECZPOSPOLITA  
LUDOWAURZĄD  
PATENTOWY  
PRL

## OPIS PATENTOWY

58456

Patent dodatkowy  
do patentu

Zgłoszono: 17.V.1966 (P 114 627)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 31.X.1969 r.

Kl. 42 1, 3/02

MKP G 01 n 31/08

UKD

Współtwórcy wynalazku: mgr Barbara Kamerdyniak, mgr inż. Stefan  
Włodarczyk, Danuta WesółowskaWłaściciel patentu: Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa” Przed-  
siębiorstwo Państwowe, Pabianice (Polska)Sposób rozdzielania dla celów analitycznych steroidów pochod-  
nych pregnenu z grupy ketosteroidów metodą chromatografii  
cienkowarstwowej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób rozdzielania dla celów analitycznych steroidów, pochodnych pregnenu z grupy ketosteroidów, metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Jak wiadomo, steroidy pochodne pregnenu z grupy ketosteroidów, niezależnie od cech wspólnych dla całej grupy steroidów wykazują również charakterystyczne właściwości zależne od rodzaju i liczby podstawników, podwójnych wiązań w pierścieniach oraz od przestrzennej budowy cząsteczki. Te właśnie różnice właściwości wykorzystuje się w badaniach tych związków metodami chromatografii.

Steroidy są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie, mało polarnymi, toteż do ich rozdzielania nie nadają się układy rozpuszczalników z nieruchomą fazą wodną i ruchomą fazą organiczną, stosowane w przypadku związków polarnych. W odniesieniu do wielu ketosteroidów można natomiast stosować metodę ich rozdziału na bibule nasyconej polarną substancją organiczną, za pomocą niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, nasyconego tą samą substancją polarną. Metoda chromatografii bibulowej nie jest jednak korzystna, gdyż wymaga stosowania dość dużych stężeń, co powoduje, że dokładność oznaczania jest mniejsza niż przy stosowaniu chromatografii cienkowarstwowej. Poza tym czas rozwijania chromatogramów na bibule jest również znacznie dłuższy.

2

Chromatografia cienkowarstwowa, łącząca zalety chromatografii bibulowej i kolumnowej z jednoczesnym wyeliminowaniem wad właściwych dla obu tych metod, nadaje się szczególnie do rozdzielania substancji lipofilnych o umiarkowanej polarności i umożliwia również rozdział izomerów przestrzennych. Jednakże znane z literatury układy rozpuszczalników nie pozwalają na rozdzielanie mało polarnych związków o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych, jakie wykazuje wiele steroidów pochodnych pregnenu z grupy ketosteroidów, na przykład octan cortisonu od octanu prednisonu. Znane z publikacji układy, będące mieszaninami z dodatkiem wody, są do tego celu nieodpowiednie, gdyż ulegają „wyczerpaniu”. Często cytowany w literaturze układ o składzie: heksan — 50 ml, octan etylu — 100 ml i woda — 300 ml, nie nadaje się do omawianego celu, gdyż rozdział substancji jest niedostateczny i plamy są rozmyte, co uniemożliwia ilościowe określanie zawartości badanych związków.

Sposób według wynalazku umożliwia dokładne rozdzielanie w celach analitycznych steroidów pochodnych pregnenu z grupy ketosteroidów metodą chromatografii cienkowarstwowej. Sposób ten polega na tym, że do rozdzielania badanych substancji na płytce pokrytej adsorbentem stosuje się układ rozpuszczalników złożony z octanu etylu, heksanu i dwumetyloformamidu, a zwłaszcza układ zawierający w stosunku objętościowym

60—80 części octanu etylu, 20—40 części heksanu i 1—8 części dwumetyloformamidu. Układ według wynalazku, zawierający dwumetyloformamid, nadaje się do rozdzielania wielu steroidów pochodnych pregnenu z grupy ketosteroidów, jak na przykład:  $\Delta^4$ -3-ketopregneny,  $\Delta^{1,4}$ -3-ketopregna-

dieny takie jak substancja S, substancja Reichsteina, cortison i ich analogi podstawione w różnych pozycjach grupami hydroksylowymi.

Sposób według wynalazku jest bliżej wyjaśniony w niżej podanych przykładach.

Przykład I. Na płytce pokryte żelem krzemionkowym G nakłada się próbki roztworów octanu cortisonu i octanu prednisonu w mieszaninie chloroformu z metanolem. Chromatogram rozwija się w ciągu 30 minut na drodze 12 cm, stosując układ o składzie: octan etylu — 75 ml, heksan — 35 ml i dwumetyloformamid — 4 ml. Po rozwinięciu chromatogramu płytkę suszy się i wywołuje za pomocą 50%-owego kwasu siarkowego. Następnie płytkę wygrzewa się w temperaturze 120°C w ciągu 5—7 minut. W ten sposób uzyskuje się ślady substancji w postaci plam widocznych pod lampą UV, przy długości fali 366 mμ. Otrzymane plamy octanu cortisonu wykazują świecenie jasnoniebieskie, a octanu prednisonu — żółte. Współczynniki  $R_f$  są następujące: dla octanu cortisonu 0,43 i dla octanu prednisonu 0,37.

Przykład II. Na płytkę pokrytą żelem krzemionkowym nakłada się próbki mieszaniny substancji: 3,21-dwuoc-tan-5-pregnen-3-beta,17-alfa,21-triol-20-on oraz 4-pregnen-17-alfa,21-diol-3,20-dion, rozpuszczonej w mieszaninie chloroformu z metanolem. Chromatogram rozwija się w ciągu 30 minut na drodze 12 cm, stosując układ o składzie: octan etylu — 65 ml, heksan — 25 ml i dwumetyloformamid — 1 ml. Po rozwinięciu chro-

matogramu płytkę suszy się i wywołuje za pomocą 50%-owego kwasu siarkowego i ogrzewa w temperaturze 120°C w ciągu 5—7 minut. Uzyskuje się ślady substancji w postaci plam widocznych pod lampą UV przy długości fali 366 mμ. Współczynnik  $R_f$  wynosi: substancja 3,21-dwuoc-tan-5-pregnen-3-beta-17-alfa,21-triol-20-on  $R_f = 0,95$  zaś dla substancji 4-pregnen-17-alfa,21-diol-3,20-dion  $R_f = 0,52$ .

Przykład III. Postępując jak w przykładzie I, bada się próbki mieszaniny, zawierającej: 21-octan-4-pregnen-17-alfa,21-diol-3,20-dion oraz 21-octan-4-pregnen-11-alfa,21-triol-3,20-dion. Uzyskuje się następujące wartości współczynnika  $R_f$ : substancja 21-octan-4-pregnen-17-alfa,21-diol-3,20-dion  $R_f = 0,74$  zaś substancja: 21-octan-4-pregnen-11-alfa,17-alfa,21-triol-3,20-dion  $R_f = 0,42$ .

Przykład IV. Postępując jak w przykładzie I, bada się próbki mieszaniny, zawierającej: 21-octan-4-pregnen-17-alfa,21-diol-3,20-dion oraz 21-octan-4-pregnen-11-beta,17-alfa,21-triol-3,20-dion. Uzyskuje się współczynniki  $R_f$  wynoszące: substancja 21-octan-4-pregnen-17-alfa,21-diol-3,20-dion  $R_f = 1,3$  zaś substancja 21-octan-4-pregnen-11-beta,17-alfa,21-triol-3,20-dion  $R_f = 0,85$ .

#### Zastrzeżenie patentowe

Sposób rozdzielania dla celów analitycznych steroidów pochodnych pregnenu z grupy ketosteroidów metodą chromatografii cienkowarstwowej, **znamienny tym**, że do rozdzielania badanych substancji na pokrytej adsorbentem płytce stosuje się układ rozpuszczalników złożony z octanu etylu, heksanu i dwumetyloformamidu, a zwłaszcza układ zawierający w stosunku objętościowym 60—80 części octanu etylu, 20—40 części heksanu i 1—8 części dwumetyloformamidu.