

Poznámky k použití Zimmermannovy reakce při papírové chromatografii 17-ketosteroidů*

L. STÁRKA

Výzkumný stav endokrinologický, Praha

Ke stanovení C₁₉-steroidů z biologického materiálu se používá převážně Zimmermannovy reakce; steroidní látky, reagující pozitivně za vzniku fialového zabarvení s *m*-dinitrobenzenem v alkalickém prostředí, jsou označovány jako 17-ketosteroidy (17-KS).

Pro jejich dělení papírovou chromatografií používá se zejména Zaffaroniho soustav se zakotvenou polárnější organickou fází, jako např. formamidem nebo některými glykoly. Přítomnost zakotvené fáze nebo nutnost jejího odstranění před vyhodnocením chromatogramu poněkud ovlivňuje kvantitativní stanovení 17-ketosteroidů po chromatografii; spolu s dalšími faktory je třeba tuto skutečnost uvážit při volbě vhodných podmínek stanovení 17-KS.

Experimentální část

Metodika

Papír Whatman 1 byl impregnován 30 % methanolickým roztokem glykolu nebo formamidu obvyklým způsobem. Chromatogramy byly vyvíjeny petroletherem nebo tetrachlormethanem.

Detekce byla prováděna protažením chromatogramu směsí 9 dílů 0,5 % ethanolického *m*-dinitrobenzenu a 1 dílu 45 % vodného KOH a minutovým zahřátím na 90 °C.

Stanovení 17-ketosteroidů

Metoda A

Stanovení 17-KS v odparku podle A. F. Holtorffa a F. C. Kocha [1] po eluci papíru methanolem bez předchozí detekce. Steroid byl lokalizován podle polohy standardu.

Metoda B

Zimmermannova reakce in situ a třicetiminutová eluce fialového zabarvení 3 ml ethanolu a fotokolorimetrie při 520 m μ .

Metoda C

Detekce a eluce skvrn chloroformem s 1 % kyseliny octové (2 \times 3 ml) a fotokolorimetrie 17-KS v odparku po znovuprovedené Zimmermannově reakci podle Holtorffa a Kocha s vytřepáním fialového zbarvení do chloroformu [2, 3].

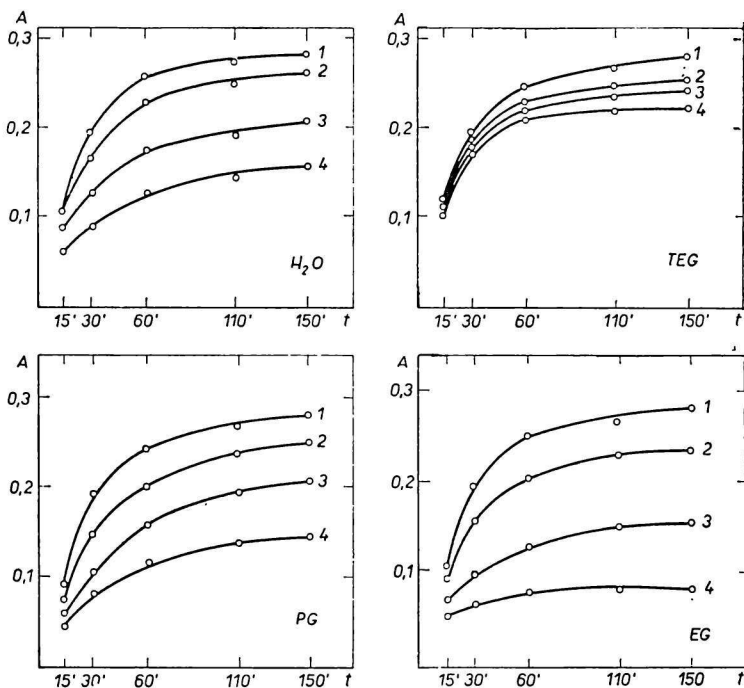
* Prednesené na Seminári o kvantitatívnych metódach v chromatografii na papieri v Bratislave 25. apríla 1963.

Metoda D

Přímá denzitometrie v procházejícím světle 30 minut po protažení chromatogramu detekčním roztokem s pomocí denzitometru podle B. Keila (vlastní konstrukce; nepublikováno).

Výsledky

Zvýšení citlivosti Zimmermannovy reakce za přítomnosti propylenglykolu na papíře zjistil již dříve G. Oertel [4]; doporučil jeho přidavek do detekčního činidla. Z tab. 1 vyplývá, že senzibilizace reakce je ještě výraznější při použití triethylenglykolu a že stoupá s molekulovou váhou glykolu. Uspokojivá citlivost na papíře impregnovaném formamidem je komplikována tmavším pozadím. Protože formamid interferuje i při stanovení 17-ketosteroidů ve zkumavce, je jej nutno z papíru před vyhodnocením chromatogramu odstranit, což není nutné při použití glykolů jako zakotvené fáze. Z obr. 1 je zřejmá interference zakotvené fáze při provedení Zimmermannovy reakce



Obr. 1. Závislost extinkce po reakci 50 µg dehydroepiandrosteronu ve zkumavce na čase t (min.) a na množství přidané zakotvené fáze. Přidáno vody, triethylenglykolu (TEG), propylenglykolu (PG) a ethylenglykolu (EG).
1. 0,00 ml; 2. 0,02 ml; 3. 0,08 ml; 4. 0,16 ml.

ve zkumavce: extinkci snižuje ve stoupajícím pořadí přídavek propylenglykolu, ethylenglykolu a vody, triethylenglykol neinterferuje, formamid stanovení ztěžuje tvorbou nespecifických chromogenů.

Citlivost a chyba stanovení dehydroepiandrosteronu jednotlivými metodami po chromatografii v soustavě triethylenglykol—petrolether—tetrachlormethan je uvedena v tab. 2.

Při fotokolorimetrii eluovaného zbarvení (metoda *B*) a při denzitometrii (metoda *D*) je důležité provést stanovení po definované době po detekci vzhledem k poklesu intenzity zbarvení s časem (obr. 2). Počáteční intenzita klesá přibližně na polovinu v průběhu jedné hodiny. Přitom se poněkud vyrovnávají rozdíly chromogenních vlastností jednotlivých 17-ketosteroidů, známé i z jejich analytického stanovení ve zkumavce, kde jsou ještě mnohem výraznější. Na době eluce skvrny při použití metody *B* příliš nezáleží, snížení výsledné extinkce prodloužením eluční doby z 30 na 60 minut nepřekročilo nikdy 3,8 %.

Tabulka 1

Závislost citlivosti stanovení dehydroepiandrosteronu na papíře s různou zakotvenou fází

Zakotvená fáze	Metoda	
	<i>B</i> extinkce/100 μg	<i>D</i> $\text{cm}^2/100 \mu\text{g}$
voda	0,155	4,2
ethylenglykol	0,340	7,7
propylenglykol	0,355	8,2
triethylenglykol	0,410	10,5
formamid	0,305	7,1

Tabulka 2

Citlivost a chyba stanovení dehydroepiandrosteronu po chromatografii v soustavách se zakotveným triethylenglykolem různými metodami

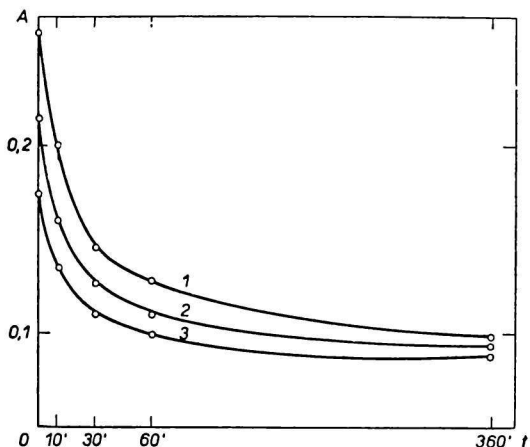
Metoda	Citlivost extinkce/100 μg	Chyba* S. D. (μg)
<i>A</i>	0,660	0,8
<i>B</i>	0,410	1,0
<i>C</i>	0,205	2,5
přímé stanovení ve zkumavce	0,690	0,7
<i>D</i>	10,5 ($\text{cm}^2/100 \mu\text{g}$)	1,5

* Chyba stanovení 20 μg dehydroepiandrosteronu při šestinásobném opakování.

Obr. 2. Pokles intenzity skvrny 17-ketosteroidů (30 μg) s časem po detekci.

1. dehydroepiandrosteron;
2. epiandrosteron; 3. 4-androsten-3,17-dion.

Měřeno metodou B.



Při provedení reakce *in situ* protažením Zimmermannovým roztokem a po následujícím oddělení nezreagovaného steroidu a jeho stanovením bylo zjištěno, že značná část (až 20—40 %) steroidu není reakcí postižena. Nezreagované množství je přímo úměrné nanášece.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem lze při kvantitativní papírové chromatografii 17-ketosteroidů doporučit používání současně zpracovávaného čistého steroidu jako standardu, nejlépe ve dvou známých množstvích v přibližném rozmezí očekávaného obsahu látky v biologickém vzorku. Pro praktické použití je pak vhodná denzitometrie nebo fotokolorimetrie fialového zbarvení eluovaného po detekci z papíru.

Souhrn

Při papírové chromatografii 17-ketosteroidů byly nejdříve přezkoušeny různé Zaffaroniho soustavy vzhledem k citlivosti detekční reakce s *m*-dinitrobenzenem (podle Zimmermanna). Jako zakotvené fáze se použilo vody, ethylenglykolu, propylenglykolu, triethylenglykolu a formamidu. Největší citlivosti jak při přímém denzitometrickém stanovení *in situ*, tak při spektrofotometrii eluátů bylo dosaženo s použitím triethylenglykolu (tab. 1).

Na chromatogramech dehydroepiandrosteronu s použitím triethylenglykolu jako zakotvené fáze byly pak porovnávány čtyři metody kvantitativního vyhodnocování:

A. Eluce skvrn do methanolu bez předchozí detekce a kolorimetrické stanovení steroidu v odparku (podle Hölterffa a Kocho).

B. Eluce skvrn steroidu do ethanolu po provedené Zimmermannově detekci a kolorimetrie eluátů.

C. Eluce skvrn steroidu do chloroformu s 1 % kyseliny octové po provedené detekci, odpaření eluátu a kolorimetrie po znovuprovedené Zimmermannově reakci s vytřepáním produktu reakce do chloroformu.

D. Přímá denzitometrie chromatogramů v procházejícím světle 30 minut po detekci a vyhodnocování denzitogramů podle plochy.

Z výsledků (tab. 2) vyplývá, že metoda *A* je nejcitlivější a nejpřesnější, metody *B* a *D* jsou dostatečně přesné a vzhledem k jejich jednoduchosti lze je doporučit k praktickému použití při sériových analýzách. Chyby těchto metod se pohybovaly v mezích běžných při kolorimetrickém a denzitometrickém vyhodnocování chromatogramů s variačním koeficientem 5 % (metoda *B*) a 7,5 % (metoda *D*).

К ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ РЕАКЦИИ ЦИММЕРМАННА ПРИ ХРОМАТОГРАФИИ 17-КЕТОСТЕРОИДОВ НА БУМАГЕ

Л. Старка

Исследовательский институт эндокринологический, Прага

При хроматографии 17-кетостероидов на бумаге были в первую очередь проверены разные системы Цаффарони смотря к чувствительности реакции проявления с *m*-динитробензолом (по Циммерманну). В качестве стационарной фазы применялась вода, этиленгликоль, пропиленгликоль, триэтиленгликоль и формамид. Самая большая чувствительность так при прямом денситометрическом определении, как и при спектрофотометрии элюата достиглась при применении триэтиленгликоля (таб. 1).

На хроматограммах дегидроэпиандростерона с применением триэтиленгликоля в качестве стационарной фазы составились четыре метода количественной оценки:

A. Элюция пятен метиловым спиртом без предварительного проявления окраски и колориметрическое определение стероидов по выпарке (по Хольтарфу и Коху).

Б. Элюция пятен стероидов этиловым спиртом после проявления окраски по Циммерманну и колориметрия элюатов.

В. Элюция пятен стероидов хлороформом с 1 % уксусной кислоты после проявления окраски, выпарка элюата и колориметрия после повторного преведения реакции по Циммерманну с экстракцией продукта реакции в хлороформ.

Г. Прямая денситометрия хроматограмм в проходящем свете 30 минут после проявления окраски и оценка денситограмм из площади.

Результаты (таб. 2) показывают, что метод *A* наиболее чувствителен и точен, методы *Б* и *Г* достаточно точны и смотря на их простоту можно рекомендовать для практики при серийных анализах. Ошибки этих методов колеблются в пределах, обыкновенных для колориметрической и денситометрической оценок хроматограмм с коэффициентом вариации 5 % (у метода *Б*) и 7,5 % (у метода *Г*).

BEMERKUNGEN ZUR ANWENDUNG DER ZIMMERMANNSCHEM REAKTION
BEI DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER 17-KETOSTEROIDE

L. Stárka

Endokrinologisches Forschungsinstitut, Prag

Bei der Papierchromatographie der 17-Ketosteroide wurden zunächst verschiedene Zaffaronische Systeme überprüft, u. zw. mit Rücksicht auf die Empfindlichkeit der Entwicklungsreaktion mit *m*-Dinitrobenzol (nach Zimmermann). Als stationäre Phase wurde verwendet: Wasser, Äthylenglykol, Propylenglykol, Triäthylenglykol und Formamid. Die grösste Empfindlichkeit sowohl bei der direkten densitometrischen Bestimmung *in situ* als auch bei der Spektrophotometrie der Eluate wurde bei Verwendung von Triäthylenglykol erzielt (Tab. 1).

Auf den Chromatogrammen des Dehydroepiandrosterons unter Verwendung von Triäthylenglykol als stationäre Phase wurden sodann vier Methoden zur quantitativen Auswertung verglichen:

A. Elution der Flecke in Methanol ohne vorangegangene Entwicklung, und kolorimetrische Bestimmung des Steroids im Abdampfrückstand (nach Holtorff und Koch).

B. Elution der Flecke des Steroids in Äthanol nach der durchgeführten Zimmermannschen Farbreaktion mit anschliessender Kolorimetrie der Eluate.

C. Elution der Flecke des Steroids in Chloroform mit 1 % Essigsäure nach durchgeführter Sichtbarmachung, Abdampfen des Eluats und Kolorimetrie nach der neuerlich durchgeführten Zimmermannschen Reaktion mit Ausschütteln des Produktes dieser Reaktion in Chloroform.

D. Direkte Densitometrie der Chromatogramme im durchfallenden Licht 30 Min. nach der Entwicklung und Auswertung der Densitogramme gemäss der Fläche.

Aus den Ergebnissen (Tab. 2) geht hervor, dass die Methode A die empfindlichste und genaueste ist, und dass die Methoden B und D ausreichend genau sind und mit Rücksicht auf deren Einfachheit für den praktischen Gebrauch bei Serienanalysen empfohlen werden können. Die Fehler dieser Methoden bewegten sich in den bei der kolorimetrischen und densitometrischen Auswertung der Chromatogramme üblichen Grenzen mit einem Variationskoeffizienten von 5 % (Methode B) und 7,5 % (Methode D).

LITERATURA

1. Holtorff A. F., Koch F. C., *J. Biol. Chem.* **135**, 377 (1940).
2. Barrolier J., Heilmann J., *Z. physiol. Chem.* **309**, 221 (1957).
3. Stárka L., Brabencová H., *Čas. lékařů čes.* **98**, 1229 (1959).
4. Oertel G., *Acta Endocrinol.* **16**, 263 (1954).

Do redakcie došlo 28. 4. 1963

Adresa autora:

L. Stárka, C. Sc., Výzkumný ústav endokrinologický, Praha, Národní třída 8.