

SZTEROIDOK NÉHÁNY CSOPORTJÁNAK
RÉTEGKROMATOGRÁFIÁS TANULMÁNYOZÁSÁBÓL
LEVONHATÓ KÖVETKEZTETÉSEK

D o k t o r i é r t e k e z é s

Írta:

Domoki Ferencné
sz. Szőnyi Gabriella

Készült:

A JATE Biokémiai, Genetikai Csoportjánál
Szeged
1974.

T a r t a l o m j e g y z é k

Bevezetés	-
Irodalmi áttekintés	2. o.
Anyagok és módszerek	15. o.
Eredmények és értékelés	21. o.
Összefoglalás	44. o.
Irodalom	47. o.

B e v e z e t é s

Éppen 10 éve kezdtük el közölni azokat a rétegekromatográfiás sajátságokat - a szterán vázas vegyületek igen széles körénél -, amelyekkel egy-egy szteroid rétegekromatográfiás viselkedése jellemezhető.

A vizsgálatok fontosak és jól felhasználhatók voltak pl. az oxim izomerek elválasztására, az átrendeződési izomerizációs reakciók fázistermék-analízisére, a szintetikus folyamatok időbeli követésére - végtermék analízisre - és elvileg alkalmasak voltak új szteroid intermedierek várható sajátságainak a leírására is stb.

Az említett irányba folyó analízisek másik sorát FEHÉR T. és munkatársai közölték.

Mindkét vizsgálatosor - de az irodalom egyéb, hasonló vonatkozású közleményei is - a BUSH és munkatársai által leírt és az említett szerző könyvében összefoglalt szteroid - papirkromatográfiás eredmények rétegekromatográfiás alkalmazását jelentik.

Munkám célja az első részben említett rétegekromatográfiás vizsgálatok és az irodalomban közölt hasonló irányú tapasztalatok összefoglalása mellett, több szteroid anyagcsoport, nevezetesen az öszttron és származékai /A/, öszttron-17-on-oxim és C-3-as helyzetben helyettesített tagok /B/, öszttron-oxim és a származékokból képzett D-homo-laktámok /C/ rétegekromatográfiás sajátságainak a leírása. Az említett anyagcsoportok /A-C/ R_M -értékeiből levonható kö-

vetkeztetések, valamint a koleszterin és 3β -helyettesített észterei /D/ rétegkromatográfiás vizsgálatából, a koleszterin és 3β -helyettesített éterek /E/ és 3β -helyettesített szénsavészterek /F/ hosszú sorainak a vizsgálatából levonható praktikus eredmények összefoglalása. Végül néhány egyéb szteroid /G/ rétegkromatográfiás összehasonlítása.

Az említetteken kívül, praktikus - összehasonlításokat megkönnyítő - módszert igyekszem munkámban megadni és megkísérlek az eddigi tapasztalatok alapján, a különböző funkciós csoportok összehasonlításával, néhány általános érvényű szabályt leírni.

Irodalmi áttekintés

A rétegekromatográfiás elválasztás-technika kialakulása a kémiai-, klinikai analizisek területén, óriási távlati lehetőségek útját nyitotta meg. A hagyományos papirkromatográfiás eljárással szemben, az új módszer számos előnnyel rendelkezett. Ezek közül a gyorsaság az, amit feltétlenül ki kell emelnünk, hiszen ez nagymértékben befolyásolhatja valamely kutatási terület fejlődését, előrehaladását. A kutatók felismerték a módszerben rejlő nagy gyakorlati jelentőséget, és így a kutatás szinte minden területén csakhamar alkalmazást nyert. Ahhoz azonban, hogy egy specifikus területen az új módszer maradéktalanul felhasználható legyen, számos elméleti probléma is megoldásra várt.

Csoportunknál szintén felmerült igénye annak, hogy gyors és jól reprodukálható rétegekromatográfiás elválasztásokkal egészítsük ki kémiai analiziseinket, így - a téma-területnek megfelelően - a szteroidok vonalán indultak meg a vizsgálatok. Az addigi, részben papirkromatográfiás tapasztalatok felhasználásával sikerült a szteroidok számos csoportjánál a rétegekromatográfiás elválasztást kidolgozni és a rétegekromatográfiás tulajdonságokra következtetni. Így pl. a $\Delta^5-3\beta$ -hidroxi-androsztén-17-on-oxim szin és anti izomerek elkülönítése is lehetővé vált megfelelő szolvens rendszerekben /1,16/.

Az oxim izomerek vizsgálata mellett a Beckmann- és Schmidt-átrendezéssel nyert homo-laktámok rétegekromatográ-

fiás tulajdonságait ugyancsak tanulmányoztuk az androsztén- és androsztán-vázás vegyületek, valamint különböző 3β -helyettesített származékaiknál /2/.

Az ösztрон és származékai, epesavak és származékaik rétegekromatográfiás gyakorlatára ugyancsak számos példát találunk közleményeinkben /3,4/, de a kolesztán-vázás anyagok vizsgálatával is régebb óta foglalkozunk /5/.

Összegezve tehát, az androsztán-, kolesztán-, öszt-rán- és kolán-váz különböző gyűrűin ketoncsoportot tartalmazó származékok, a belőlük nyert oximok és Beckmann- vagy Schmidt-átrendezéssel nyert laktámok előállítása és szerkezetigazolása szempontjából igen hasznos rétegekromatográfiás tapasztalatokat szereztünk az évek során /6,10/. Ezzel kapcsolatban megemlíteném, hogy a kezdeti értékelések szerint, mivel a szteroidok gyengén poláros karakterű vegyületek, apoláros vagy gyengén poláros karakterű oldószerek, oldószerkeverékek alkalmasak leginkább elválasztásukra. Természetesen a vegyület polaritása variál a funkciós csoportok számától és polaritásától függően. Az elválaszthatóságba beleszól a futtató rendszer összetétele, amiből adódik, hogy a dielektromos állandó vizsgálatát sem lehet mellékes szempontként kezelni, hiszen általában olyan feladattal állunk szemben, hogy egy vegyületcsoport optimális elválasztása érdekében, megfelelő oldószerelgyet kell konstruálnunk.

Sok tapasztalat gyűlt össze a fenti anyagok rétegekromatográfiás viselkedésével kapcsolatban, amelyeket maguk

az R_F -értékek jól demonstrálnak. Pl. A keton, oxim, lak-tám sorrendben általában a vándorlási sebesség csökken, ami természetes, hiszen a molekulák polaritása is hasonló módon változik. Számos megfigyelés született arra vonatkozóan is, hogy a molekula feszültebb, vagy kevésbé feszült szerkezete milyen módon befolyásolja az elválaszt-hatóságot, hogy a különböző szénatomokon oximált származékok milyen sorozatot alkothatnak, vagy hogy a szabadépe-savak és metilésztereik között milyen rétegekromatográfiás tulajdonságbeli differenciák lehetnek.

A biológiai jelentőségű androsztán-vázás vegyületek /dihidroxi-, hidroxi-keto-szteroidok/ nagy számánál vizs-gálták meg FEHÉR T. és munkatársai /7/ a szerkezet és a kromatográfiás tulajdonság összefüggéseit. Számos megfi-gyelést tettek olyan formában, hogy analizálták a funkciós csoportok megváltoztatására bekövetkező eltéréseket a ré-tegekromatográfiás sajátságokban. Pl. Az $OH \rightarrow$ keton átala-kulások, keton-csoportok etilén-ketálokká alakítása, kettőskötések redukciója, vagy OH -csoportok acetilezése olyan átalakításokat jelentettek, melyek jellemezhetők voltak rétegekromatográfiás szempontból a $\Delta R_{M(r)}$ -értékek-kel, következésképp ezen értékek ismerete, számítása segí-tett bizonyos anyagok azonosításához.

Fent említett kutatócsoport közölt értékes adatokat a biológiai jelentőségű epesavak és származékaik rétegekro-matográfiás analízisére és ezen adatok szolgáltak támpont-ként e fontos anyagok más módszerekkel kombinált /spektro-

fluorimetria illetve gázkromatográfia/ mennyiségi meghatározásához /8/.

A gyakorlatban alkalmazott módszerek elméleti vonatkozásaira térve /9,12,14/, elsősorban a papirkromatográfia területén találjuk meg azokat az elméleti megfontolásokat, amelyek a kromatográfiás folyamatok fizikai-kémiai leírását adják. Ez azt jelenti, hogy ha az anyagot papíron végzett megoszlási kromatográfiával vizsgáljuk, akkor jellemezhetjük a viselkedést a megoszlási koeficienssel. Az anyag megoszlását viszont a szabadenergia jellemzi, ami szükséges 1 mol szállításához egyik fázisból a másikba. Adódott tehát, hogy a kutatók összefüggésbe hozták a kémiai potenciált μ a molekula megoszlási koeficiensével α .

A megosztást két fázis között, hordozó nélküli rendszerben a Nernst-féle egyenlet határozza meg:

$$\alpha = \frac{C_M}{C_A}$$

ahol C_M : a mozgó fázis koncentrációja

C_A : az álló fázis koncentrációja

A megoszlási kromatográfiában viszont az anyag megoszlását a szabadenergia jellemzi - a Martin szerinti egyenlettel kifejezve:

$$\ln \alpha = \frac{\Delta \mu_A}{RT}$$

A μ_A érték a különböző funkciós csoportok /x, y, z,.../ szabadenergiájának az összegét jelenti, vagyis:

$$\Delta\mu_A = a\Delta\mu_x + b\Delta\mu_y + c\Delta\mu_z + \dots$$

Ha tehát a megoszlási koeficiens változik, ez - a két fázis összetételének változása mellett - a funkciós csoportok bevitelének és kémiai természetének a tükröződése lehet.

Ha ideális oldatban nézzük a viszonyokat, akkor /a Raoult törvény értelmében/ az alábbi összefüggéshez jutunk.

$$\mu_A^S = \mu_A^{So} + RT \ln N_A^S$$

ahol μ_A^S : A anyag aktuális kémiai potenciálja

μ_A^{So} : A anyag kémiai potenciálja meghatározott, standard körülmények között

N_A^S : A anyag moláris frakciója S fázisban

R : gázkonstans

T : abszolút hőmérsékleti állandó K°-ban

A kromatográfiás rendszerek vonatkozásában, ahol két fázissal /S és L/ és azok egyensúlyával kell számolnunk, minden vegyületre nézve felírható:

$$\mu_A^L - \mu_A^S = 0 = \mu_A^{Lo} - \mu_A^{So} + RT \ln N_A^L - RT \ln N_A^S$$

$$\text{és} \quad \Delta\mu_A = \mu_A^{Lo} - \mu_A^{So} = RT \ln \left[\frac{N_A^L}{N_A^S} \right]$$

ahol $\Delta\mu_A$: 1 mol A anyag S fázisból L fázisba való átmeneti szabadenergiája

$\frac{N_A^L}{N_A^S}$: A anyag megoszlási koefficiense az L és S fázis között

Adódik ismét a már felírt összefüggés:

$$\Delta\mu_A = RT \ln \lambda$$

Ha figyelembe vesszük az összes specifikus csoportot a molekulában, akkor a fázisátmenethez szükséges szabadenergiaváltozást, az egyes csoportok szabadenergiáinak összege fogja megszabni. Pl.:

$$\Delta\mu_A = \sum m \Delta\mu_{CH_2} + n \Delta\mu_{OH} + o \Delta\mu_{NH_2} + \dots$$

/Megjegyzés: Ha két molekula csak egy funkciós csoportban különbözik egymástól, az egyik fázisból a másik fázisba való átmenetnél csak ennek a csoportnak a szabadenergiájával kell számolnunk./

Ha X csoportot adunk A molekulához, akkor megváltozik a kémiai potenciál, hiszen a megoszlási koefficiens logaritmus is változik, ami az X természetétől és a használt fázisoktól függ, de a változás bármely kromatográfiás rendszerben konstans és független a kiindulási anyag molekulatömegétől, valamint kémiai természetétől.

Matematikailag leírva a fenti összefüggéseket:

$$B = A + X$$

$$\Delta \mu_B = \Delta \mu_A + \Delta \mu_X$$

$$\ln \alpha_B = \frac{\Delta \mu_A}{RT} + \frac{\Delta \mu_X}{RT}$$

$$\ln \alpha_B - \ln \alpha_A = \frac{\Delta \mu_X}{RT}$$

$$\ln \frac{\alpha_B}{\alpha_A} = \frac{\Delta \mu_X}{RT}$$

Azt kapjuk tehát esetünkben, hogy csak az alkalmazott fázisok szabják meg a két anyag megoszlási koefficiense közötti kapcsolatot.

Ez a kapcsolat már elvezet a kromatográfiában definiált R_f -érték fogalmához, ami az oldott anyag és az oldószer vándorlási távolságának az aránya, ugyanattól a ponttól számítva.

Az R_f -érték összefüggésben van tehát a megoszlási állandóval:

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

ahol A_L és A_S : a mozgó- és álló fázis keresztmetszeti területei, amit egységesen a futási távolsággal jelölhetünk

A fázisarányt (A_L/A_S) - a mozgó és álló fázis térfogatarányát - adott körülmények között állandónak kell tekintenünk, tehát az egyenletünk úgy módosul, hogy:

$$\alpha = K_1 \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

K_1 állandó meghatározása azonban csak megközelítésekkel történhet, így a mozgékonyág és az anyag szabadenergiájának a jellemzésére

(mivel előzőekből is következik, hogy

$$A./ \quad \ln \alpha = \ln K \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right) = \frac{\Delta \mu_A}{RT} \quad);$$

a fenti összefüggésből az R_M -értéket definiálták, ami valóban sokkal jobban leírja a különböző anyagok kromatográfiás viselkedésében észlelt különbségeket, mint az egyszerű R_f -érték. Az R_M -értékek közvetlen változnak a megoszlási hányadossal, vagy további szubsztituensek molekula építésével.

B./

$$R_M = \lg \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

Itt említem meg, hogy közelítő számításokkal definiált R_M -értékeket is közölnek gyakran az irodalomban, amikor a körülmények valódi R_f -érték mérését nem teszik lehetővé. Ilyen esetekben a következő egyenlettel számolhatunk:

$$R_M = - \lg R_T$$

ahol R_T : valamely standardhez viszonyított elmozdulását jelenti a vizsgált anyagoknak

A./ és B./ egyenleteinket átrendezve, logaritmizálva és a konstansokat összefoglalva kapjuk a következő összefüggést:

$$\lg \alpha = K_2 + R_{M(A)} = \frac{\Delta \mu_A}{RT} + K_2$$

Visszatérve az előbbi megfontolások alkalmával nyert összefüggésre /amikor két molekula fázisátmenetének összefüggését néztük, amelyek csak X csoportban különböztek egymástól/:

$$\ln \frac{\alpha_B}{\alpha_A} = \frac{\Delta \mu_X}{RT}$$

Adódik:

$$\ln (R_{M(A)} - R_{M(B)}) = \frac{\Delta \mu_X}{RT}$$

Ez a R_M -érték egy adott rendszerben állandó változást jelent, amikor az A molekulába egy X csoportot építünk és ezáltal B molekulává alakítjuk.

A molekula szabadenergiája az egyes csoportok szabadenergiáinak összegéből tevődik össze, hasonló módon az egész molekula R_M -értéke a funkciós csoportok ΔR_M -értékeinek összegeként definiálható.

$$R_{M(A)} = K + m \Delta R_{M(CH_2)} + n \Delta R_{M(OH)} + \dots + o \Delta R_{M(NH_2)} + \dots$$

Láthatjuk tehát, hogy az R_M -érték a tanulmányozott kromatográfiás rendszerben A_L/A_S arányától függ. Ennek vizsgálatával nagyon sok kutató foglalkozott és számos megfigyelés született, amennyiben megállapították pl. hogy az R_F -értékek függenek attól a távolságtól, amit az oldószertartó és az oldószer papirba lépése között mértek /va-

gyis az álló fázis változhat az oldószer mennyiségétől függően/. Bizonyos oldószereknél kimutatták, hogy egyszerű diffúziós egyensúlyoknak engedelmeskedik a papíron keresztül. Gradienst mutattak ki a papír egységnyi hosszára és az oldószer súlyára vonatkozóan. Kimutatták, hogy nincs összefüggés, vagy csak igen kicsi az oldószer densitása és felületi tenziója, valamint emelkedési sebessége között. Feltételezik, hogy bizonyos oldószerek H-hidat képeznek a papír cellulózával, illetve duzzasztják a cellulózt és ezáltal az álló fázis térfogata jobban növekszik, mint a köztiterék térfogata. Az impregnálás módja is jelentős fázisarány-változásokat okozhat. Zónákra osztott kromatogramokból állapították meg, hogy az álló és mozgó fázis által elfoglalt keresztmetszeti területek változnak. A mozgó fázis csökkenése feltehetően a kapilláris erők gyengülésének a következménye - az A_L/A_S arány tehát csökkenhet a starttól a front irányába.

A felsorolt vizsgálati eredmények egyértelműen mutatják, hogy az R_M számításához megfelelő R_F -értéket csak úgy nyerhetünk, ha a futtatás alatt alkalmazott két fázis aránya nem változik túlságosan - azaz keresztmetszeti arányuk közel állandó -, az oldott anyag koncentrációja sz. ideális oldást biztosítja és egyensúlyi koncentrációban van a két fázis között.

Az R_M -értékek alakulása az additivitás alapján nem egészen egyértelmű, hiszen bizonyos csoportok kölcsönhatása eltérő lehet valamely oldószer vonatkozásában, vagy

éppen elektromos és szterikus hatása miatt változtatja meg valamely molekula várható kromatográfiás sajátságait. Hasonló problémát vet fel az oldékonyság is, ami a mobil fázis relatív természete alapján szól bele az R_M -funkcióba.

Fenti körülmények hozták magukkal azt, hogy az R_M -értékek megkülönböztetett formáit kellett definiálni. Ezek a következők:

- a./ R_M : alapkonstans, a $\Delta R_{M(g)}$ -k összege;
- b./ $\Delta R_{M(g)}$: azt az R_M különbséget jelenti, amikor ismert R_M -értékű molekulába egy új funkciós csoportot építünk és azonos körülmények között kromatografáljuk;
- c./ $\Delta R_{M(s)}$: azt az R_M különbséget jelenti, amikor azonos anyagot két eltérő rendszerben kromatografálunk;
- d./ $\Delta R_{M(r)}$: az az R_M különbség, amikor egy molekulán belül valamely funkciós csoportot megváltoztatunk és azonos körülmények között kromatografáljuk.

Eddigiek alapján nem tudnánk különbséget tenni pl. két izomer molekula kromatográfiás viselkedése között, vagyis nem lehetne izomereket elválasztani. Tehát a helyzeti effektusok, és ezen túlmenően a szomszédos csoportok befolyása, láncelágazások, kettőskötések jelenléte, vagy pl. az alifás illetve aromás hidroxilcsoport bevitele, a

kromatográfiás viselkedés megítélésekor igen fontos - vagyis a ΔR_M -érték fogalmának kiterjesztheségi problémájához jutunk. Esetleg pl. atom ΔR_M -értékek definiálása is létjogosult lehet.

Ilyen értelemben nagyon sok adatot találunk az irodalomban, amelyek valamely homolog sorozat csoportparamétereit közlik - gyakran lineáris összefüggéseket mutatva ki bizonyos határokon belül a C-atomok számának növekedésével; illetve a lineáris összefüggéstől való eltérések és a változó R_M -különbségek okának kiderítésére történnek próbálkozások.

A R_M -értékekre vonatkozóan, főleg a szteroidok papirkromatográfiás elválasztása vonalán, nagyon sok megfigyelést találunk az irodalomban, ugyanis a szteroidok nagyon jó modellrendszereknek bizonyultak, miután egy funkciós csoport megváltoztatása nem változtatja meg szükségszerűen egy másik csoport kémiai potenciálját. Így valamely kémiai átalakítás lemérhető a ΔR_M -értékben bekövetkező változással. Jól reprodukálható eltéréseket tudtak kimutatni pl. α ill. β hidroxilcsoportokra vonatkozóan, tehát ilyen formában a térizomerek sajátságai is alapvető eltéréseket mutathatnak. Sok érdekes tapasztalat kísérté azokat a vizsgálatokat is, amelyekben a ΔR_M -érték változások a különböző oldószerhatásokra és a konformáció szerepére utaltak.

Azzal a kérdéssel kapcsolatban, hogy milyen következtetésekre lehet jutni valamely anyagcsoport rétegekromatog-

ráfiás viselkedését illetően, egy az irodalomból vett példán keresztül, a következőket említem /15/. Nevezetesen a 17-ketoszteroidok és 2,4-dinitrofenilhidrazonjaik vizsgálatakor állapították meg, hogy a származékok nagyobb mozgékonyaságuk, mint a kiindulási anyagok, és a mozgékonyaságra legnagyobb hatással a 3-OH csoport van. A 3-OH-szteroidok mozgékonyasága viszont a C-5-ös hidrogén konfigurációjától függ. Izolált kettőskötés kismértékben változtatja a szteroidok mozgékonyaságát. Az izomerek elválaszthatósága a térbeli konfiguráció függvénye, általában az ekvatoriális helyzet reaktívabb, mint az axiális. A funkcionális csoportok polaritás-változása egy csökkenő sorrendet mutat, ami a következő:



E néhány kiragadott példán túl még számos más megfigyelés válik lehetővé, amelyeket nem kívánok részletezni, hiszen az avatott érdeklődő a terület gazdag irodalmában válogathat és magának a kromatográfiás technikának fejlesztésével kapcsolatos /11,13/ kutatásokról is könnyen tájékozódhat.

A n y a g o k é s m ó d s z e r e k

"Reanal" gyártmányú Kieselgel G nach Stahl adsorbens felhasználásával készítettük el a rétegekromatográfia lapokat. 20 x 20 cm méretű üveglemezekre Desaga típusú rétegezővel, 0,25 mm rétegvastagságban vittük fel az adszorbenst és a lapokat felhasználás előtt 110 °C-on 1 órán át aktiváltuk.

Futtatásra mindig egydimenziós felszálló rendszert alkalmaztunk.

A vizsgálandó anyagokat kloroformban oldva, a lap szélétől 2 cm távolságban cseppentettük fel a rétegre. A lapok 7 mm-re merültek a futtató elegybe. A futástávolság 17-18 cm között változott. A futási idő az oldószerrendszerek összetétele szerint, 0,5-1,5 órát vett igénybe.

A szolvensek előállítására "Reanal" gyártmányú oldószereket használtunk fel - megfelelő tisztítás után. Minden esetben frissen készítettük el az elegyeket és nem alkalmaztunk előtelítést, miután az elválasztás hatásfoka ettől függetlennek bizonyult.

Az értékelés során ortofoszforsav - víz 1:1 arányú elegyével lefújtuk a lapokat és követő melegítéssel /infra lámpa alatt/ hoztuk létre a színreakciót. A foltok helyét analitikai kvarclámpa /Universal-UV-Lampe, CAMAG/Muttenz-Schweiz 366 nm/ alatt is ellenőriztük.

Az R_F -értékek számításához a magunk által szerkesz-

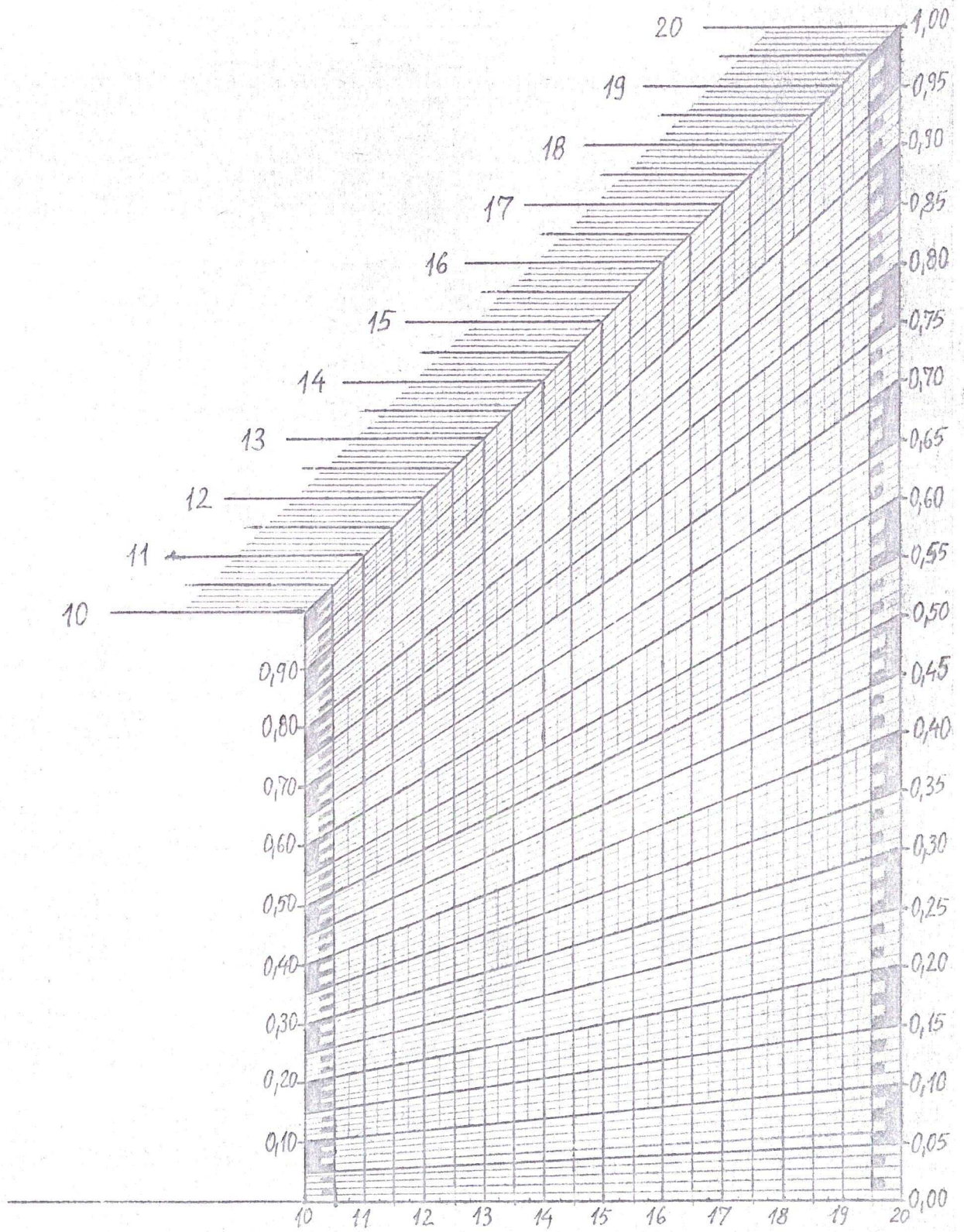
tett nomogramot használtuk fel, ami egyenes vonalakból megszerkeszthető, hiszen az R_F -érték egyenesen arányos az oldott anyag vándorlási sebességével.

A nomogram rendkívül meggyorsította a kiértékelés ezen fázisát és ugyanakkor a véletlen hibák valószínűségét a minimálisra csökkentette. Lényegében a hagyományos /távolságmérésen és osztáson alapuló/ számolás helyett, a nomogramra fektetett pausz másolat feltjainak R_F -értéke közvetlenül leolvasható a 0,00 - 1,00 skálán 0,01 pontossággal. A nomogramot 1. ábrán mutatjuk be.

A szteroidok elmozdulását a fenti módon meghatározott R_F -értékek mellett a Bate-Smith és Westall szerint definiált R_M értékekkel is jellemeztük, vagyis az

$$R_M = \lg \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \text{ összefüggés alapján minden anyag}$$

R_M -funkcióját is figyelembe vettük. Az átszámítás hiba-lehetőségeinek a kiküszöbölése érdekében hétjegyű logaritmutábla segítségével átszámítási táblázatot is készítettünk. A táblázat 0,01 R_F -egységenként foglalja magába a megfelelő R_M -értékeket és szükség esetén a közbeeső értékek lineárisan interpolálhatók.



1. ábra

Szintéziseink során előállított és így kromatográfiás vizsgálat céljából rendelkezésünkre álló anyagaink a következők voltak.

A./ Ösztron és C-3-as helyzetben helyettesített éterei:

/1/ Ösztron, /2/ -metiléter, /3/ -etiléter, /4/ -n-propiléter, /5/ -n-butiléter, /6/ -i-propiléter, /7/ -alliléter, /8/ -c-pentiléter, /9/ -benziléter, valamint /10/ -acetát, /11/ -benzoát.

B./ Ösztron-17-on-oximjai - amelyek az A./ csoportban felsorolt származékok megfelelői /1-11/.

C./ Ösztron-D-homo-laktámok - hasonlóan az A./ csoport tagjainak megfelelői /1-3 és 5-11/.

D./ Koleszterin és 3 β -helyettesített észterei:

/1/ Koleszterin, /2/ -formiát, /3/ -acetát, /4/ -propionát, /5/ -butirát, /6/ -valerilát, /7/ -kapronát, /8/ -kaprilát, /9/ -kaprinát, /10/ -undekanát, /11/ -laurát, /12/ -tridekanát, /13/ -mirisztát, /14/ -palmitát, /15/ -sztearát, /16/ -undecilén-/10/-át, /17/ -oleát, /18/ -benzoát, /19/ -cinnamát.

E./ Koleszterin és 3 β -helyettesített éterei, valamint halogén származékai:

/1/ Koleszterin, /2/ -metiléter, /3/ -etiléter, /4/ -n-propiléter, /5/ -n-butiléter, /6/ -amiléter, /7/ -oktiléter, /8/ -lauriléter, /9/ -i-propiléter, /10/ -terc.-butiléter, /11/ -benziléter, /12/ -klorid, /13/ -jodid, /14/ -bromid.

F./ Koleszterin és 3 β -helyettesített szénsavészterei:

/1/ Koleszterin, /2/ -metilkarbonát, /3/ -etilkarbonát, /4/ -amilkarbonát, /5/ -oktilkarbonát, /6/ -i-propilkarbonát, /7/ -i-butilkarbonát, /8/ -benzilkarbonát.

G./ Néhány androsztán- és kolesztán-vázis vegyület, valamint epesav-származékok:

- /1/ 3-keto-12 α -acetoxi-kólsav-metilészter
- /2/ 3 α -acetoxi-6-keto-hiidezoxikólsav-metilészter
- /3/ 3 α ,12 α -diacetoxi-7-keto-kólsav-metilészter
- /4/ 3 α ,7 α -diacetoxi-12-keto-kólsav-metilészter
- /5/ 7-keto-kolesztán
- /6/ 3 β -acetoxi-6-keto-kolesztán
- /7/ 3 β -benzoiloxi-6-keto-kolesztán
- /8/ 3 β ,17 β -diacetoxi-5 α -androsztán-6-on
- /9/ 7-keto-koleszterin
- /10/ 3 β -acetoxi-7-keto-koleszt-5-én
- /11/ 3 β ,17 β -diacetoxi-7-keto-androszt-5-én

Fenti anyagcsoportosítást követve, az alábbi /római számokkal jelölt/ oldószerrendszerekkel végeztük kísérleteinket.

A.-C./ Anyagcsoportnál:

- I Benzol-metanol (95:5)
- II Benzol-metanol (9:1)
- III Benzol-etanol (9:1)
- IV Benzol-éter (5:5)

- V n-Heptán-aceton (2:1)
- VI n-Heptán-aceton (3:1)
- VII Kloroform-aceton (9:1)
- VIII c-Hexán-kloroform-ecetsav (7:2:1)
- IX Ecetsav-c-hexán-kloroform (1:2:2)

D./ Anyagcsoportnál:

- X c-Hexán-1% metanol
- XI c-Hexán-kloroform (6:4)
- XII c-Hexán-kloroform (8:2)
- XIII c-Hexán-éter (9:1)
- XIV Kloroform
- XV Benzol
- XVI Benzol-petroléter (5:5)
- XVII Benzol-petroléter (8:2)

E./ Anyagcsoportnál:

- X, XI, XII, XVI, valamint a
Koleszteril-klorid, -jodid, -bromid esetén:
- XVIII c-Hexán
 - XIX c-Hexán-n-heptán (1:1)
 - XX i-Oktán
 - XXI i-Oktán-széntetraklorid (95:5)

F./ Anyagcsoportnál:

- X, XI, XII, XVI

G./ Anyagcsoportnál:

- I, II, VIII

E r e d m é n y e k é s é r t é k e l é s

Kísérleteink során megvizsgált szteroid molekulák rétegekromatográfiás viselkedésével kapcsolatban általában elmondhatjuk - már a különböző alapvázakat tekintve is -, hogy igen eltérő sajátságokkal találkoztunk. Gyakran meglepő, nem várt eredményeket kaptunk a különböző éter- és észter-helyettesített sorozatok összehasonlításakor is. Ha figyelembe vesszük, hogy bármely tulajdonság, vagy jellemző összefüggés mindig egy adott kromatográfiás rendszer vonatkozásában helytálló, akkor a fent említett változó viselkedésmódok további variációs lehetőségével is számolnunk kell.

Az említettek értelmében, kísérleti eredményeink rendszerezése és áttekinthetősége érdekében, a nyert adatokat I.-VII. Táblázatban foglaltuk össze A./-G./ anyagcsoportoknak megfelelően. A táblázatok felölelik valamennyi vizsgált vegyület R_f - és R_M -értékét, molekulaszúlyát és olvadáspontját, az alkalmazott oldószerrendszereket, valamint a foszforsavas színreakció észleléseit.

A rétegekromatográfiás sajátságok elemzéséhez az R_M -érték és molekulaszúly /Ms/ összefüggés grafikus ábrázolása nyújtott számunkra segítséget. Ennek megfelelően 2.-13. ábrán kívánjuk a rétegekromatográfiás összefüggéseket szemléletessé tenni. Az ábrákba foglaltak a sorszámozás révén a szerkezeti csoportosítást is hivatottak követni az alkalmazott /római számokkal jelölt/ oldószerrendszerekben.

R_M^f

I. Táblázat

	Anyagok	Ms:	Op:	Alkalmazott rendszerek									Foszforsavas színreakció	
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Nappali fényben	UV-ben
1	Ösztron	270,37	269-71	0,39 0,19	0,35 0,27	0,45 0,09	0,76 -0,50	0,39 0,19	0,22 0,55	0,66 -0,29	0,18 0,66	0,495 0,01	sárga	zöld
2	Ö.-metiléter	284,40	169-70	0,69 -0,35	0,71 -0,39	0,72 -0,41	0,89 -0,91	0,54 -0,07	0,46 0,07	0,945 -1,23	0,44 0,10	0,775 -0,53	halvány na- rancssárga	zöld
3	Ö.-etiléter	298,43	121-22	0,69 -0,35	0,715 -0,40	0,73 -0,43	0,88 -0,86	0,565 -0,11	0,48 0,03	0,955 -1,33	0,43 0,12	0,785 -0,56	halvány na- rancssárga	zöld
4	Ö.-n-propiléter	312,44	88-90	0,71 -0,39	0,725 -0,42	0,76 -0,50	0,915 -1,03	0,54 -0,07	0,53 -0,05	front -	0,43 0,12	0,81 -0,63	drapp	kékes-zöld
5	Ö.-n-butiléter	326,46	103-105	0,72 -0,41	0,735 -0,44	0,74 -0,45	0,89 -0,91	0,60 -0,17	0,525 -0,04	front -	0,33 0,31	0,815 -0,64	drapp	kékes-zöld
6	Ö.-i-propiléter	312,44	152	0,72 -0,41	0,73 -0,43	0,71 -0,39	0,905 -0,98	0,575 -0,13	0,51 -0,02	front -	0,36 0,25	0,805 -0,61	sárga	zöld
7	Ö.-alliléter	310,37	98-100	0,71 -0,39	0,73 -0,43	0,73 -0,43	0,91 -1,00	0,55 -0,09	0,465 0,06	front -	0,35 0,27	0,795 -0,59	narancs- sárga	sárga
8	Ö.-c-pentiléter	324,46	128-33	0,73 -0,43	0,75 -0,48	0,75 -0,48	0,92 -1,06	0,595 -0,17	0,54 -0,07	front -	0,39 0,19	0,815 -0,64	sárga	sárgás- zöld
9	Ö.-benziléter	346,47	125-30	0,73 -0,43	0,745 -0,46	0,76 -0,50	0,92 -1,06	0,53 -0,05	0,425 0,13	front -	0,39 0,19	0,80 -0,60	halvány na- rancssárga	sárgás- zöld
10	Ö.-acetát	312,41	119-22	0,61 -0,19	0,66 -0,29	0,64 -0,25	0,83 -0,69	0,47 0,05	0,33 0,30	0,94 -1,19	0,33 0,31	0,70 -0,37	barnás-sárga	kékes-zöld
11	Ö.-benzoát	374,47	219-21	0,68 -0,33	0,70 -0,37	0,75 -0,48	0,88 -0,86	0,47 0,05	0,35 0,27	front -	0,385 0,20	0,76 -0,50	sárgás-fehér	kékes- szürke

R_M^F

II. Táblázat

				Alkalmazott rendszerek									Foszforsavas színreakció	
	Anyagok	Ms:	Op:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Nappali fényben	UV-ben
1	Ösztron-17-on-oxim	285,40	250-53	0,05 1,28	0,35 0,27	0,33 0,31	0,40 0,17	0,18 0,66	0,13 0,82	0,10 0,95	0,27 0,43	0,48 0,03	sárga	drapp
2	Ö.metiléter "	299,42	196-98	0,47 0,05	0,64 -0,25	0,50 0,00	0,74 -0,45	0,40 0,17	0,26 0,45	0,31 0,35	0,48 0,03	0,75 -0,48	barnás-rózsaszín	drapp
3	Ö.-etiléter "	313,44	176-80	0,49 0,02	0,62 -0,21	0,52 -0,03	0,79 -0,57	0,43 0,12	0,29 0,39	0,33 0,31	0,47 0,05	0,775 -0,53	barnás-rózsaszín	drapp
4	Ö.-n-propilé. "	327,45	85-87	0,45 0,09	0,61 -0,19	0,55 -0,09	0,71 -0,39	0,45 0,09	0,31 0,35	0,35 0,27	0,49 0,02	0,76 -0,50	sárga	sárgászöld
5	Ö.-n-butilé. "	341,47	154-55	0,53 -0,05	0,62 -0,21	0,544 -0,07	0,84 -0,72	0,41 0,16	0,305 0,36	0,37 0,23	0,47 0,05	0,785 -0,56	drappos-rózsaszín	drapp
6	Ö.-i-propilé. "	327,45	161-63	0,51 -0,02	0,57 -0,12	0,54 -0,07	0,81 -0,63	0,44 0,10	0,295 0,38	0,34 0,29	0,46 0,07	0,77 -0,52	drappos-rózsaszín	drapp
7	Ö.-alliléter "	325,37	163-68	0,51 -0,02	0,61 -0,19	0,53 -0,05	0,70 -0,37	0,41 0,16	0,275 0,42	0,33 0,31	0,45 0,09	0,77 -0,52	narancssárga	okkersárga
8	Ö.-c-pentilé. "	339,48	170-75	0,50 0,00	0,585 -0,15	0,538 -0,06	0,82 -0,66	0,45 0,09	0,315 0,34	0,37 0,23	0,48 0,03	0,79 -0,57	drappos-rózsaszín	drapp
9	Ö.-benziléter "	361,48	167-69	0,49 0,02	0,60 -0,17	0,534 -0,06	0,79 -0,57	0,40 0,17	0,23 0,52	0,36 0,25	0,50 0,00	0,78 -0,55	drapp	drapp
10	Ö.-acetát "	327,42	243-46	0,05 1,28	0,295 0,38	0,36 0,25	0,50 0,00	0,30 0,37	0,12 0,86	0,09 1,00	0,27 0,43	0,53 -0,05	barnás-rózsaszín	drapp
11	Ö.-benzoát "	389,48	241-46	0,05 1,28	0,25 0,48	0,33 0,31	0,49 0,02	0,25 0,48	0,14 0,79	0,10 0,95	0,31 0,35	0,515 -0,02	drapp	drapp

R_M^F

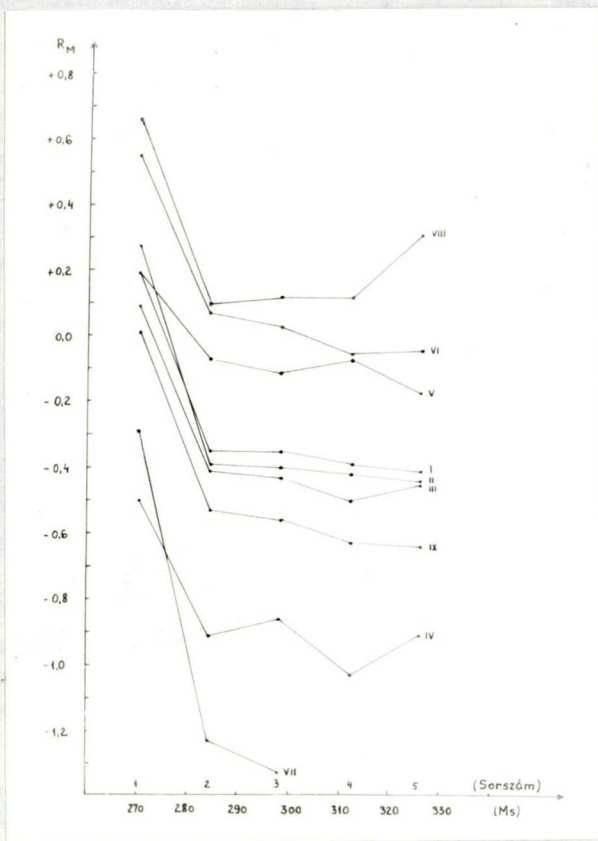
III. Táblázat

				Alkalmazott rendszerek									Foszforsavas színreakció	
	Anyagok	Ms:	Op:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Nappali f.	UV-ben
1	Ösztron-17a-aza-D-homo-laktám	285,40	335-40	start -	0,14 0,79	0,145 0,77	start -	start -	start -	start -	start -	0,29 0,39	drapp	világos-barna
2	Ö.-metiléter "	299,42	223-24	0,19 0,63	0,35 0,27	0,29 0,39	"	"	"	0,16 0,72	0,25 0,48	0,61 -0,19	drapp	szürke
3	Ö.-etiléter "	313,44	231-35	0,18 0,66	0,365 0,24	0,31 0,35	"	"	"	0,18 0,66	0,25 0,48	0,62 -0,21	drapp	szürke
5	Ö.-butiléter "	341,47	210-11	0,20 0,60	0,40 0,17	0,34 0,29	"	"	"	0,19 0,63	0,24 0,50	0,68 -0,33	drapp	szürkés-drapp
6	Ö.-i-propilé. "	327,45	230-35	0,21 0,57	0,41 0,16	0,34 0,29	"	"	"	0,195 0,61	0,24 0,50	0,67 -0,31	drapp	szürkés-drapp
7	Ö.-alliléter "	325,37	206-11	0,19 0,63	0,39 0,19	0,34 0,29	"	"	"	0,17 0,69	0,22 0,55	0,63 -0,23	drapp	drapp
8	Ö.-c-pentilé. "	339,48	238-40	0,20 0,60	0,39 0,19	0,32 0,33	"	"	"	0,18 0,66	0,26 0,45	0,65 -0,27	drapp	szürkés-drapp
9	Ö.-benziléter "	361,48	239-42	0,19 0,63	0,365 0,24	0,32 0,33	"	"	"	0,20 0,60	0,26 0,45	0,65 -0,27	drapp	világos-barna
10	Ö.-acetát "	327,42	147-50	0,10 0,95	0,24 0,50	0,24 0,50	"	"	"	0,13 0,82	0,11 0,91	0,34 0,29	drapp	sárgás-bar-na
11	Ö.-benzoát "	389,48	318-21	0,15 0,75	0,29 0,39	0,31 0,35	"	"	"	0,15 0,75	0,246 0,48	0,63 -0,25	drapp	szürkés-drapp

Az öszttron alapváz, valamint 17-on-oximja és D-homolaktámja - összehasonlítva a 3-as helyzetben éteresített származékokkal - bármely kromatográfiás rendszert tekintve, a legalacsonyabb R_F -értékeket mutatják. Ezen anyagcsoportok rétegekromatográfiás eredményeit I.-III. Táblázat foglalja össze. A táblázatok adatait vizsgálva az is rögtön szembetűnik, hogy a legmagasabb R_F -értékeket az I. Táblázatban találjuk, a legalacsonyabbakat pedig a III. - ban. Nyilvánvaló tehát, hogy mind az alapvegyületek, mind a származékok tekintetében az R_F -értékek /mint a mozgékony-ság mutatói/ keton > oxim > laktám sorrendben csökkennek. Ez az összefüggés összhangban van a molekulák polaritásával. Ha a IV-es oldószerrendszert tekintjük, amely apoláros karakterű, azt látjuk, hogy az öszttron étere és oximjai ebben a rendszerben mutatnak legnagyobb mozgékony-ságot, ugyanakkor a laktámok elválasztása ebben a rendszerben egyáltalán nem oldható meg.

Ha a rétegekromatográfiás tulajdonságok alakulását az oldallánc szénatomszámának függvényében kívánjuk analizálni, első közelítésben azt gondolnánk, hogy a lineáris összefüggésnek van a legnagyobb valószínűsége, azaz azonos változást remélünk CH_2 egységenként. Azonban az öszttron-metil-, -etil-, -n-propil-, -n-butiléter példája nem támasztja alá ezt a feltevést. Azt tapasztaltuk ugyanis az általunk megvizsgált I-IV eltérő oldószerrendszerben, hogy az öszttron-metiléter és -etiléter alig mutat különbséget rétegekromatográfiás szempontból, ugyanúgy az öszttron-n-propiléter és -n-butiléter is igen közeli R_F -értékekkel rendelke-

zik /lásd 2. ábra/.



2. ábra

E négy származék összehasonlítása mégis megenged egy általános következtetést, ami a II oldószerszerrendszerben tapasztaltakból egyértelműen következik, de a többi oldószerszerrendszerben is hasonló tendencia érvényesül.

Ugyanis az éteresítő oldallánc hosszabbodásával, CH_2 egységenként negatív R_H -érték változás lép fel, ami a molekulák polaritás csökkenését bizonyítja. Ez a változás az említett, II oldószerszerrendszerben közelíti meg legjobban a linearitást. Számszerűleg az alábbi értékeknek felel meg:

Ösztron-metiléter

$$\Delta R_M(\text{CH}_2) = -0,01$$

Ösztron-etiléter

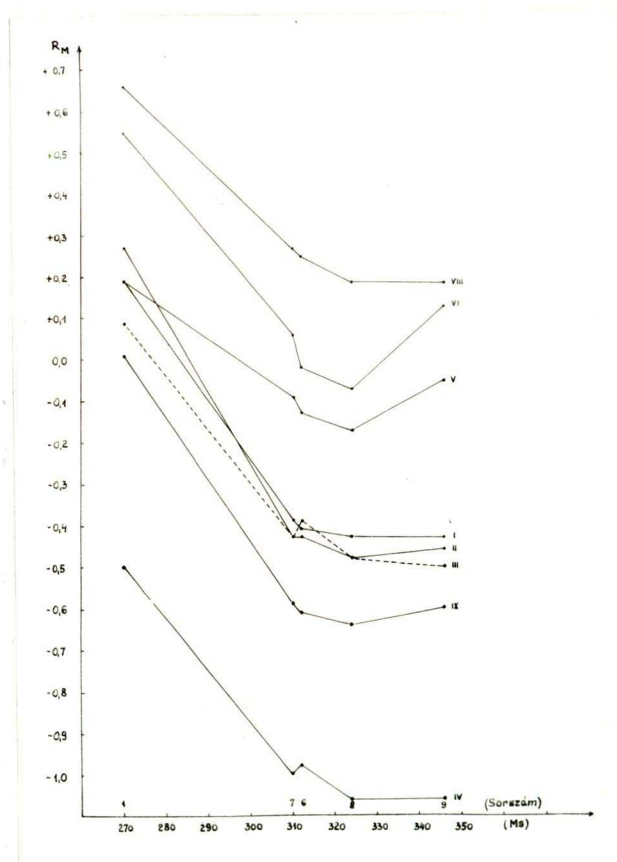
$$\Delta R_M(\text{CH}_2) = -0,02$$

Ösztron-n-propiléter

$$\Delta R_M(\text{CH}_2) = -0,02$$

Ösztron-n-butiléter

Összevetve az ösztron és 3-as helyettesített étereit /lásd 2. és 3. ábra/ arra a következtetésre jutunk, hogy rétegekromatográfiás szempontból igen homogén sajátságokkal rendelkezik ez az anyagcsoport.

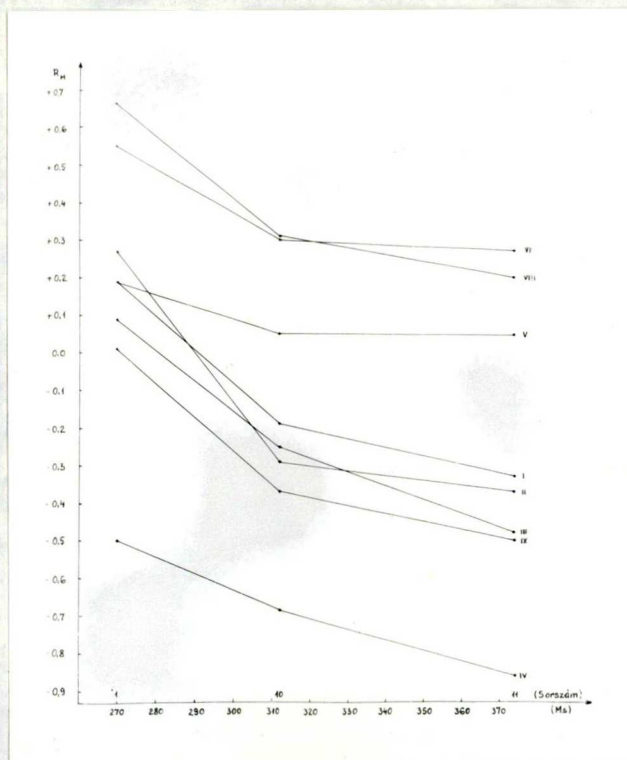


3. ábra

Igen kis differenciák mérhetők a sorozat egy CH_2 csoportban különböző tagjai között, de megfelelő oldószerrendszerekkel megoldható elválasztásuk.

Hasonló következtetésre jutunk, ha az egyéb éteresi-tő csoportot hordozó /-i-propil-, -allil-, -c-pentil-, -benzil/ származékokat együtt futtatjuk az egyenes láncú, de közel azonos molsúlyú éterekkel. Ezek a kémiai szempontból is nagyobb különbségeket mutató származékok viszont sokkal jobb hatásfokkal választhatók el egymástól megfelelő oldószerrendszerekben. Esetünkben az V és VI rendszerek bizonyultak ebből a szempontból a legalkalmasabbaknak.

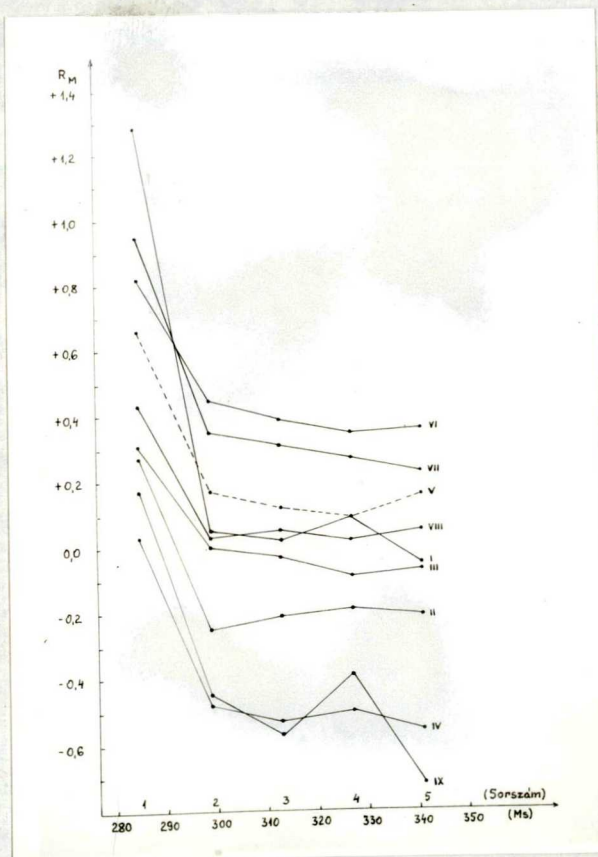
Az öszttron észterek közül csak az acetátot és benzoátot vizsgáltuk /lásd 4. ábra/, mint a fenolos OH-csoport leggyakrabban használt védőcsoportjait. Ezek az öszttron



4. ábra

mellett jól elválaszthatók, kivéve az V, VI, VIII rendszereket - vagyis minél apolárosabb rendszert alkalmazunk, annál jobb elválást érhetünk el.

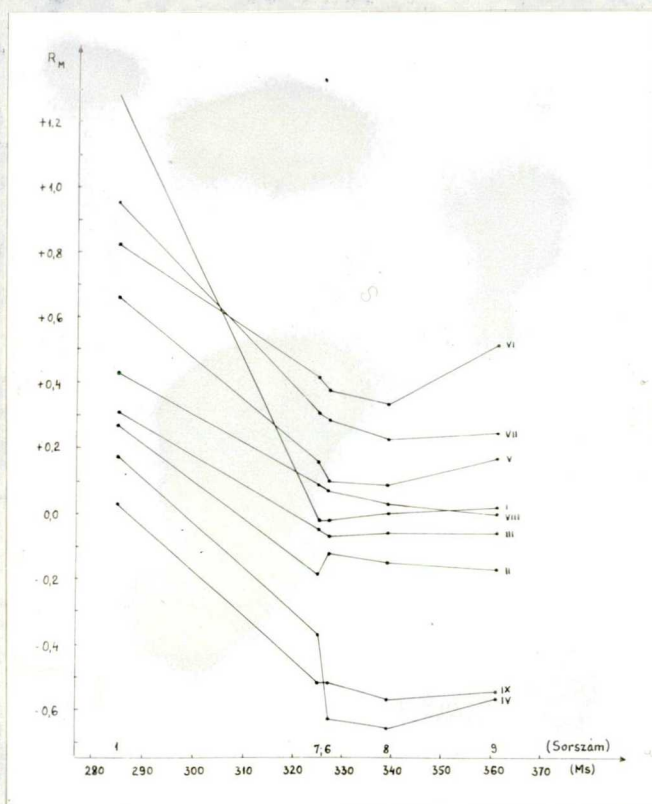
Az öszttron-17-on-oxim és 1-4 szénatomszámú étereit /lásd 5. ábra/ egyértelmű lineáris összefüggést mutatnak a M_s és R_M -értékek alakulásában. Ez a linearitás a VII oldószerrendszer viszonyai között érvényesül és CH_2 egységenként $\Delta R_M(CH_2) = -0,04$ -el értékelhető. Tehát a polaritás csökkenés a tagok között itt is nyilvánvaló, de az is kiolvasható a görbék lefutásából, hogy a többi oldó-



5. ábra

szerrendszer esetén nem egyértelmű.

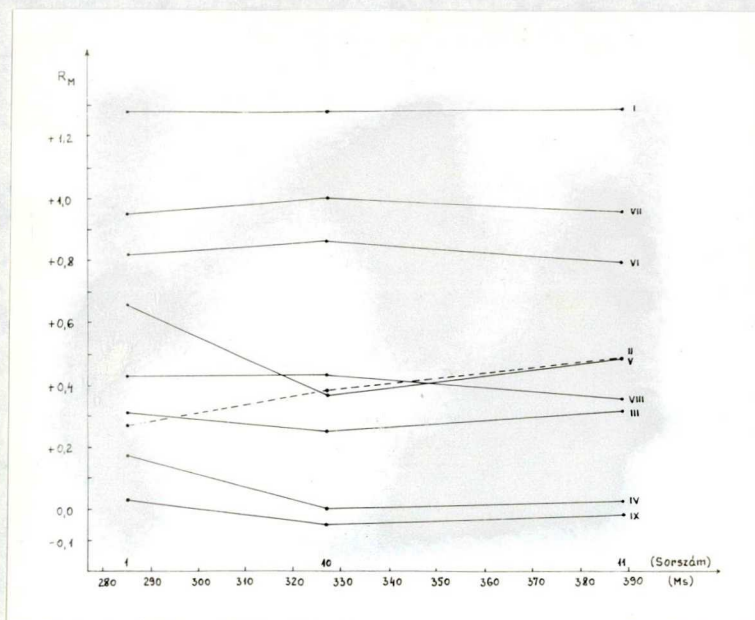
Visszatérve az ősztron 6-9 sorszámú étereinél leírt sajátságokra, ezen származékok oximjait tekintve /lásd 6. ábra/ is nagyon hasonló következtetésekre jutunk. Az oxim-



6. ábra

mok elválasztásánál is az V és VI rendszer vezet legjobb eredményhez és bár a lemérhető különbségek kisebbekké válnak, tendenciájukban változatlanok maradnak.

Az ősztron oximok észterei esetében /7. ábra/ érdekesen változik a korábban éterekkel összefüggésbe hozható elválasztási lehetőség, amennyiben ezek csak igen kis R_M -eltérést mutatnak az ősztron-17-on-oximhoz viszonyítva.



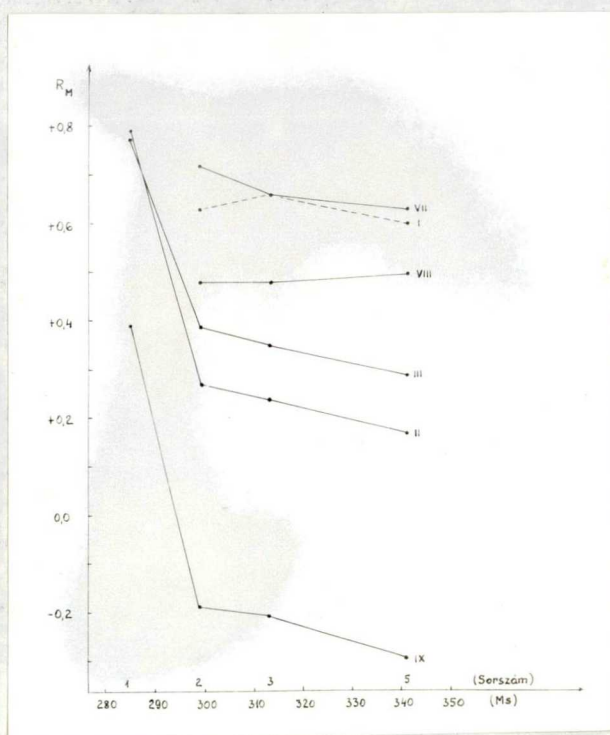
7. ábra

Kivételt képez az V rendszer (n-Heptán-aceton 2:1), ami egyedül biztosítja azokat a fizikai-kémiai körülményeket, amelyek az elváláshoz hozzásegítenek.

A laktámok annak ellenére, hogy molsúly szerint az oximok izomerejei, mégis nagy eltérést mutatnak kromatográfias szempontból. Már korábban is utaltunk arra, hogy éppen azok a rendszerek /IV-VI/, amelyekben az éterek és oximok jó elválást mutatnak, a laktámokat nem képesek a felviteli helyről elmozdítani. A laktámok elválasztásánál a régóta alkalmazott kloroform tartalmú rendszerek jutnak fontos szerephez, ezek közül is azok, amelyekben az apoláros összetevő sokszorosán meghaladja a poláros pár mennyiségét /II és III/. A 8. ábra tanúsága szerint

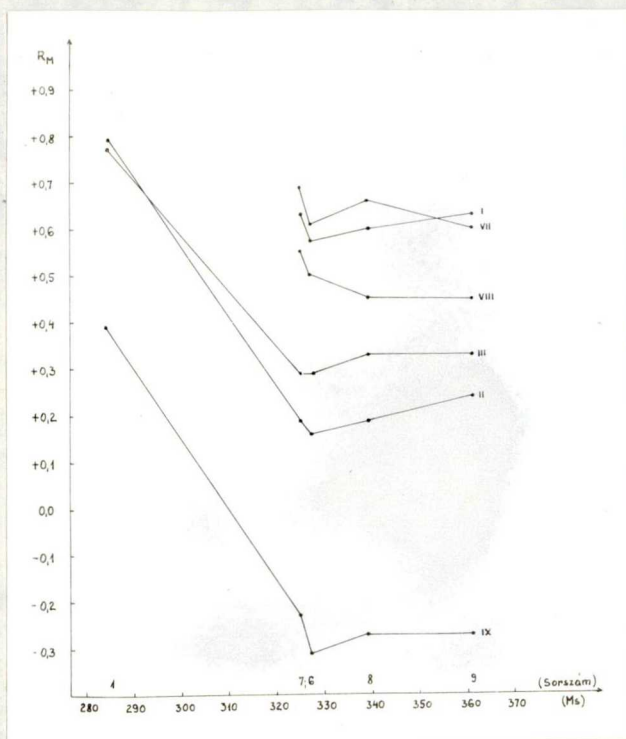
$$\Delta R_{M(CH_2)} = -0,03 \text{ ill. } -0,035 \text{ értékkel mérhető a II}$$

rendszerben a metiléter-, etiléter-, n-butiléter-helyettesített D-homo-laktámok közötti eltérés.



8. ábra

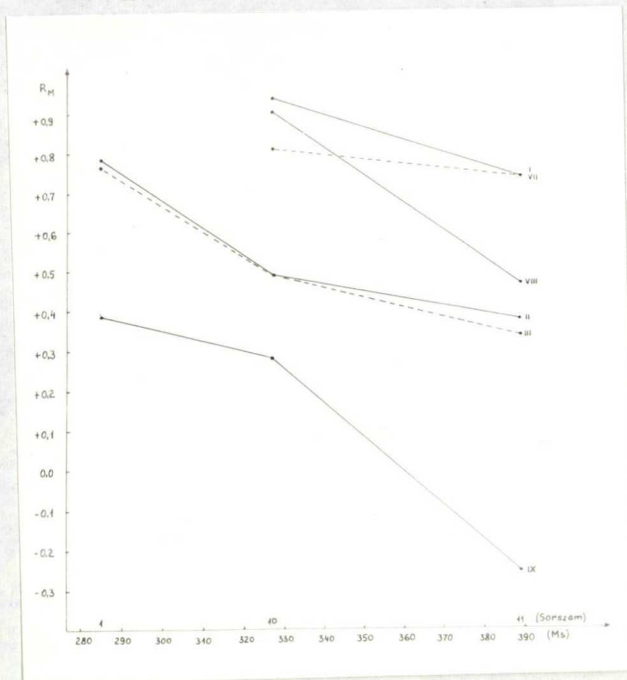
A másik csoportnál /lásd 9. ábra/ a hasonló kémiai karakter és kis molsúly különbségek következtében, nehezen oldható meg egyszeri futtatással a származékok jó elválasztása. Jól látható pl., hogy az I rendszerben mind a négy származék /allil-, i-propil-, c-pentil-, benzil-/ igen közeli R_M -értékeket mutat, vagy az, hogy a II rendszer oldja meg az i-propil- és benzil-származék elválasztását, de az allil- és c-pentil-származék futástávolsága teljesen megegyezik. Ez utóbbit tapasztaljuk a VIII, IX rendszerekben a c-pentil- és benzil- vonatkozásában. Egyedül a kloroform-aceton (9:1) tartalmú /VII/ rendszerben mértünk eltérő, bár igen közeli R_F -értékeket.



9. ábra

Az észterezetett D-homo-laktámok elválasztására valamennyi, általunk kipróbált rendszer alkalmasnak bizonyult /10. ábra/, természetesen eltekintve azoktól a rendszerektől, amelyekben valamennyi laktám a startponton marad. Megemlítést érdemel, hogy jelen esetben a három komponensű VIII-es és IX-es rendszer kínálja a legjobb hatásfokú elválasztási lehetőséget.

Érdemes kitérni arra a tényre is, hogy előhívásnál UV-fényben a színek egyhangúvá válása figyelhető meg a 17-ke-ton csoport kiküszöbölésével, azaz az oximképzés vagy laktám irányába történő átrendezéssel.



10. Ábra

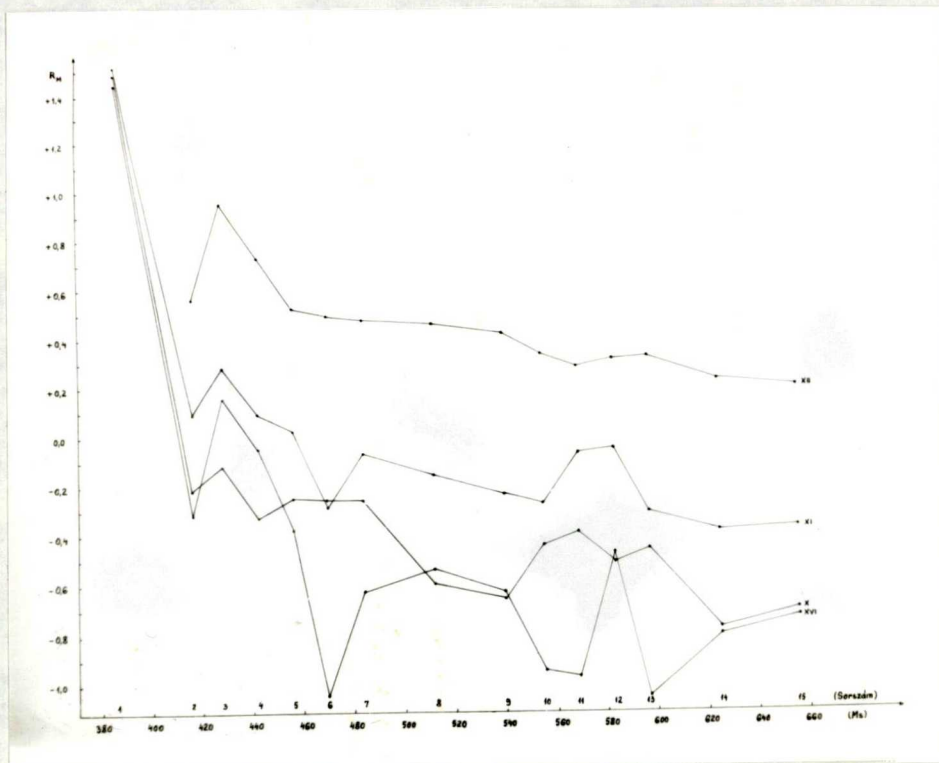
A koleszterin és 3 β -helyettesített észtereinek /D./anyagcsoport/ rétegekromatográfiás vizsgálata során nyert eredményeinket a IV. Táblázatban foglaltuk össze.

Jelentős problémát jelentett ezen anyagcsoport vizsgálatánál, hogy igen nagy a kromatográfiás mozgékonyág-beli differencia a koleszterin és származékai között, vagyis nagy az R_F -érték különbség. Ebből az következik, hogy nagyon nehéz olyan oldószerrendszert összeállítani, ami jellemző - de nem túl nagy - R_F -érték differenciát biztosít a koleszterin és valamely származéka között, ugyanakkor a sorozat minden tagjának jó elválást tesz lehetővé.

Fenti probléma megoldására tett kísérletek során gyakran tapasztaltuk, hogy ha a koleszterin és a származékok jól elváltak egymástól, akkor a származékok közötti differencia elmosódott. Jól demonstrálják ezen megállapításokat a IV. Táblázat adatai, amelyek a XIII, XIV, VII, XV, XVII rendszerekben végzett elválasztásokra vonatkoznak és az egyöntetűen magas R_F -értékekről számolnak be. A táblázat hiányzó adatait éppen ezen okok indokolják.

Ha a 11. ábra összefüggéseit vizsgáljuk, láthatjuk, hogy sikerült négy rendszert /X, XI, XII, XVI/ is kidolgoznunk a koleszterin-észterek hatásos elválasztására. Nyilvánvaló az is, hogy a gyengén poláros karakterű rendszerek alkalmasak ezen anyagcsoport rétegekromatográfiás gyakorlatában.

				Alkalmazott rendszerek									Foszforsavas színreakció	
	Anyagok	Ms:	Op:	X	XI	XII	XIII	XIV	VII	XV	XVI	XVII	Nappali fényben	UV-ben
1	Koleszterin	386,67	145-47	0,03 1,51	0,032 1,48	start -	0,06 1,19	0,018 0,66	0,61 -0,19	0,10 0,95	0,035 1,44	0,06 1,19	lilas-piros	zöldes-vörös
2	Kol.-formiát	414,66	94-96	0,625 -0,22	0,447 0,09	0,215 0,56	0,766 -0,51	0,865 -0,81	0,93 -1,12	0,85 -0,75	0,675 -0,32	0,80 -0,60	lilas-piros	sárgás-vörös
3	Kol.-acetát	428,70	112-14	0,57 -0,12	0,345 0,28	0,10 0,95					0,41 0,16		barnás-piros	zöldes-vörös
4	Kol.-propionát	442,72	94-96	0,68 -0,33	0,445 0,09	0,16 0,72					0,53 -0,05		barnás-piros	zöldes-vörös
5	Kol.-butirát	456,76	95-97	0,64 -0,25	0,495 0,02	0,23 0,52	0,845 -0,74	0,892 -0,92	0,93 -1,12	0,87 -0,82	0,71 -0,38	0,84 -0,72	bordó	vörös
6	Kol.-valerilát	470,76	85-87	0,647 -0,26	0,662 -0,29	0,245 0,49	0,925 -1,09	0,91 -1,00	0,93 -1,12	0,905 -0,98	0,918 -1,05	0,88 -0,86	sárgás-piros	sötét-rózsaszín
7	Kol.-kapronát	484,81	94-96	0,645 -0,26	0,54 -0,07	0,252 0,47	0,88 -0,86	0,912 -1,01	0,935 -1,16	0,90 -0,95	0,809 -0,63	0,885 -0,89	rózsaszín	sötét-rózsaszín
8	Kol.-kaprilát	512,85	107-8	0,80 -0,60	0,59 -0,16	0,262 0,45					0,775		lilas-rózsaszín	lilas-rózsaszín
9	Kol.-kaprinát	540,90	82-83	0,82 -0,66	0,637 -0,24	0,28 0,41					0,81 -0,63		bordó	barnás-vörös
10	Kol.-undekanát	554,94	86-87	0,737 -0,45	0,657 -0,28	0,325 0,32	0,93 -1,12	0,917 -1,04	0,945 -1,24	0,935 -1,16	0,90 -0,95	0,942 -1,21	bordó	rozsdavörös
11	Kol.-laurát	568,95	74-75	0,717 -0,40	0,647 -0,08	0,35 0,27	0,90 -0,95	0,927 -1,10	0,935 -1,16	0,92 -1,06	0,905 -0,98	0,93 -1,12	bordó	rozsdavörös
12	Kol.-tridekanát	583,00	58-59	0,767 -0,52	0,535 -0,06	0,335 0,30	0,88 -0,86	0,932 -1,12	0,95 -1,28	0,93 -1,12	0,75 -0,48	0,935 -1,16	lilas-piros	rozsdavörös
13	Kol.-mirisztát	597,02	65-66	0,747 -0,47	0,675 -0,32	0,33 0,31	0,91 -1,00	0,95 -1,28	0,96 -1,38	0,94 -1,19	0,92 -1,06	0,93 -1,12	vörös	sötét-rózsaszín
14	Kol.-palmitát	625,06	75-76	0,86 -0,79	0,717 -0,40	0,38 0,21					0,87 -0,82		lilas-piros	sárgás-rózsaszín
15	Kol.-sztearát	656,11	64-67	0,84 -0,72	0,712 -0,39	0,395 0,18					0,85 -0,75		lilas-piros	vörösbarna
16	Kol.-undecilén- -/10/-át	552,92	69-72	0,712 -0,39	0,587 -0,15	0,252 0,47	0,92 -1,06	0,917 -1,04	0,94 -1,19	0,925 -1,09	0,862 -0,79	0,93 -1,12	barnás-piros	drapp
17	Kol.-oleát	651,10	44-46	0,84 -0,72	0,677 -0,32	0,335 0,30					0,845 -0,74		lilas-piros	drapp
18	Kol.-benzoát	490,76	153	0,657 -0,28	0,537 -0,06	0,270 0,43	0,865 -0,81	0,91 -1,00	0,932 -1,14	0,915 -1,03	0,83 -0,69	0,90 -0,95	sárgás-rózsaszín	narancsvörös
19	Kol.-cinnamát	517,82	160-63	0,50 0,00	0,435 0,11	0,155 0,74	0,78 -0,55	0,905 -0,98	0,945 -1,24	0,90 -1,06	0,707 -0,39	0,857 -0,78	barnás-lila	világosbarna



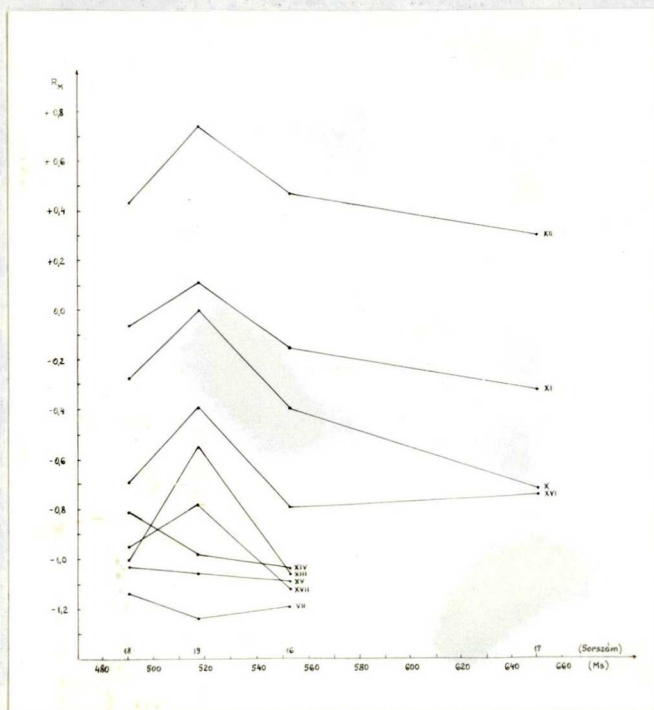
11. ábra

Ha a XI rendszerben kapott változásokat kísérvük figyelemmel azt tapasztaljuk, hogy a görbe egy bizonyos szakaszán a M_s növekedésével arányos R_M -változás következik be. Ha változásokat $\Delta R_M(\text{CH}_2)$ -ben kívánjuk kifejezni, akkor a -kapronát /C₆/ és -kaprilát /C₈/ közötti 2 CH₂ differenciára jellemző $\Delta R_M = -0,09$ változás CH₂ egységenként $-0,045$ -nek felel meg.

Analóg módon a kaprilát /C₈/ és -kaprinát /C₁₀/ közötti $\Delta R_M = -0,08$ változás CH₂ egységenként $-0,04$ -et jelent.

A -kaprinát /C₁₀/ és -undekanát /C₁₁/ közötti egy CH₂ különbség ugyancsak $-0,04$ értéket képvisel, valamint a -mirisztát /C₁₄/ és -palmitát /C₁₆/ $\Delta R_M = -0,08$ eltérése

ábrán /13. ábra/ foglaltuk össze. Ebben az esetben a ben-



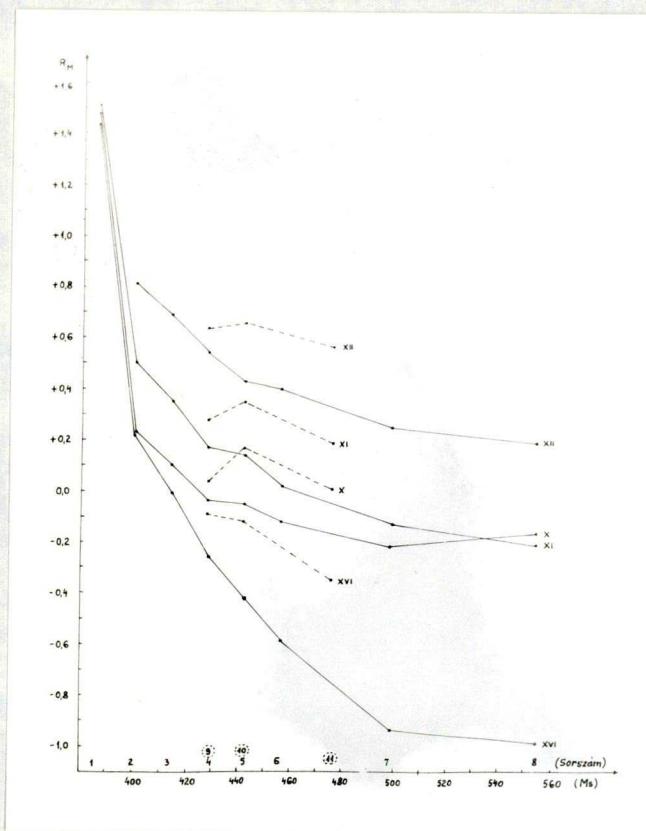
13. ábra

zoát, -cinnamát, -undecilén-/10/-át és -oleát elválasztására tettünk kísérletet és azt tapasztaltuk, hogy ezen származékok szinte valamennyi rendszerben jól elválnak. Nem jelentett problémát elválasztásuk a telített szénlancú észterektől sem. Az együttkromatografálás megoldásában legjobb lehetőséget a X és XVI rendszerek kínálnak. A könnyű kromatografálhatóságot alátámasztja az a tény, hogy az aromás oldallanc jelentősebb mértékben növeli meg a molekula polaritását, mint bármely más helyettesítő a vizsgált sorozatban.

A koleszterin 3 β -éterhelyettesített sorozata /E./ anyagcsoport/ volt a következő anyagcsoport, amelyet igyekeztünk rétegekromatográfiás szempontból értékelni. Az elválasztások eredményeit az V. Táblázatban közöljük.

Ennél a csoportnál igen jól tudtuk hasznosítani az észterek elválasztásánál szerzett tapasztalatainkat, mivel az ott kidolgozott rendszerek /X, XI, XII, XVI/ kiválóan alkalmazhatók az éterek elválasztására is.

A kromatográfiás tulajdonságok alakulása utóbbi anyagoknál bizonyos fokú hasonlóság mellett, felhívják a figyelmet a két csoport molekulaszervezetéből adódó különbségeire is /14. ábra/.



14. ábra

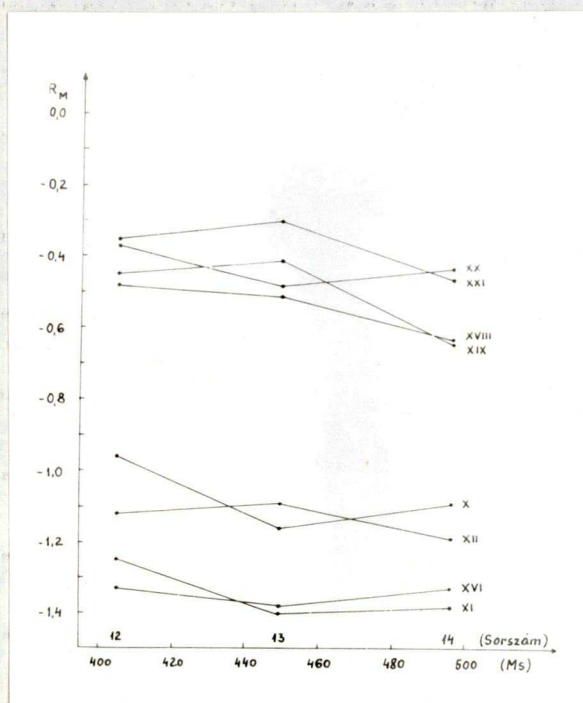
Alkalmazott rendszerek												Foszforsavas színreakció	
	Anyagok	Ms:	Op:	X	XI	XII	XVI	XVIII	XIX	XX	XXI	Nappali fényben	UV-ben
1	Koleszterin	386,67	145-47	0,03 1,51	0,032 1,48	start -	0,035 1,44	start -	start -	start -	start -	lilás-piros	zöldes-vörös
2	Kol.-metiléter	400,68	77-79	0,37 0,23	0,24 0,50	0,135 0,81	0,377 0,22					barnás-vörös	zöldes-barna
3	Kol.-etiléter	414,70	82-86	0,442 0,10	0,307 0,35	0,17 0,69	0,505 -0,01					barnás-vörös	zöldes-barna
4	Kol.-propiléter	428,72	95-97	0,522 -0,04	0,405 0,17	0,22 0,54	0,645 -0,26					barnás-vörös	zöldes-barna
5	Kol.-butiléter	442,77	76-77	0,53 -0,05	0,422 0,14	0,27 0,43	0,727 -0,42					lilás-vörös	ezüst
6	Kol.-amiléter	456,80	61-64	0,57 -0,12	0,487 0,02	0,285 0,40	0,795 -0,59					lilás-vörös	zöldes-drapp
7	Kol.-oktiléter	498,88	93-95	0,627 -0,22	0,575 -0,13	0,36 0,25	0,897 -0,94					lilás-vörös	zöldes-drapp
8	Kol.-lauriléter	554,98	64-66	0,595 -0,17	0,62 -0,21	0,39 0,19	0,907 -0,99					lilás-vörös	világosbarna
9	Kol.-i-propil- -éter	428,72	131-32	0,475 0,04	0,345 0,28	0,185 0,64	0,552 -0,09					barnás-lila	zöldes-barna
10	Kol.-terc.-bu- -tiléter	442,77	169-71	0,407 0,17	0,31 0,35	0,18 0,66	0,572 -0,12					lilás-vörös	világosbarna
11	Kol.-benziléter	476,79	113-15	0,495 0,01	0,392 0,19	0,21 0,57	0,69 -0,35					lilás-vörös	zöldes-barna
12	Kol.-klorid	405,11	90-95	0,902 -0,96	0,947 -1,25	0,93 -1,12	0,955 -1,33	0,75 -0,48	0,74 -0,45	0,70 -0,37	0,69 -0,25	lilás-vörös	vörösbarna
13	Kol.-jodid	449,55	81-85	0,935 -1,16	0,96 -1,40	0,925 -1,09	0,96 -1,38	0,765 -0,51	0,723 -0,41	0,73 -0,43	0,667 -0,30	lilás-vörös	vörösbarna
14	Kol.-bromid	496,50	100-105	0,925 -1,09	0,96 -1,38	0,94 -1,19	0,955 -1,33	0,81 -0,63	0,81 -0,64	0,75 -0,48	0,745 -0,46	lilás-vörös	vörösbarna

Az éter csoportok kialakítása polárosabb vegyületeket eredményez, mint az észter-helyettesítés, ugyanakkor az éteresítő oldallánc hosszabbodásával erősebb polaritás-csökkenés következik be, mint az észter származékok esetén. Ez a polaritás csökkenés 1-3 szénatomszámú tagok esetén a legnagyobb, 4-5 szénatomszámú oldalláncnál már kisebb mértékű, az 5-nél nagyobb szénatomszámú tagok között pedig egyre jobban elmosódik a polaritásbeli differencia. Jól szemléltetik a fenti változásokat a XVI rendszerben mért $\Delta R_{M(CH_2)}$ -értékek.

1-2 szénatomszámig		$\Delta R_{M(CH_2)} = -0,21$
2-3	"	$\Delta R_{M(CH_2)} = -0,25$
3-4	"	$\Delta R_{M(CH_2)} = -0,16$
4-5	"	$\Delta R_{M(CH_2)} = -0,17$
5-8	"	$\Delta R_{M(CH_2)_3} = -0,35$
8-12	"	$\Delta R_{M(CH_2)_4} = -0,05$

Az -i-propil, -terc.-butil és benzil-éterek R_M és M_s összefüggéseit ugyancsak a 14. ábrán /szaggatott vonallal ábrázolva/ mutatjuk be. Az eltérő kémiai felépítés biztosítja azt, hogy az azonos molsúly ellenére együttkromatografálhatók a sorozat alifás oldallánccal helyettesített tagjaival. Ez a kémiai szerkezet relative polárosabb karaktert kölcsönöz a molekuláknak, amit a görbék lefutása és a magasabb R_M -értékek egyértelműen bizonyítanak mind a négy vizsgált rendszer esetén.

Az éterek mellett a koleszterin halogén származékai-
val is foglalkoztunk. Az V. Táblázat vonatkozó adatai és a
15. ábra összefüggései nyilvánvalóvá teszik, hogy a halo-
gén szubsztitúció még nagyobb mértékben változtatja meg a



15. ábra

molekula kromatográfiás viselkedését, mint akár az ész-
ter, akár az éter-helyettesítés. A halogénezett származé-
kok kromatográfiájában már nem adnak megnyugtató eredmé-
nyeket az észterek- és étereknél jól bevált szolvensrend-
szerek. A koleszteril-klorid, -jodid, -bromid jól repro-
dukálható elválasztása csak apoláros rendszerekben való-
sítható meg. Bizonyítékul szolgálnak az általunk kipróbált
négy apoláros rendszerben /XVIII, XIX, XX, XXI/ kapott
 R_F -értékek.

R_M^P

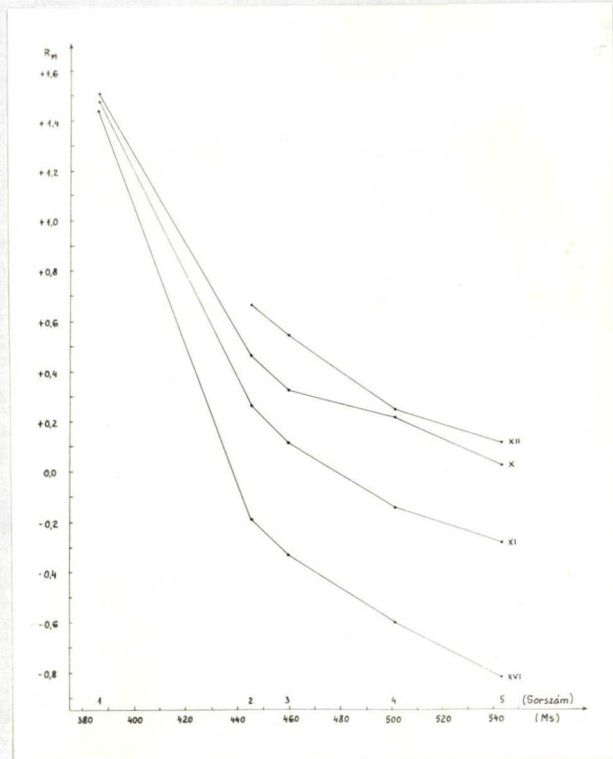
VI. Táblázat

	Anyagok	Ms:	Op:	Alkalmazott rendszerek				Foszforsavas színreakció	
				X	XI	XII	XVI	Nappali fényben	UV-ben
1	Koleszterin	386,67	145-47	0,03 1,51	0,032 1,48	start -	0,035 1,44	lilás-piros	zöldes-vörös
2	Kol.-metilkarbonát	444,69	98-100	0,252 0,47	0,347 0,27	0,177 0,67	0,61 -0,19	barnás-vörös	zöldes-barna
3	Kol.-etilkarbonát	458,73	80-82	0,32 0,33	0,432 0,12	0,221 0,55	0,68 -0,33	lilás-vörös	ezüstös-barna
4	Kol.-amilkarbonát	500,78	100-103	0,377 0,22	0,582 -0,14	0,36 0,25	0,80 -0,60	lilás-vörös	drapp
5	Kol.-oktilkarbonát	542,86	50-53	0,482 0,03	0,655 -0,28	0,43 0,12	0,87 -0,82	lilás-vörös	barna
6	Kol.-i-propilkarb.	472,76	103-105	0,345 0,28	0,50 0,00	0,24 0,50	0,75 -0,48	lilás-rózsaszín	ezüstös-barna
7	Kol.-i-butylkarb.	486,75	96-97	0,41 0,16	0,56 -0,10	0,31 0,35	0,77 -0,52	lilás-vörös	drapp
8	Kol.-benzilkarb.	520,77	108-11	0,335 0,30	0,48 0,03	0,26 0,45	0,72 -0,41	lilás-vörös	zöldes-drapp

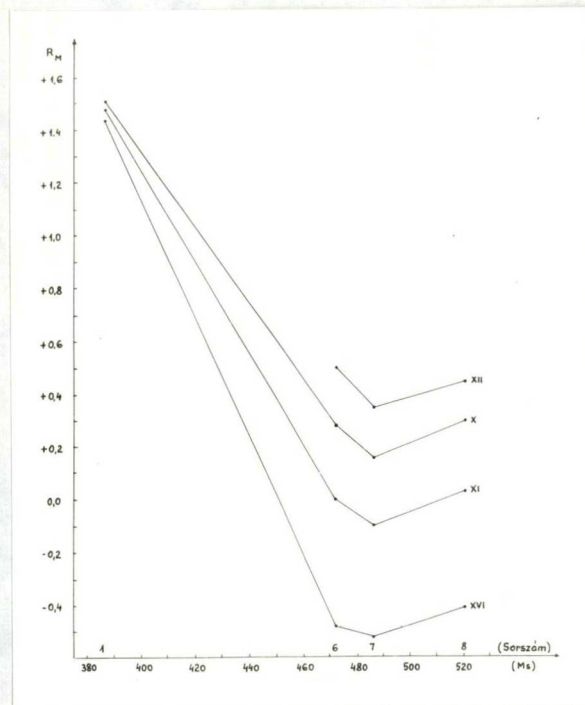
Végül megvizsgáltuk a koleszterin szénsavésztereinek /F./ anyagcsoport/ néhány képviselőjét /lásd VI. Táblázat és 16., 17. ábra adatait/.

Ennél az anyagcsoportnál is rögtön szembetűnik az előbbiekkal összevethető, hasonló kromatográfiás viselkedésmód. Elválasztásukra szintén jól beváltak a X, XI, XII, XVI szolvensrendszerek. A sorozat egyes tagjai között észlelt polaritás változások az étereknél leírt módon alakulnak, azaz a kezdeti nagyobb mértékű csökkenés fokozatosan kisebbé válik. A változásokat a 8 szénatomszámú -oktilkarbonátig tudtuk megfigyelni, ezen belül is csak négy származék /-metil-, -etil-, -amil-, -oktilkarbonát/ esetén, így a közbeeső ill. 8-nál nagyobb szénatomszámú származékok által meghatározható, finomabb változásokat nem tudtuk követni.

A láncelágazást és aromás gyűrűt tartalmazó tagok elválasztása viszont további kísérleteket tesz szükségessé, miután ezek kisebb R_M -érték eltérést mutatnak az egyenes szénláncú karbonátoktól, mint ahogy azt az étereknél láttuk. A további kísérletek alapja az lenne, hogy ezen elágazó szénláncú származékok mellett kromatografált 3, 4, 6, 7 és 8-nál nagyobb szénatomszámú alifás tagok viselkedését analizáljuk és szükségszerűen további szolvensrendszereket dolgozzunk ki.



16. ábra



17. ábra

Egy kísérletsorban /G./ anyagcsoport/ vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy epesav észtereknél milyen kromatográfiás tapasztalatokat szerzünk akkor, ha a keton csoport az epesav A, B, ill. C gyűrűjén helyezkedik el. Miután korábbi kísérleteinkben ezeket az epesav-származékokat elkészítettük, módunk nyílt a fenti indíték alapján megpróbálni e néhány anyag elválasztását.

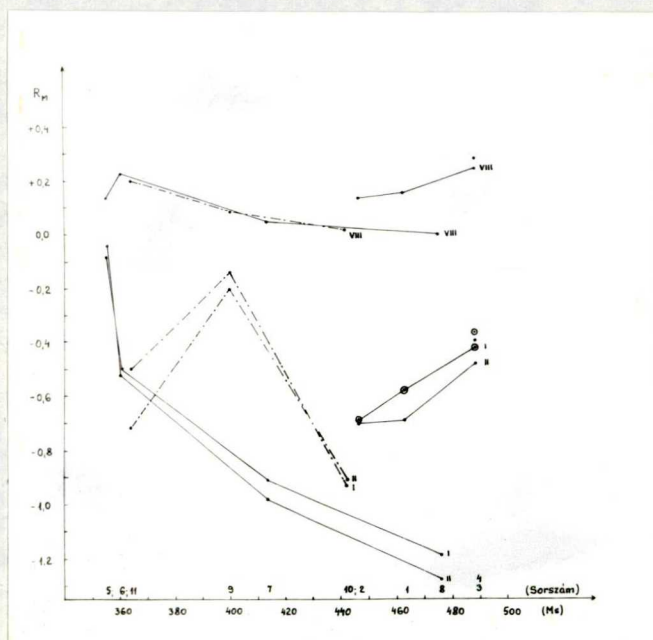
A VII. Táblázat és 18. ábra tanúsága szerint a kipróbált három rendszer /I, II, VIII/ mindegyike lehetőséget ad az epesav-észter-ketonok elválasztására, de elválasztástechnikai szempontból legjobbnak az I rendszer bizonyult. A R_M -értékekből követhető polaritási sorrend az 1-4 sorszámú anyagoknál a következő: $2 < 1 < 3 < 4$, azaz a 6-os /epesav-észter/-keton a legkevésbé poláros, ezt követi a 3-as, 7-es és 12-es keton.

Következő kérdéscsoport, amelyre még a kromatográfiás elválasztásból feleletet vártunk az volt, hogy hogyan hasonlítható össze az azonos alapvázon, azonos gyűrűben keton funkciót hordozó származékok sora azokban az esetekben, amikor a 3β -OH csoport helyettesített, ill. eltérő helyettesítőt hordoz, valamint a hasonló keton csoportot tartalmazó 5α -androsztán váz. Ezek a vizsgálataink nem komplettek, de kísérleteink praktikus útmutatást jelenthetnek további elemző vizsgálatoknak, amennyiben I és II rendszer igen jól használható a fenti típusú anyagok kromatográfiájában. Az említett célból összehasonlított 5-8 sorszámú

R_M^F

VII. Táblázat

	Anyagok	Ms:	Op:	Alkalmazott rendszerek			Foszforsavas színreakció	
				I	II	VIII	Nappali fényben	UV-ben
1	3-keto-12-acetoxi-kólsav-metilészter	463,63	117-19	0,792 -0,58	0,83 -0,69	0,41 0,16	sárga	zöldes-szürke
2	3-acetoxi-6-keto-hio-dezoxikólsav-metilészter	447,63	145-50	0,83 -0,69	0,835 -0,70	0,42 0,14	rózsaszín	kékes-szürke
3	3,12-diacetoxi-7-keto-kólsav-metilészter	489,67	115-17	0,725 -0,42	0,75 -0,48	0,36 0,25	halvány-sárga	kékes-szürke
4	3,7-diacetoxi-12-keto-kólsav-metilészter	489,67	165-67	0,695 -0,36	0,71 -0,39	0,34 0,29	okkersárga	kékes-szürke
5	7-keto-kolesztán	385,66	156-59	0,525 -0,04	0,545 -0,08	0,42 0,14	lilás-rózsaszín	vöröses-rózsaszín
6	3-acetoxi-6-keto-kolesztán	444,70	126-28	0,89 -0,91	0,905 -0,98	0,47 0,05	-	kék
7	3-benzoiloxi-6-keto-kolesztán	506,78	155-62	0,94 -1,19	0,95 -1,28	0,50 0,00	-	szürkés-kék
8	3,17-diacetoxi-5-androsztán-6-on	390,52	175-77	0,77 -0,52	0,76 -0,50	0,37 0,23	sárga	sötétkék
9	7-keto-koleszterin	400,65	95-98	0,58 -0,14	0,615 -0,20	0,45 0,09	lilás-rózsaszín	sárgás-rózsaszín
10	3-acetoxi-7-keto-koleszt-5-én	442,69	140-45	0,895 -0,93	0,89 -0,91	0,49 0,02	sárga	rzsdavörös
11	3,17-diacetoxi-7-keto-androszt-5-én	364,48	223-27	0,76 -0,50	0,84 -0,72	0,385 0,20	halvány-sárga	ibolya



18. ábra

anyag igen szép elválását figyelhetjük meg ugyancsak a 18. ábrán, amit kihúzott vonallal szemléltetünk.

A rendelkezésünkre álló azonos és androszt-5-én vázon konjugált keton csoportot tartalmazó, további három anyag /9-11 sorszáma/ viselkedését, az előbbieket mellett szaggatott vonallal tüntettük fel.

Összevontan megállapíthatjuk, hogy az 5-8 csoportnál éppen úgy, mint a 9-11 anyagoknál a két komponensű, kis mennyiségben poláros összetevőt tartalmazó, apoláros rendszerek alkalmasak az elválasztásra. A korábban általunk is használt és az irodalomban is ajánlott három komponensű rendszerek kevésbé alkalmazhatók fenti esetekben.

Végül meg kell jegyeznünk, hogy ezek a kísérleteink az epesav-ketonok elválasztására, valamint a többi keton

elválasztására is, csak praktikus elválasztási lehetőségeket kívánnak bemutatni, azonban ahhoz, hogy a szerkezet és a kromatográfiás sajátságok közötti mélyebb következtetéseket levonhassuk, további hasonló vizsgálatokat kell végezni.

Ö s s z e f o g l a l á s

Eredményeinket összefoglalva a következő általános megállapítást tehetjük. Az összes tárgyalt anyagcsoport esetén sikerült egyszerű rendszereket találni, amelyekben a közeli molsúlyú, esetleg izomer vegyületek is jól elválaszthatók. Ez képviseli a dolgozatban leírt munkánk egyik fő értékét.

Anyagcsoportonként áttekintve és összefoglalva elért eredményeinket, a következőket mondhatjuk.

Az öszttron és származékai esetében azt az általános megállapítást tehetjük, hogy az R_F -értékek keton, oxim, laktám sorrendben csökkennek. Ez az összefüggés tökéletesen összhangban van a molekulák polaritásával.

A 3-as helyzetben elhelyezkedő éter oldallánc hosszától függően a molekulák polaritása csökken. Ez a csökkenés azonban nem nagy rétegekromatográfiás sajátság változással jár, ezért az egymáshoz viszonyítva nem nagy molekulasúly különbséget mutató származékok elválasztása nehéz.

Az izo, telitetlen cikloalkil, vagy aromás oldalláncot tartalmazó éterek elválasztása viszont egyszerűen megoldható.

Az észterek elválasztása sem okoz problémát.

A korábban ketonoknál említett, molekulasúllyal összefüggésbe hozható lineáris polaritás csökkenés az oximoknál a legkifejezettebb, de a laktámoknál is jelentkezik bizonyos oldoszerrendszerben.

Az oximok izomerjeinek tekinthető D-homo-laktámoknál

az elválasztás azokban a rendszerekben oldható csak meg, amelyekben az apoláros összetevő sokszorosan meghaladja a poláros pár mennyiségét.

A koleszterin esetében a β -béta-helyettesített észterek, éterek, szénsavészterek és halogén származékok rétegekromatográfiás sajátságainak a vizsgálatát végeztük el.

A rétegekromatográfiás sajátságokat illetően általános összefüggésként megállapítható, hogy fenti anyagcsoportok elválasztására /kivéve a halogén származékokat/ ugyanazon oldószerrendszerek alkalmasak. Kísérleteink eredményeként négy ilyen rendszert sikerült összeállítanunk.

Észterek elválasztására a gyengén poláros rendszerek a legmegfelelőbbek. Szabályszerűség figyelhető meg a C_6-C_{16} tagszámú észteresítő komponens polaritás változására vonatkozóan a c-hexán - kloroform (6:4) rendszerben.

Itt is megállapítható, hogy a telitetlen, aromás észterek valamennyi rendszerben jól elválnak egymástól.

A koleszterin-észterek elválasztásával való foglalkozást az is indokolja, hogy a természetes anyagok között /többek között a lipidek/ nagy változatossággal fordulnak elő és elválasztásuk egyéb módszerekkel nagy problémát jelent.

A koleszterin β -béta-éterek polárosabb sajátsággal rendelkeznek mint az észterek, viszont az éteresítő oldallánc hosszabbodásával a polaritás csökkenés gyorsabban bekövetkezik, mint az észterek esetében, ami rétegekromatográfiás elválasztástechnikai szempontból igen előnyös tulajdonság.

A koleszterin β -halogén származékai közül a klorid, jodid és bromid elválasztásával foglalkoztunk. Ezek rétegekromatográfiás viselkedés szempontjából nem hozhatók korrelációba egyik tárgyalt anyagcsoporttal sem és első-sorban apoláros rendszerekkel valósítható meg az elválasztásuk.

A koleszterin szénsavszármazékok sajátosságaikra nézve a koleszterin-éterekkel hozhatók összefüggésbe, amennyiben nagyon hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek kromatográfiájukat tekintve. Mint érdekességet kell itt megemlíteni, hogy az izo láncot és aromás észterestítő komponenst tartalmazó származékok viszont kis R_M -eltérést mutatnak az egyenes láncú szénsavészterektől, ellentétben az étereknél tapasztaltakkal.

Fentieken kívül, jó rétegekromatográfiás elválasztást dolgoztunk ki az epesav észter-ke-tonok számára.

Megvizsgáltuk az izolált és a konjugált ke-ton csoport rétegekromatográfiás elválasztást befolyásoló sajátosságait is.

I r o d a l o m

1. Gy. Göndös, B. Matkovics and Ö. Kovács: Microchem. J., 8, 415- /1964/.
2. B. Matkovics, Zs. Tegyei and Gy. Göndös: Microchem. J., 11, 548- /1966/.
3. B. Matkovics and Gy. Göndös: Microchem. J., 13, 171- /1968/.
4. B. Matkovics and Zs. Tegyei: Microchem. J., 13, 174- /1968/.
5. B. Matkovics, Zs. Tegyei, Gy. Göndös and L. Balásperi: Microchem. J., 13, 502- /1968/.
6. Matkovics B. és Tegyei Zs.: Magy. Kém. Foly., 74/11, 516- /1968/.
7. Fehér T. és Bodrogi L.: Magy. Kém. Foly., 77/6-7, 360- /1971/.
8. Fehér T. és Kazik H. Mária: Magy. Kém. Foly., 78/4, 186- /1972/.
9. Fehér T.: Magy. Kém. Foly., 70, 318- /1964/; 71, 178- /1965/.
10. Matkovics B., Tegyei Zs., M. Rácz Mária és Koós I.: Magy. Kém. Foly., 76/7, 325- /1970/.
11. I.E. Bush: The Chromatography of Steroids - Pergamon Press, London /1961/.
12. E.C. Bate-Smith and R.G. Westall: Biochim. Biophys. Acta 4, 427- /1950/.
13. D.A. Williams: J. Chrom., 26, 280- /1967/.

14. A. Niederwieser and G. Pataki: Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods. Vol. I. Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, London
15. J. Hakl: J. Chromatogr., 71/2, 319- /1972/.
16. E. Stahl: Dünnschicht Chromatographie - Springer Verlag, Berlin /1962/.

Köszönetet mondok Dr. Matkovics Béla egyetemi
docens Urnak munkámban nyújtott segítségéért, értékes
útmutatásaiért.

