Nachweis von Corticosteroiden im Fett von Dachs und Marmeltier

Detection of Corticosteroids in Fat of Badger and of Alp-Marmot

H. Wagner* und D. Nusser

Institut für pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München,
8 München 2, Karlstraße 29

Z. Naturforsch. **43b**, 631–633 (1988); eingegangen am 7. Januar 1988

Fat, Badger, Alp-Marmot, Steroids, Corticosteroids

In our search for the antiinflammatory active principles of fat of badger and alp-marmot, used in folk-medicine as remedies against rheumatism and arthritis, eight known corticosteroids have been detected and identified in the lipophilic fraction of body fats of both animals. Enrichment and detection succeeded by using TLC, straight phase HPLC with diode array equipment, HR-GC on OV-1 capillary columns and GC/MS of the methyloxime-trimethylsilylated steroids. The amount of the detected steroids ranges from 30–40 mg/kg. The whole antiinflammatory activity of the fat, as measured in the rat paw edema test, results from these and further hitherto unidentified corticosteroids.

In der Volksmedizin werden schon seit langem das Fett des Marmeltieres (*marmota marmota*) und des Dachses (*meles meles*) zur äußerlichen Behandlung von entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises verwendet.

Das Marmeltierfett ist darüber hinaus Bestandteil einiger äußerlich angewendeter Präparate mit der gleichen Indikation. Über das dieser Wirkung zugrundeliegende chemische Prinzip war bisher nichts bekannt.

In früheren Jahren mit Marmeltierfett durchgeführte Fettsäureanalysen ergaben eine für tierische Fette übliche chemische Zusammensetzung [1–4].

Um Hinweise auf das vorliegende Wirkprinzip zu erhalten, untersuchten wir die beiden Fette im Granulombeutel-Modell an der Ratte. Dabei erhielten wir bei einer subcutan injizierten Menge von 100 mg/kg in Sesamöl eine deutliche Hemmung der Exsudatbildung. In einer zweiten Versuchsserie testeten wir Extrakte des Marmeltierfettes im Rattenpfoten-ödem-Modell. Hier konnte während der ersten sieben Stunden nur eine geringfügige Ödemhemmung beobachtet werden. Nach 24 h war dagegen eine Ödemhemmung von ca. 28% feststellbar (Langzeitwirkung). Dieses orientierende Ergebnis sprach für das Vorliegen von Corticoid-Substanzen.

Diese Annahme wurde bestätigt durch dünn-schichtchromatographische Untersuchungen, die mit Kieselgel und RP18 derivatisiertem Kieselgel,

MeOH-DCM- und MeOH–MeCN–H₂O-Gemischen als Lösungsmittel und Schwefelsäure 50% sowie Dinitrophenylhydrazin als Detektionsmittel durchgeführt wurden. Die Gewinnung einer Steroid-Fraktion aus beiden Fettarten gelang durch Lösungsmittel-Fraktionierung und Mehrfachchromatographie an Kieselgel RP 2 und Kieselgel RP 18. Die daraus erhaltenen Fraktionen wurden anschließend durch HPLC und nach Umsetzung zu Methyloxim-TMS-Derivaten durch Kapillargaschromatographie weiter aufgetrennt. Mittels Diodenarray-Detektion der HPLC-Peaks und GC-MS der GC-Peaks konnten in beiden Fettarten von den insgesamt ca. 20 detektierbaren Peaks acht zweifelsfrei den in der Tabelle angegebenen Steroiden zugeordnet werden. Untersuchungen an anderen Marmeltierfettchargen ergaben qualitativ ein in etwa gleiches Inhaltsstoffmuster.

Tabelle. Corticosteroid-Gehalte in Marmeltierfett und Dachsfett.

	Marmeltierfett [mg/kg]	Dachsfett [mg/kg]
Hydrocortison	6,6	13,1
Corticosteron	2,1	9,2
Cortison	5,6	6,2
Dehydrocorticosteron	2,9	11,6
Reichstein S	3,2	7,4
Deoxycorticosteron	3,0	8,4
17 α -OH-Progesteron	2,9	10,3
Progesteron	7,1	14,0

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Wagner.

Die quantitativen Bestimmungen der identifizierten Corticoide durch Kapillar-GC mit FID ergaben Corticosteroid-Gehalte von *ca.* 30 mg/kg für das Marmeladefett und für das Dachsfett *ca.* 75 mg/kg. Dabei ist mit einer Verlustquote von *ca.* 40%, bedingt durch die verlustreiche Fettabtrennung, zu rechnen.

Beide Fettarten enthalten auf Grund von MS-Untersuchungen noch mindestens 8 weitere Corticoidverbindungen, wobei es auch Hinweise für das Vorliegen von konjugierten Corticoiden gibt.

Versuchsteil

Herkunft der Fette

Dachsfett: Fettgewebe eines jungen, weiblichen Dachses erhalten von Herrn Prof. Schildknecht (Heidelberg) 1979.

Marmeladefett: Schützenapotheke, München, Ch.B. 801093, 1986.

Herkunft der Vergleichs-Corticoide: SIGMA Chemie Taufkirchen.

Voruntersuchungen

a) DC

Platten beschichtet mit Kieselgel 60, Kieselgel 60 RP2, Kieselgel 60 RP18 von Merck.

Laufmittel für Normalphasen:

n-Heptan-DCM-MeOH-Gemische,
für Umkehrphasen:

MeCN—MeOH—H₂O-Gemische.

b) Detektionsreagenzien

H₂SO₄ (50% in EtOH), TTC-Reagens, 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens, Liebermann-Burchard-Reagens und Rubanwasserstoffsäure-Reagens [5].

c) Girard-Extraktion

Durchführung gemäß [6].

Anreicherung der Steroid-Fractionen

a) Extraktion von Marmeladefett

1) SPE (Festphasenextraktion)

104,7 g Marmeladefett wurden in peroxidfreiem Diethylether gelöst und in einem ersten Reinigungsschritt gegen gleiche Volumina 0,01 N-NaOH, 0,01 N-HCl und Aq. dest. verteilt. Anschließend wurde die Etherphase über Na₂SO₄ getrocknet

und der Ether abrotiert. 25 g Octadecyl=Si 100 0,02–0,04 mm (Serva) wurden mit je einem Volumen MeOH, DCM, *n*-Heptan gewaschen, mit *n*-Heptan-DCM (9+1) in eine Glassäule (i.D. 20 mm mit Fritte) überführt und mit *n*-Heptan-DCM (9+1) äquilibriert. Der ölige Rückstand der Etherphase wurde in dem gleichen Volumen *n*-Heptan-DCM (9+1) aufgenommen und bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/min allmählich auf die Säule aufgegeben. Anschließend wurde mit 1 Vol. *n*-Heptan-DCM (9+1) nachgespült und nacheinander mit 2 Vol. DCM, 2 Vol. MeOH und 2 Vol. Isopropanol eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen, eingengt und untersucht (Ausbeute DCM-Fraktion 272,7 mg eines fettigen Substanzgemisches).

2) MPLC (Mitteldruckchromatographie)

Die Apparatur besteht aus einer Büchi-MPLC-Säule B-685, 460·49 mm, gepackt mit Kieselgel 60 RP2 (Merck), verbunden mit einem Uvicord-SD-UV-Detektor (LKB, 254-nm-Filter) und einem Supperrac-Fraktionssammler (LKB). 36 g Marmeladefett wurden mit dem gleichen Volumen *n*-Heptan verdünnt und auf die Säule gepumpt. Eluiert wurde mit 1 l *n*-Heptan, 300 ml DCM und 300 ml MeOH, wobei jeweils Fraktionen von 5 ml aufgefangen wurden. Die Fraktionen 237–257 wurden zusammengegeben, eingengt und in 20 ml LM1 (MeOH+MeCN+H₂O 6+4+1) dispergiert. Hydroxyalkoxypropyldextran (Typ X, Serva) wurde mit 2 Vol. MeOH und 2 Vol. MeOH 50% gewaschen, 2 h in LM1 gequollen und auf eine Glassäule gegeben (i.D. 20 mm, mit Fritte). Die Dispersion wurde auf die Säule aufgegeben, mit LM1 eluiert, wobei jeweils 20-ml-Fractionen aufgefangen wurden. Fraktion 2 wurde einrotiert (Ausbeute 102,2 mg eines fettigen Substanzgemisches), in 2,5 ml DCM gelöst, durch einen 0,45-µm-Teflon-Filter (Waters) filtriert und in die HPLC injiziert.

b) Dachsfett

251 g Fettgewebe wurden bei 60 °C mit 500 ml MeCN 80% 2 h digeriert. Das Fettgewebe wurde nicht homogenisiert, da das Fett durch Ausschmelzen gewonnen wird. Der Extrakt wurde heiß durch 25 g Kieselgel RP2 (Merck) filtriert, 2 h stehen gelassen, erneut durch das gleiche Kieselgel filtriert, 2 h bei –20 °C belassen und wiederum durch 25 g Kieselgel RP2 filtriert. Das MeCN wurde abrotiert, der Extrakt mit Aq. dest. auf 200 ml aufgefüllt und dreimal mit demselben Volumen DCM ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, durch einen 0,45-µm-Teflon-Filter

(Waters) filtriert und untersucht (Ausbeute 362,9 mg eines fettigen Substanzgemisches).

Analyse der Fraktionen

a) HPLC

Hewlett-Packard-1090-Flüssigchromatograph mit Dioden-Array, HP-85 B-Computer, HP-3392-Integrator, HP-7470-Plotter. Inj.-Vol. 5 µl; Säule LiChrospher 100 DIOL (5 µm) 250–4 (Merck), 2 Säulen hintereinander geschaltet; Laufmittel A: *n*-Hexan, B: Isopropanol, Programm 0,1% B 5 min, 0,1% B–50% B linear 20 min, 50% B 5 min; UV-Spektren von 200–400 nm in Schritten von 2 nm.

b) Gaschromatographie

MO-TMS-Derivate nach [7] mit Silylierungsreagens BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid) 120 µl + TMSI (N-Trimethylsilylimidazol) 120 µl + TMCS (Trimethylchlorsilan) 100 µl.

Säule: Quarz-Kapillarsäule Macherey-Nagel FS-OV1 CB, Länge 50 m, i. D. 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm; Trägergas Argon 100 kPa; Inj.-Temp.

320 °C; Inj. 1 µl; Split 1:10; Programm 180–300 °C mit 3 °C/min, 50 min bei 300 °C.

c) GC-MS

Ionenquelle 220 °C, Ionisierungsspannung 70 eV, Beschleunigungsspannung 4 kV, Aufnahme Frequenz 1500 scans/min; Hydrocortison: 635 (M⁺), 605 (M-31), 516 (M-120), 486 (M-150), 281, 207, 73, 44; Corticosteron: 548 (M⁺), 516 (M-32), 427 (M-121), 413 (M-135), 281, 207, 73, 44; Cortison: 560 (M-31), 531 (M-60), 501 (M-90), 441 (M-150), 281, 207, 73, 44; Dehydrocorticosteron: 503 (M⁺), 474 (M-30), 444 (M-59), 404 (M-100), 281, 207, 73, 44; Reichsteins Substanz S: 548 (M⁺), 517 (M-32), 458 (M-91), 427 (M-122), 354 (M-195), 281, 207, 74, 44; Deoxycorticosteron: 460 (M⁺), 430 (M-31), 354 (M-107), 334 (M-127), 281, 207, 73, 44; 17 α-Hydroxyprogesteron: 460 (M⁺), 429 (M-32), 370 (M-91), 339 (M-122), 316 (M-145), 281, 207, 73, 44; Progesteron: 372 (M⁺), 341 (M-31), 281, 207, 44.

Wir danken Herrn Dr. Bauer für seine Hilfe bei Durchführung von HPLC und GC, sowie Herrn Dr. Seligmann für die Aufnahme der Massenspektren.

- [1] H. P. Kaufmann und H. Garloff, *Fette – Seifen* **5**, 360 (1966).
- [2] H. Hahn und H. P. Thier, *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **26**, 991 (1973).
- [3] H. Distler und F. Schönhofer, *Arzneimittel-Forsch.* **7**, 396 (1957).

- [4] S. Gupta, T. P. Hilditch und M. L. Meara, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3145.
- [5] C. P. Garcia, *J. Chromatogr.* **350**, 468 (1985).
- [6] Ch. L. Teitelbaum, *J. Org. Chem.* **23**, 646 (1958).
- [7] W. L. Gardiner und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 524 (1966).