

## P Ő V O D N Ě O Z N Ā M E N I E

**CHROMATOGRAFICKÉ ODDELOVANIE  
17-HYDROXYKORTIKOIDOV NA STĹPCI  $\text{CaSO}_4$** 

J. MATIS, O. ADAMEC

Odborný liečebný ústav endokrinologický v Lubochni

Vo svetovej literatúre nachádzame pomerne málo prác, ktoré sa zaoberajú metódou oddeľovania 17-hydroxykortikoidov technikou stĺpcovej chromatografie. Ako adsorbent sa najčastejšie používa rôzne impregnovaný silikagél [1—6], menej Florisil [7] a Hyflo-Super-cel [8]. Neimpregnovaný silikagél pre hrubé oddeľovanie zmesi kortikoidov používa L. P. Romanoffová [9] a práškovú celulózu na stanovenie kortizónu W. Dirscherl [10]. Uvedené nosiče sú však na našom trhu väčšinou ťažko dostupné a metodiky pre rutinnú prácu zle reprodukovateľné. Pri hľadaní iného nosiča sa nám osvedčil síran vápenatý, ktorý sme pripravili jednoduchým spôsobom priamo v laboratóriu.

**Experimentálna časť***Chemikálie a zariadenie*

1. Chlorid vápenatý p. a.
2. Kyselina sírová p. a.
3. Chloroform redest.
4. Metanol p. a.
5. Absolútny etanol bez aldehydov.
6. Síran sodný bezvodý p. a.
7. 0,1 N-NaOH.
8.  $\beta$ -glukuronidáza, získaná mrazovou sublimáciou žalúdočnej šľavy slimáka záhradného *Helix pomatia*.
9. Síran vápenatý, pripravený zrážaním 40 %-ného vodného roztoku chloridu vápenatého stechiometrickým množstvom 50 %-nej  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pri teplote 70—80 °C za stáleho miešania. Zrazenina  $\text{CaSO}_4$  sa na filtri premyva destilovanou vodou do neutrálnej reakcie filtrátu. Síran vápenatý sa suší 48 hodín v ca 1 cm vrstve pri teplote 115—120 °C. Uskladňuje sa v prachovnici s dobre tesniacim zábrusom.
10. 100 mg % štandardné roztoky 17 $\alpha$ -hydroxydeoxykortikosterónu, kortizónu a kortizolu v absolútnom etanole.
11. 50 ml chromatografická trubica o vnútornom priemere 12 mm s rovným zábrusovým kohútom.
12. Automatický zberač frakcií.

*Pracovný postup*

4 g  $\text{CaSO}_4$  sa v zábrusovej banke rozmiešajú s 30 ml chloroformu. Vzniknuté zhluky síranu vápenatého sa rozrušia intenzívnym trepaním. Vytvorená jemná suspenzia sa vleje do chromatografickej trubice a nechá sa usadzovať.

Z uvedených štandardných roztokov steroidných látok sme pripravili umelé zmesi o známom obsahu jednotlivých steroidov. Tieto sme za stáleho sušenia prúdom teplého vzduchu nanášali na 2—3 krúžky filtračného papiera o priemere 10 mm. Krúžky filtračného papiera po odparení rozpúšťadla sme potom umiestili na povrch stĺpca. Ako elučný roztok sme použili čerstvo predestilovaný chloroform. Rýchlosť jeho prietoku sme kohútom chromatografickej trubice nastavili na 1 kvapku za 2 sekundy. Zachytávali sme 1 ml frakcie. Jednotlivé frakcie sme za zníženého tlaku odparili pri teplote nepresahujúcej 40 °C. V odparkoch prítomné 17-hydroxykortikoidy sme stanovovali metódou podľa R. H. Silbera a C. C. Portera [11].

Oddeľovali sme tieto biologicky účinné 17-hydroxykortikoidy:

17 $\alpha$ -hydroxydezoxykortikosterón — Reichsteinova *S* látka

kortizón — Kendallova *E* látka

kortizol — Kendallova *F* látka

Opísanú pracovnú techniku sme použili na stanovenie vyššie uvedených 17-hydroxykortikoidov v močových extraktoch.

#### *Príprava močového extraktu*

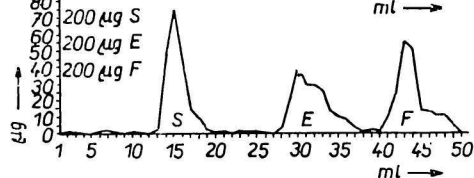
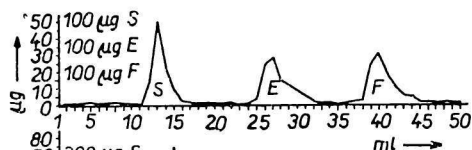
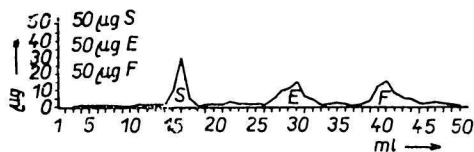
Moč sme extrahovali chloroformom po jeho hydrolyze  $\beta$ -glukuronidázou (800 Fishmanových jednotiek na 1 ml moču). Chloroformový extrakt sme čistili vytrepávaním s 0,1 *N*-NaOH a destilovanou vodou. Po vysušení bezvodým síranom sodným sme tento za zníženého tlaku odparili a vhodné alikvotné množstvo o obsahu 1,5—2 mg celkových 17-hydroxykortikoidov stanovených podľa R. H. Silbera a C. C. Portera [11] sme po rozpustení v 0,3 ml zmesi metanol—chloroform (1 : 1) vyššie opísaným spôsobom naniesli na stĺpec CaSO<sub>4</sub>. Za účelom zistenia výťažkov sme paralelne chromatografovali dva močové alikvoty, z ktorých jeden obsahoval známe množstvo umele pridaných steroidov.

#### **Výsledky a diskusia**

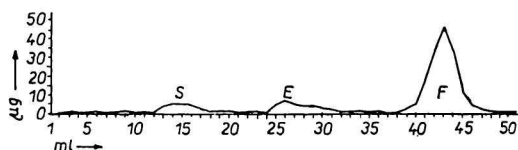
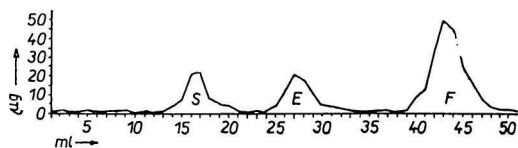
Na obr. 1 uvádzame chromatografické krivky zmesí čistých štandardných steroidov, ktoré obsahovali po 50, 100 a 200  $\mu$ g z každého steroidu. Je zrejmé, že chromatografický stĺpec pripravený zo 4 g CaSO<sub>4</sub> dostatočne ostro rozdeľuje steroidné zmesi v rozmedzí 50—200  $\mu$ g. Obr. 2 ukazuje, že metodika je vhodná pre oddeľovanie steroidov v močových extraktoch. Do jedného z močových alikvotov sme pridali po 50  $\mu$ g *S*, *E* a *F* látky. Výťažky jednotlivých steroidov sa pohybovali v rozmedzí 90—96 %.

5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-20-on (Reichsteinova *THS* látka), ktorý sa svojou polaritou podobá kortizolu a kortizónu, môže sa pri nami používanom spôsobe vymývať zo stĺpca spoločne s niektorou z týchto dvoch látok, čo by mohlo viesť k nesprávnej interpretácii výsledkov. Miesto vylučovania *THS* látky na chromatografických krivkách sme nemohli určiť, pretože nateraz nemáme k dispozícii jeho štandard. Vo väčšine prípadov sa však *THS* látka nevyskytuje medzi katabolitmi steroidných hormónov, vylučovanými do moču, čo sme si pri dosiaľ urobených analýzach overili tým, že sme príslušné eluáty zodpovedajúce kortizónu a kortizolu chromatografovali na papieri postupom podľa J. C. Touchstona a spolupracovníkov [12]. Ani v jednom

prípade sa nám nepodarilo zistiť škvrnu *THS*. Zvýšené vylučovanie *THS* látky do moču možno však očakávať u pacientov s vrodenou hyperpláziou a s tumormi kôry nadobličiek.



Obr. 1. Chromatografické krivky umele pripravených zmesí štandardných steroidov na stĺpci  $\text{CaSO}_4$ .



Obr. 2. V dolnej časti chromatografická krivka močového extraktu, v hornej časti ten istý extrakt po pridaní 50 µg *S*, *E* a *F* látky.

## Súhrn

Opísali sme metodiku oddelovania biologicky účinných 17-hydroxykortikoidov, a to 17 $\alpha$ -hydroxydeoxykortikosterónu, kortizónu a kortizolu stĺpcovou chromatografiou. Ako nosič sa použil v laboratóriu pripravený síran vápenatý. Metodika umožňuje dobré oddelenie uvedených steroidov v 90–96 % výťažkoch. Je možná aplikácia pre analýzu močových extraktov.

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 17-ГИДРОКСИКОРТИКОИДОВ НА КОЛОНКЕ $\text{CaSO}_4$

Я. МАТИС, О. АДАМЕЦ

Научно-лечебный эндокринологический институт в Любохви

Был описан метод распределения биологически активных 17-гидроксикортикоидов, а именно: 17 $\alpha$ -гидрокси-дезоксикортикостерона, кортизона и кортизола при помощи колоночной хроматографии. В качестве носителя был применен сернокислый кальций, полученный в лаборатории. Этим методом можно хорошо с 90–96 % выходами распределить выше приведенные стероиды. Этот метод можно применить для анализа экстрактов мочи.

Поступило в редакцию 18. 5. 1961 г.

# CHROMATOGRAPHISCHE VERTEILUNG VON 17-HYDROXYKORTIKOIDEN AUF EINER $\text{CaSO}_4$ -SÄULE

J. MATIS, O. ADAMEC

Endokrinologische Fachheilanstalt in Lubochňa

Es wird eine Methodik der Verteilung von biologisch wirksamen 17-Hydroxykortikoiden beschrieben, u. zw. des 17-Oxydesoxykortikosterons, des Kortisons und Kortisols durch die Säulenchromatographie. Als Träger wird ein im Laboratorium hergestelltes Kalziumsulfat benutzt. Diese Methodik ermöglicht eine gute Trennung der angeführten Steroide in Ausbeuten von 90—96 %. Die Applikation dieser Methodik für die Analyse von Harnextrakten ist möglich.

In die Redaktion eingelangt den 18. 5. 1961

## LITERATÚRA

1. Katzenellenbogen E. R., Dobriner K., Kritchevsky T. H., J. Biol. Chem. 207, 315 (1954). — 2. Jones J. K. N., Stitch S. R., Biochem. J. 53, 679 (1953). — 3. Johnson D. F., Heftmann E., Hayden A. L., Acta Endocrinol. 23, 341 (1956). — 4. Cook E. R., Dell B., Wareham D. J., Analyst 80, 215 (1955). — 5. Sweat M. L., Anal. Chem. 26, 1964 (1954). — 6. Haines W. J., Rec. Progr. Horm. Res. 7, 255 (1952). — 7. Nelson D. H., Samuels L. T., J. Clin. Endocrinol. 12, 519 (1952). — 8. Morris C. J. O. R., Williams D. C., Biochem. J. 54, 470 (1953). — 9. Romanoff L. P., Wolf R. S., Rec. Progr. Horm. Res. 9, 337 (1954). — 10. Dirscherl W., Korus W., Schriebers H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 305, 116 (1956).

11. Silber R. H., Porter C. C., J. Biol. Chem. 210, 923 (1954). — 12. Touchstone J. C., Bulaschenko H., Richardson E. M., Dohan F. C., J. Clin. Endocrinol. 17, 250 (1957).

Do redakcie došlo 18. 5. 1961

*Adresa autorov:*

*Inž. Ján Matis, inž. Otto Adamec, Odborný liečebný ústav endokrinologický, Lubochňa, okr. Lipt. Mikuláš.*