УДК 612:616.31:577.17

О. Г. Резніков, В. М. Демченко

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТЕСТОСТЕРОНУ В СІМ'ЯНИКАХ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ТА ФЛУОРИМЕТРІЇ

Тестостерон—найважливіший продукт внутрішньої секреції сім'яників [8], міститься в тестикулярній тканині в дуже обмеженій кількості. Тому визначення його вмісту потребує застосування досить складних і високочутливих методів. Існуючі методи — газова хроматографія, радіоімунологічний аналіз, методи конкурентного зв'язування [2, 4, 6] — мають високу розв'язувальну здатність, проте складні у виконанні і важкодоступні. Певного поширення при визначенні вмісту тестостерону набула паперова хроматографія [5]. Хублу і Шолбергу [7] вдалося спростити цю процедуру застосуванням тонкошарової хроматографії. Проте описаний авторами метод призначений лише для аналізу сечі і не може бути використаний для визначення вмісту тестостерону в сім'яниках, які мають велику кількість ліпідів і близьких до тестостерону стероїдних сполук.

Нами розроблено метод визначення вмісту тестостерону в сім'яниках, який базується на використанні стандартних пластин для тонкошарової хроматографії та флуориметрії, що забезпечує його доступність і високу чутливість.

Для аналізу об'єднували сім'яники від трьох щурів (5—10 *г*). На холоду знімали капсули із залоз і розтирали у фарфоровій ступці до утворення гемогенної маси. Згідно з рекомендацією Зандера [11], осадження білків і первинну екстракцію стероїдів здійснювали сумішшю етанолу та ефіру (3 : 1) двічі по 50 *мл*. Для кількісного урахування втрат тестостерону під час аналізу до гомогенату додавали 0,01 *мкКи* ^{14}С-тестостерону («Amersh», Англія, питома радіоактивність 58,2 *мКи/моль*). В разі відсутності умов для роботи з радіоактивними ізотопами середній коефіцієнт аналітичних втрат тестостерону може бути встановлено у попередніх дослідах за виходом нерадіоактивного стандарту стероїду, що його додають до гомогенату залоз у певній кількості.

Осад відокремлювали центрифугуванням. З'єднаний екстракт відганяли під вакуумом у струмені азоту до об'єму 2—3 *мл* і розводили 30 *мл* бідистильованої води. Екстракцію стероїдів з водно-спиртового розчину здійснювали 60 *мл* етилацетату на протязі 2 *хв* у ділильній лійці. Після відокремлення етилацетатної фази екстракцію повторювали ще чотири рази 30 *мл* порціями етилацетату. З'єднаний екстракт очищали двічі 50 *мл* 0,1 н. NaOH та 50 *мл* H_2O по 2 *хв*. Екстракт обезводнювали сульфатом натрію, фільтрували і відганяли повністю під вакуумом у струмені азоту.

Очистку від ліпідів здійснювали з допомогою холодової преципітації. Для цього сухий залишок екстракту розчиняли при слабому підігріванні у 10 *мл* 70% водного метанолу і вміщували у морозильну камеру холодильника (—10° С) на 16 *год*. Розчин обережно зливали в ділильну лійку, при цьому кристали ліпідів залишались на стінці колби. Залишки водного метанолу в колбі обережно змивали 20 *мл* охолодженої води і додавали до розчину у ділильній лійці. Далі провадили екстракцію стероїдів з водно-метанольного розчину 5 × 30 *мл* метиленхлориду по 1 *хв*. Цей екстрагент було нами обрано після випробування його екстрагувальної здатності у зазначених умовах у порівнянні з іншими органічними розчинниками: дихлоретаном, гексаном, хлороформом, бензолом. Перехід тестостерону до дихлоретану і метиленхлориду дорівнював відповідно 87—79%, проте останньому було надано перевагу в зв'язку з його меншою токсичністю. З'єднаний метиленхлоридний екстракт обезводнювали сульфатом натрію, фільтрували та відганяли під вакуумом у струмені азоту, концентруючи його на дні грушовидної колбочки.

Тестостерон виділяли з суміші стероїдів шляхом двохмірної тонкошарової хроматографії на силікагельних пластинах Silufol UV_{254}, 15 × 15 *см* (ЧССР) у герметизованих скляних посудинах за загальноприйнятою методикою [3] у системах «хлороформ: ацетон» (96 : 4) і «хлороформ: етанол» (98 : 2). Згідно з нашими спостереженнями, ці хроматографічні системи забезпечують найкраще відокремлення тестостерону у порівнянні з іншими розчинниками та їх комбінаціями. Розташування тестостерону на хроматограмі встановлювали при опромінюванні УФ світлом згідно з локалізацією кристалічного стандарту (рис. 1).

Ділянку силікагелю, що відповідала розташуванню тестостерону, переносили у центрифужну пробірку. Елюцію тестостерону здійснювали послідовно 2; 1 і 1 *мл* метанолу по 1 *год* при 40° С. Перед відокремленням елюатів пробірки центрифугували. Десяту частину з'єднаного елюату випарювали і використовували для вимірювання радіоактивності на бета-спектрометрі Isocap 300 («Nuclear Chicago», США) з використанням сцинтиляційної рідини ЖС-107.

Для проведення флуоресцентної реакції [7] метанол з елюату відганяли струменем азоту, сухий залишок розчиняли у 4 *мл* суміші H_2SO_4 та етанолу (4 : 1) і витримували на водяній бані 12 *хв* при 56° С. Після охолодження туди ж додавали 6 *мл* абсолютного етанолу. Інтенсивність флуоресценції вимірювали через 15 *хв* на спектрофлуориметрі МРГ—2А («Hitachi», Японія) при $\lambda_{зб}=468$ *нм* і $\lambda_{фл}=530$ *нм*. Для цього також користувались вітчизняним флуориметром ЕФ-3 МА з фільтрами $Б_{2-1}$ і $Б_{2-2}$. Максимальна флуоресценція спостерігається при $\lambda=530$ *нм* (рис. 2). При розрахунку концентрації тестостерону у сім'яниках враховували фонову флуоресценцію силікагелю, реактивів, флуоресценцію стандарту тестостерону (0,5—1,0 *мкг*), а також вихід радіоактивності.

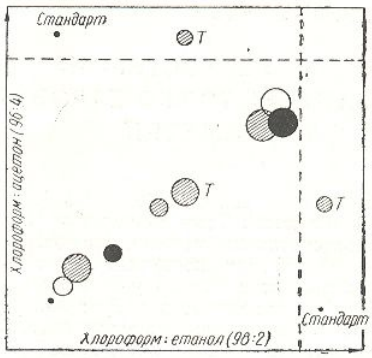

Рис. 1. Тонкошарова хроматограма стероїдів з сім'яників щурів та стероїдних стандартів.

Заштриховані кружечки — ділянки, що поглинають УФ світло; чорні — ділянки позитивної реакції з трихлористою сурмою; білі — ділянки стероїдів, які реагують з мета-динітробензолом. *Т* — тестостерон.

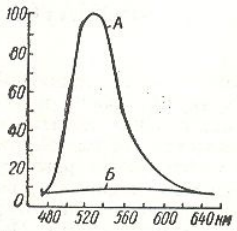

Рис. 2. Спектр флуоресценції тестостерону при збудженні $\lambda=468$ *нм*.

А — стандарт тестостерону, *Б* — контроль реактивів. По вертикалі — інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях.

Порівняльна характеристика інтенсивності флуоресценції стероїдів із схожими хроматографічними властивостями

Стероїд	Інтенсивність флуоресценції, в %
Тестостерон	100
Етіохоланолон	4,4
20α-оксипрегненолон	21,2
17α-оксипрогестерон	2,2
Прогестерон	0
Прегненолон	1,1

Специфічність описаного методу обумовлена якістю хроматографічного виділення тестостерону з суміші сполук з близькими хроматографічними властивостями. Для систем «хлороформ : ацетон» і «хлороформ — етанол» знайдено відповідно такі величини відносної хроматографічної рухомості (*Rm*) : тестостерон — 1,00 і 1,00, андростендіон — 1,93 і 1,73, андростерон — 1,61 і 1,48, дегідроепіандростерон — 1,60 і 1,48, етіохоланолон — 1,19 і 1,36, холестерин — 2,1—2,0, прогестерон — 1,65 і 1,80, 17α-оксипрогестерон — 1,09 і 1,22, 17α-оксипрегненалон — 0,59 і 0,89. *Rm* прегненолону у першій системі — 1,67.

Аутентичність тестостерону на хроматограмі доведено високим рівнем радіоактивності в зоні розташування гормона, величинами його хроматографічної рухомості в порівнянні з стандартом, поглинанням УФ світла, негативними кольоровими реакціями з трихлористою сурмою і мета-динітробензолом, характеристиками спектра флуоресценції.

Відомо, що залежно від умов реакції тестостерону з сірчаною кислотою та етанолом максимальна флуоресценція похідних сполук виявляється в зеленій або червоній ділянках спектра [9]. Використані нами умови, в яких розвивається зелена флуоресценція, забезпечують більшу чутливість методу, ніж в умовах червоної флуоресценції. В цих умовах тестостерон виявляє найбільшу флуоресценцію у порівнянні з іншими стероїдами (див. таблицю).

Чутливість використаної флу
В діапазоні 0,05—2,0 *мкг* виявле
кількості стероїда. Загальні втр
Вихід тестостерону, який додава

Визначена описаним методо
5—7-місячного віку дорівнює 74
ратури [1].

1. *Бабичев В. Н., Волина Е.* стереотоксическом разрушени кринол., 1970, **16**, № 5, с. 61—6
2. *Куроедова И. А., Размадзе Т.* ме крови методом конкурент **19**, № 5, с. 30—36.
3. Юдаев Н. А. Биохимия сте **135 с.**
4. *Benraad Th. J.* e. a. Comparis a gaschromatographic method ma.— J. Steroid *Biochem., 1972*
5. *Domingues O. V.* Chromatogr lysis. Vol. 1 (Ed. by H. Carsten
6. *Dufau M. L., Catt K. J., Tsuru* Radioimmunoassay of testoste 1972, **90**, № 4, p. 1032—1040.
7. *Hubl W., Scholberg K.* Die ilu und androst-4en-3, 17-dion na harn.— Acta endocrinol., 1968,
8. *Ismail A., Loraine J.* Recent J. Obstet. and Gynaec. Brit., 19
9. *Orli E., Neuwirth J., Scharo* Biochem., 1969, **32**, № 3, 381—3
10. *Suzuki G., Eto T. Androgens* Jap., 1962, **9**, № 4, p. 277—283.
11. *Zander J.* Progesteron.— In: London, Acad. Press, 1962, p. 9

Київський інститут ендокринолог
та обміну речовин

УДК 543.545

АПАРАТ ДЛЯ ВЕ
В ПОЛІАКРИЛАМІ

Останнім часом перевага ві
трофорезу дістала загальне визн
і частково ідентифікувати білки
гіпофіза, колаген, актин, білки ц
два фактори: а) досить складно
люваного субстрату; б) майже н
люваного матеріалу. Проте перш
кації [2]. Позитивна якість цього
не в цільному циліндричному ге
пустотілому циліндрі, стінка як
поздовжній осі, після чого цилінд
бути успішно оброблена на будь-
Другий недолік, що стосує
нутий. Відомо, що якість відокр
чим менша тривалість відоклемл
Проте зі збільшенням напруже
тепла, що несприятливо впливає