

JERZY JANECKI, WANDALIN MASSALSKI, STEFAN ZGLICZYŃSKI

PRÓBY OZNACZANIA KORTYKOSTERONU I JEGO POCHODNYCH W WYCIĄGACH Z MOCZU

Z Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej SDL w AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. J. Krawczyński

i z I Katedry Chorób Wewnętrznych SDL w AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. W. Hartwig

Kortykoidy posiadające łańcuch alfa-ketolowy przy 17 węgłu dają reakcję barwną z błękitem tetrazoliowym; sterydy, które posiadają dodatkowo grupę OH przy tym samym węglu dają barwną reakcję Portera-Silbera. Wykorzystując różnice między tymi reakcjami oznaczano kortykosteron i jego pochodne po rozdziale wyciągów chloroformowych z moczu przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymywane wartości liczbowe odpowiadały oczekiwaniu, jeżeli wyniki oznaczeń opracowywano matematycznie (ekstrapolacja), a nie brano pod uwagę prostej różnicy.

Biosynteza i metabolizm kortyzolu są od szeregu lat przedmiotem szczegółowych badań (3, 4, 5). W znacznie mniejszym stopniu natomiast opracowane są zagadnienia związane z kortykosteronem (12). Rola tego sterydu jako metabolitu dezoksykortykosteronu i prekursora aldosteronu jest szczególnie ważna w dziedzinie zaburzeń wodno-elektrolitowych, ściśle zespolonych z mechanizmami regulującymi ciśnienie krwi.

Dokładne wyodrębnienie i oznaczenie kortykosteronu wraz z jego pochodnymi w różnych stanach chorobowych zostało przedstawione przez Costa (5). Autor ten posługiwał się chromatografią bibułową, wymagającą wielodniowego rozwijania chromatogramów i wielokrotnej rechromatografii. Jest to metoda niewątpliwie bardzo precyzyjna i cenna, jednakże tak skomplikowana, że zastosowanie jej w badaniach klinicznych nie jest praktycznie możliwe.

Kortykosteron, podobnie jak kortyzon zawiera łańcuch alfa-ketolowy przy C¹⁷, nie zawiera natomiast, w przeciwieństwie do kortyzolu i jego pochodnych grupy OH przy tym węglu. W związku z tym kortykosteron i jego metabolity, podobnie jak kortyzol i jego pochodne dają reakcję z błękitem tetrazoliowym (BT) (7), nie dają natomiast reakcji z fenylohydrazyną (oznaczenie chromogenów Portera-Silbera) typowej dla sterydów pochodzących z metabolicznego ciągu kortyzolu. Te właśnie właściwości postanowiono wykorzystać dla oznaczania kortykosteronu wraz z jego metabolitami w mieszaninie obu omawianych sterydów i ich pochodnych.

W celu skrócenia całości badań chromatografię bibułową zastąpiono chromatografią cienkowarstwową (1, 6, 9, 10, 11, 13).

METODYKA

Odczynniki: Do badań używano odczynników, które używano w poprzedniej pracy (11).

Postępowanie: Hydrolizę moczu, ekstrakcję a także przygotowanie płytek i ich pokrywanie żelem krzemionkowym przeprowadzono w sposób opisany poprzednio (11).

Rozwijanie chromatogramów: Rozwijanie chromatogramów przeprowadzono techniką wstępującą w komorach do chromatografii cienkowarstwowej f-my Shandon, stosując koszulki z bibuły w celu równomiernego nasycenia komory parami rozpuszczalników.

Do rozwijania używano mieszaniny chloroformu (świeżo destylowanego z nad benzydyny) i alkoholu etylowego rektyfikowanego w stosunku 17:3 (v/v). Rozwijanie przeprowadzano na drodze około 15 cm, następnie płytkę wyjmowano, suszono w temp. pokojowej aż do zniknięcia zapachu rozpuszczalników i ponownie rozwijano w tej samej mieszaninie.

Lokalizacja sterydów: Nie mając do dyspozycji tetra-hydro-pochodnych kortykosteronu w postaci czystych substancji wzorcowych określano ich ruchliwość na płytce na podstawie przesłanek pośrednich. Rozwinięte chromatogramy suszono na powietrzu i oglądano w świetle lampy rtęciowej niskociśnieniowej o maksimum emisji przy $\lambda = 254$ nm, w celu zlokalizowania wszystkich substancji absorbujących światło nadfioletowe.

W ten sposób w skrajnych pasach oznaczano położenie wzorców F, E i B oraz wzorców F, E w materiale biologicznym. Zbieranie adsorbentu z płytek i eluowanie sterydów: Żel zbierano ze strefy, której górną granicę stanowiła górna granica plamy kortyzonu, a dolną granicę dolna granica plamy kortyzolu. Sterydy eluowano mieszaniną metanolu i chloroformu w stosunku 1:1. Eluat odparowywano do sucha w strumieniu azotu, przy temperaturze 50° . Wywoływanie chromatogramu: Po zebraniu żelu ze sterydami przeznaczonymi do oznaczeń kolorymetrycznych płytkę zanurzano w całości do 0,1% roztworu BT w 2 N KOH w metanolu. W ten sposób można było sprawdzić, czy plamy tetrahydro-pochodnych kortyzolu nie zostały naruszone w czasie zbierania żelu.

Oznaczenia kolorymetryczne: Pomiary kolorymetryczne wykonywano w sposób opisany uprzednio w opublikowanej pracy (11), z tym, że ekstynkcję mierzono przy pomocy spektrofotometru wobec próby zerowej przy długości fali 525 nm, stosując poprawkę Allena ± 45 nm. Zawartość sterydu w próbkę określano przy pomocy wykresu kalibracyjnego wykonanego w analogiczny sposób z roztworami czystych wzorców E i F.

Chromogeny Portera-Silbera oznaczano zmodyfikowaną metodą *Cal-low-Callow* (2).

BADANIA DOŚWIADCZALNE

Przygotowanie materiału biologicznego. W drugiej dobie stosowania ACTH prolongatum ($2 \times$ w ciągu doby domięśniowo 25 mg) uzyskano u chorej M. K. 830 ml moczu, z którego 400 ml poddano hydrolizie enzymatycznej i ekstrahowano 800 ml chloroformu świeżo destylowanego znad benzydyny. Uzyskano około 700 ml wyciągu. Otrzymany wyciąg rozdzielono na dwie równe części, które oznaczono nume-

rami I i II. Obydwie części odparowano do sucha pod próżnią. Część Nr II umieszczono w temp. 4°C przeznaczając ją do dalszych badań. Część Nr I rozpuszczono w 150 μ l mieszaniny chlorku metylenu z metanolem (4:1) (v/v) zawierającym w 1 μ l około 1 μ g F i 1 μ g E.

Kontrola powtarzalności badania: Przygotowano 4 płytki chromatograficzne (20 cm $\times$ 20 cm). W skrajnych pasach umieszczono wzorce F, E, B w ilości około 10 μ g. Pierwszy pas każdej płytki nie zawierał sterydów (eluat samego żelu służył jako odnośnik w badaniach kolorymetrycznych), a na pozostałe trzy pasy nakładano w linii startowej po 10 μ l wyciągu moczu.

Granice plamy F i B ustalono w świetle pozafioletkowym. Żel zbierano oddzielnie z odpowiednich stref każdego pasa. Otrzymane eluaty odparowywano do sucha. Następnie wprowadzano do próbówki mikrostrzykawkę Hamiltona 50 μ l mieszaniny chlorku metylenu i metanolu (4:1 v/v), rozpuszczano eluat i rozdzielano go na dwie równe porcje. W jednej porcji oznaczano sterydy przy pomocy reakcji barwnej z B. T. a w drugiej oznaczano chromogeny Portera-Silbera.

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli I.

Tabela I

Zestawienie wyników 11-krotnego oznaczenia pochodnych kortykosteronu przy pomocy błękitu tetrazoliowego i reakcji Portera-Silbera

	Ilość sterydów (μ g w próbce)		Różnica BT — P-S
	reakcja z BT	reakcja P-S	
Płytki I	50,4	43	7
	47,7	35	13
	49,8	37	13
Płytki II	48,3	40	8
	54,2	40	14
	52,5	40	13
Płytki III	49,1	37	12
	52,8	37	16
	48,6	37	12
Płytki IV	57,6	48	10
	60,1	48	12
Średnio	50,4	38,4	12

Pozostały chromatogram wywoływano w sposób podany wyżej i stwierdzono w niektórych pasach nieznaczne naruszenia plam THE. Kontrola wpływu ogólnej ilości sterydów znajdujących się w wyciągu na wyniki oznaczeń sterydów nie zawierających grupy OH przy C¹⁷: Część wyciągu moczowego oznaczoną Nr II rozpuszczano w 150 ml tego samego roztworu, którego używano w czasie badania części Nr I i nałożono w ilości po 10 μ l (a więc w ilościach zbliżonych do uprzednio stosowanej) na 9 pasów trzech płytek chromatograficznych, przygotowanych podobnie jak w poprzednim doświadczeniu.

Na pasy startowe, zawierające materiał biologiczny nakładano różne ilości (10, 25 albo 50 μ g) wzorcowych substancji sterydowych (kortyzonu — E, kortyzolu — F).

Rozwijanie chromatogramu i oznaczanie granic plam poszczególnych sterydów wykonywano analogicznie, jak w czasie opracowywania części wyciągu oznaczonej Nr I.

Po zebraniu żelu wywoływano chromatogramy i stwierdzono, że żel zawierający plamy THE został częściowo zebrany w czasie opracowywania nie wywołanego chromatogramu.

Oznaczanie sterydów przy pomocy reakcji z BT i oznaczanie chromogonów Portera-Silbera przeprowadzono w sposób opisany wyżej.

Wyniki zebrano w tabeli II.

Tabela II

Zestawienie wyników oznaczania pochodnych kortykosteronu w tych samych ilościach ekstraktu moczu, do których dodano różne ilości kortyzonu i kortyzolu

Dodana ilość sterydów		Oznaczona ilość sterydów (μg w próbce)		Różnica BT — P-S
kortyzon	kortyzol	reakcja z BT	reakcja P-S	
0	25	49	33	16
0	50	60	50	10
0	0	50	35	15
25	0	61	48	13
25	25	70	62	8
25	50	83	81	2
50	0	68	60	8
50	25	69	60	9
25	50	72	71	1

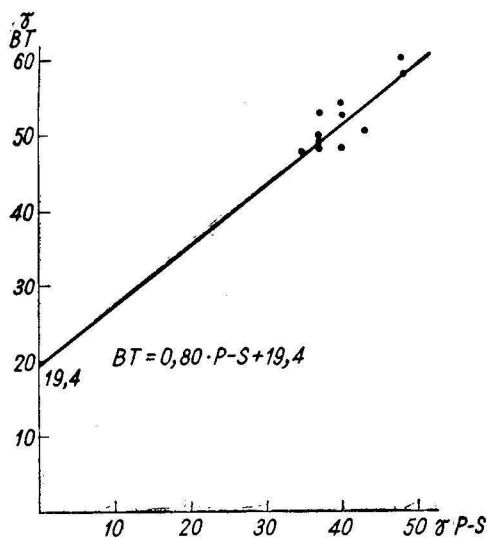
Oznaczanie pochodnych kortykosteronu u zdrowych osobników: Opisane poprzednio badania przeprowadzono na materiale biologicznym, pochodzącym od osoby, której podawano ACTH. W tych warunkach ilość kortykosteronu i jego pochodnych w moczu mogła być szczególnie duża. Wobec tego postanowiono dodatkowo przebadąć materiał biologiczny pochodzący od 2 osób zdrowych, znajdujących się w warunkach fizjologicznych. Badania wyciągu, które oznaczono kolejnymi numerami III i IV przeprowadzono w sposób analogiczny do opisanego przy opracowywaniu części wyciągu (po ACTH) oznaczonej Nr II.

Wyniki przedstawiono w tabeli III.

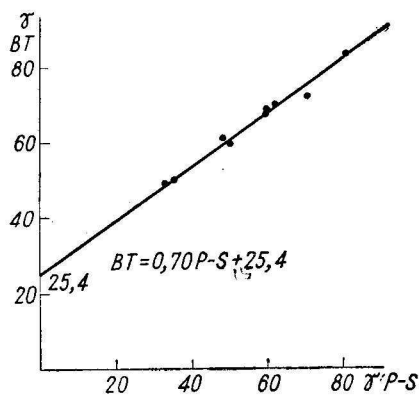
Tabela III

Zestawienie wyników oznaczania pochodnych kortykosteronu u 2 zdrowych osobników w tych samych ilościach ekstraktu moczu, do których dodano różne ilości kortyzonu i kortyzolu

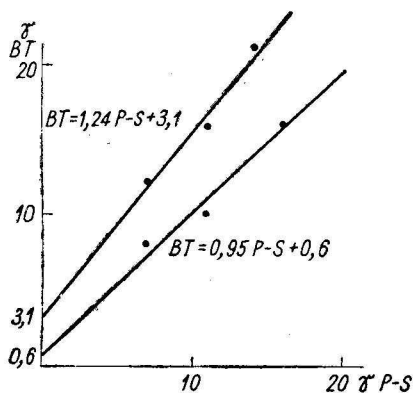
	Ilość sterydów (μg w próbce)		Różnica BT — P-S
	reakcja z BT	reakcja P-S	
H. W.	8	7	1
	10	11	—1
	16	16	0
H. P.	12	7	5
	16	11	5
	21	14	7



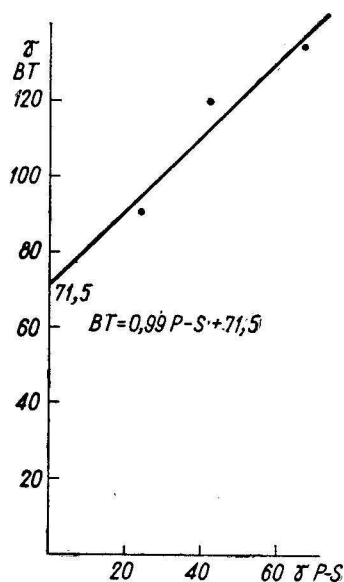
Ryc. 1a.



Ryc. 1b.



Ryc. 1c.



Ryc. 1d.

Ryc. 1. Korelacja wyników oznaczania sterydów przy pomocy BT z wynikami oznaczania chromogenów P—S. a) Wyniki oznaczeń w 11 jednakowych próbkach wyciągu tego samego moczu, b) wyniki oznaczeń w jednakowych próbkach, do których dodano różne ilości sterydów (kortyzonu i kortyzolu), c) każda prosta odpowiada wyciągowi z moczu osoby zdrowej; do badanego moczu dodawano różne ilości kortyzonu i kortyzolu, d) próbki zawierające jednakowe ilości kortykosteronu a różne ilości kortyzonu.

Wyniki liczbowe uzyskane w opisanych powyżej doświadczeniach poddano analizie statystycznej i graficznej, wykreślając dla każdej grupy badań zależność oznaczonej wartości chromogenów P-S od wartości sterydów określonej reakcją z BT oraz wyznaczając dla każdej zależności równanie regresji. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 1 a, b, c.

Badania na czystych substancjach wzorcowych: Niezależnie od badań materiału biologicznego wykonano pomiary na czystych substancjach wzorcowych odmierzanych bezpośrednio do próbówki. Przygotowano około 2% roztwory kortyzonu (E) i kortykosteronu (B) w mieszaninie chlorku metylenu i metanolu (4 : 1 v/v). Do pierwszej próbówki wprowadzono 20 μ l roztworu B oraz 10 μ l roztworu E, do drugiej próbówki 20 μ l roztworu B oraz 20 μ l roztworu E, a do trzeciej 20 μ l roztworu B i 30 μ l roztworu E. Oznaczano zawartość sterydów w każdej próbówce, posługując się reakcją z BT. W drugiej, identycznie przygotowanej serii próbek oznaczano chromogeny P-S.

Wyniki przedstawiono w tabeli IV i na ryc. 1 d.

Tabela IV

Wyniki oznaczania przy pomocy reakcji z BT i metodą Portera-Silbera jednakowych ilości kortykosteronu, w obecności różnych ilości kortyzonu

Nr próbówki	Ilość sterydów (μ g w próbce)		Różnica BT — P-S
	reakcja z BT	reakcja P-S	
1	91	24	67
2	120	42	78
3	134	66,5	67,5
			średnio 70,8

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Badania doświadczalne przeprowadzano nie posiadając odpowiednich wzorców sterydowych. Przyjęto, że tetrahydropochodne kortykosteronu (i ewentualnie część pochodnych 11-dehydrokortykosteronu) powinny znajdować się w granicach plam E i F oraz w pasie między tymi plamami. Oparto się na następujących przesłankach: 1) tetrapochodne kortyzonu, jako związki bardziej polarne powinny się znajdować bliżej startu, niż steryd macierzysty, 2) w jednej z poprzednich prac, w której posługiwano się kortyzonem radioaktywnym oraz chromatografią dwukierunkową stwierdzono w pobliżu plam kortyzolu i kortyzonu obecność nieradioaktywnych plam sterydowych, będących najprawdopodobniej pochodnymi kortykosteronu (8). Plamy te były szczególnie wyraźne w moczach osób, którym podawano ACTH przed i w czasie zbierania moczu, 3) w innej serii badań (14) stwierdzono, że po wprowadzeniu do ustroju ludzkiego kortykosteronu 7^3H na chromatogramie przygotowanym wg opisu podanego w niniejszej pracy maksymalna radioaktywność znajduje się między plamami kortyzolu i kortyzonu. W materiale biologicznym zawierającym różne ilości 17-OH sterydów próba zwykłego zestawienia wyników uzyskanych przy użyciu BT i przy pomocy metody P-S nie dała dobrego rezultatu. Odtworzenie podobnych warunków przy użyciu sterydów wzorcowych dało natomiast wyniki zadowalające.

Obecność w materiale biologicznym chromogenów niesterydowych jest

być może jedną z przyczyn powodujących, że odejmowanie od sumarycznej ilości sterydów oznaczonych przy użyciu BT ilości chromogenów P-S prowadzi do uzyskania wartości liczbowych o bardzo dużym rozrzucie i pozbawia je tym samym przydatności klinicznej. Jednakże oznaczanie chromogenów P-S pomimo małej swoistości daje dobrą powtarzalność wyników, przynajmniej przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczeń w tym samym czasie. Dlatego też, aby wykorzystać pomiary z użyciem BT i reakcji P-S koniecznym jest zestawienie kilku (najmniej dwóch) równoczesnych badań tego samego wyciągu moczu, po podaniu różnych ilości E lub F. Ekstrapolacja uzyskanych wyników (graficzna lub rachunkowa) do stanu odpowiadającego $P - S = 0$ daje poszukiwaną wartość. Okazało się przy tym, że obie użyte metody: BT i P-S odznaczają się dobrą korelacją, tak że rozrzut poszczególnych wyników jest stosunkowo nieznaczny. Zapewnia to dokładność oznaczeń różnicy B-T i P-S rzędu 1,0 do 1,5 μg w próbce.

WNIOSKI

1. Przedstawiono metodę oznaczania kortykoidów nie posiadających grupy OH przy C^{17} w wyciągach z moczu.
2. Wskazano na możliwość wykorzystania w sposób właściwy zestawienia oznaczeń uzyskanych przy pomocy reakcji z BT i w reakcji P-S.
3. Równoległe oznaczanie w tym samym materiale biologicznym chromogenów P-S i sterydów w reakcji z BT pozwala na wyliczenie ilości kortykosteronu i jego pochodnych.
4. Ilość metabolitu kortykosteronu oznaczona w materiale biologicznym odpowiada wartości oczekiwanej.
5. Opracowana metoda może być użyta do oznaczania radioaktywności swoistej metabolitów po podaniu radioaktywnego kortykosteronu.

Praca finansowana przez Wydział Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk. Autorzy dziękują Dr med. hab. B. Migdalskiej za wykonanie oznaczeń chromogenów P-S oraz mgr W. Lewensztajnowi, kierownikowi Zakładu Hormonów i Witamin Instytutu Farmaceutycznego i adiunktowi inż. J. Vaedtke za udostępnienie aparatury chromatograficznej i życzliwe rady.

И. Яанецки, В. Массальски, С. Згличиньски

ПОПЫТКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Кортикостерона и его производных В ЭКСТРАКТАХ ИЗ МОЧИ

Содержание

Кортикоиды имеющие альфа-кетоловую цепь при C^{17} дают цветную реакцию с тетразолевым синим, стероиды, имеющие дополнительно группу OH при этом же угле дают цветную реакцию Портера-Зильбера. Используя разницы между этими реакциями определяли кортикостерон и его производные при отделении хлороформных экстрактов из мочи и помощи тонкослойной хроматографии. Полученные численные значения отвечали ожиданию, если результаты обозначений обрабатывались математически (экстраполяция) и не учитывалась простая разницы.

J. Janecki, W. Massalski, S. Zgliczyński

THE TRIALS OF CORTICOSTERON AND ITS RELATIVES ASSAY IN URINE EXTRACTS

Summary

The corticosteroids having alpha-keto chain at C¹⁷ give colour reaction with blue-tetrazolium; steroids which have additionaly OH-group at the same carbon give colour reaction of Porter-Silber. On this basis there were corticosteron and its relatives examined using thin layer chromatography in application for chloroform extracts of urine.

The quantitative values thus obtained were the same as postulated when the results were matematycaly extrapolated and when the ordinary difference was then neglected.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bush I. E.*: The chromatography of steroids. Pergamon Press Oxford, London, New York, Paris. — 2. *Callow N., Callow R., Emens C.*: Biochem. J., 1938, 32, 1312. — 3. *Cope C. L., Back E. C.*: Clinical Sci., 1958, 17, 1. — 4. *Cope C. L., Pearson J.*: J. Clin. Path., 1965, 12, 82. — 5. *Cost W. S., Vegter J. J.*: Acta Endocr., 1962, 41, 571. — 6. *Hartwig W., Lewenstein W., Vaedtke J., Massalski W., Migdalska B.*: Pol. Arch. Med. Wewn., 1966, 36, 171. — 7. *Izzo A., Keutman E., Burton R.*: J. Clin. Endocr., 1957, 17, 889. — 8. *Massalski W.*: Dobowa produkcja kortyzolu i jego metabolizm u ludzi. Badania radioizotopowe (w druku). — 9. *Massalski W., Janecki J.*: Diagn. Labor., 1967, 3, 139. — 10. *Massalski W., Janecki J.*: Diagn. Labor., 1967, 3, 39. — 11. *Massalski W., Vaedtke J., Malinowska M., Migdalska B.*: Pol. Arch. Med. Wewn., 1966, 36, 189. — 12. *Peterson R. E., Pierce C. E.*: J. Clin. Invest., 1960, 39, 741. — 13. *Vaedtke J., Massalski W., Janecki J., Malinowska M., Migdalska B.*: Diagn. Labor., 1967, 3, 233. — 14. *Zgliczyński S., Massalski W., Janecki J., Małesa J., Siwicki H.*: Próby oznaczania dobowej produkcji kortykosteronu u ludzi przy użyciu kortykosteronu ⁷³M i po rozdzieleniu metabolitów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (w druku).

Wpłynęło dnia 3. VI. 1968

Adres autora I.: Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej SDL, Warszawa, ul. Ceglowska 80.