

BARBARA BUNTNER

OZNACZANIE TESTOSTERONU W KRWI ŻYŁY JĄDROWEJ SZCZURA PRZY POMOCY CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Z Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Instytutu Patologii
Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Opisano metodę oznaczania stężenia testosteronu we krwi żyły nasiennej szczura przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Testosteron był identyfikowany przez: 1) porównanie R_f ze standardem w różnych systemach chromatograficznych, 2) przekształcenie w pochodną acetylową, chromatografię i ponowne zmydlenie do wolnego testosteronu, 3) chromatografię gazową, 4) porównanie krzywych absorpcyjnych w UV.

Wyniki dotyczące dokładności precyzji i strat w przedstawionej metodzie były zadowalające. Stężenie testosteronu we krwi żyły nasiennej u 30 szczurów dojrzałych płciowo (średni ciężar ciała 230 ± 14 g) wyniosło średnio 465 ± 170 ng/ml.

WSTĘP

Oznaczanie ilości testosteronu w krwi żyły jądrowej szczura jest dotychczas mało rozpowszechnione, głównie z powodu trudności jakie stwarza sam sposób pobierania krwi, jak również z powodu niskiego stężenia tego hormonu. W nielicznych doniesieniach na ten temat autorzy posługiwali się metodą chromatografii bibułowej (7), cienkowarstwowej (2), gazowej (6) a także metodą izotopowych rozcieńczeń (1) z reguły przeznaczając do oznaczeń krew pochodzącą od kilku zwierząt równocześnie (2, 7).

Celem pracy jest przedstawienie metody, pozwalającej z zadowalającą dokładnością i precyzją oznaczyć testosteron w krwi pobranej z żyły jądrowej pojedynczego szczura. Wydaje się również, że mimo wprowadzenia obecnie do badań nowoczesnych metod oznaczania testosteronu jak metody radioimmunologiczne (RIA), prześledzenie szlaków metabolicznych przemiany androgenów w jądrze szczura jest możliwe tylko przez zastosowanie metod chromatograficznych, które oprócz testosteronu pozwalają na ilościowe oznaczanie i innych metabolitów.

MATERIAŁ I METODY

a) **Zwierzęta.** Do doświadczenia użyto 30 szczurów szczepu Wistar dojrzałych płciowo (średni ciężar ciała 230 ± 14 g) pochodzących z hodowli własnej prowadzonej gromadnie. Zwierzęta trzymano w dobrym oświetleniu dziennym. Pokarm otrzymywały one w postaci diety standardowej a wodę do picia pobierały z poidełek „ad libitum”.

b) **Odczynniki.** W pracy stosowano odczynniki o czystości cz. d. a. (produkcja POCh — Polska), które przed użyciem redestylowano. Radio-

aktywny (1,2 ^3H) testosteron o specyficznej aktywności 41,4 Ci mmol, uzyskany z Radiochemical Centre Amersham England — przed użyciem oczyszczano chromatograficznie na bibule Whatman nr 1 w systemie VII. Jako standardy używano następujące nieradioaktywne sterydy: testosteron¹⁾, 7 α -OH testosteron, epitestosteron, androstendion, 17 α -OH progesteron, progesteron i 5 α -dwuhydrottestosteron (firmy Koch and Light Laboratories Ltd.).

c) Chromatografia. Chromatografię stosowano do oczyszczania standardów, rozdziłu sterydów oraz celem identyfikacji testosteronu w krwi żyły nasiennej szczura. Chromatografię bibułową wykonywano na bibule Whatman nr 1, uprzednio przemytej gorącym metanolem i chloroformem w aparacie Soxleta. Chromatografię cienkowarstwową wykonywano na gotowych płytkach silikażelu Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, Czechoslovakia) i na DC-Plastikfolien Kieselgel F₂₅₄ (Merck Ag, Germany). W opisaney pracy zastosowano następujące systemy chromatograficzne: a) do chromatografii cienkowarstwowej — I. dwuchlorometan — octan etylu (3:1), II. benzen — eter etylowy (4:6), III. cykloheksan — octan etylu (1:1), IV. dwuchlorometan — metanol (97:3), V. chloroform — etanol (9:1), VI. benzen:chloroform (1:1), VII. cykloheksan:octan etylu (3:1), b) do chromatografii bibułowej — VIII. cykloheksan — toluen — metanol — woda (27:3:24:6 v/v).

d) Aparatura. Oznaczanie radioaktywności wykonywano na spektrometrze scyntylacyjnym (Betaszutr 5000 — Bertholdt — Germany). Zastosowany roztwór scyntylacyjny zawierał 5 g PPO i 0,3 g dwumetylo-POPOP w 1 litrze toluenu. Oznaczanie spektrofotometryczne testosteronu wykonywano na spektrofotetrze „Spektromom 203” (Budapest — Hungary).

e) Metoda. Krew do oznaczeń ilości testosteronu pobierano z żyły jądrowej szczura w ciągu 30 min (wg metody opisaney przez Bardin i Peterson (1) oraz Buntner (2) po uprzednim uspieniu zwierząt przez podanie dootrzewnowo 2% roztworu wodzianu chloralu (w ilości 1,8 ml na 100 g ciężaru ciała). Uzyskaną krew od jednego szczura rozcieńczano taką samą ilością H₂O, a następnie ekstrahowano mieszaniną złożoną z octanu etylu i chlorku metylenu w stosunku 1:1. Ekstrakcję powtarzano 3 krotnie. Połączone ekstrakty odparowywano pod próżnią do sucha w temp. nie przekraczającej 45°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w niewielkiej ilości chloroformu i nanoszono ilościowo na płytki służące do chromatografii cienkowarstwowej (Silufol UV₂₅₄), a następnie rozwijano chromatogram w systemie VI. Po obu stronach ekstraktu nakładano 5 μg standardu testosteronu. Proces chromatografowania w tym samym systemie powtarzano trzykrotnie, każdorazowo kontrolując chromatogram w świetle lampy UV. W zastosowanym wyżej systemie chromatograficznym testosteron i jego metabolity pozostają na starcie natomiast substancje interferujące wędrują z frontem rozpuszczalnika.

Oczyszczony w powyższy sposób ekstrakt eluowano z płytki chromato-

¹⁾ testosteron = androsten-17 β -ol-3-on; 7 α -hydroxy-testosteron = androsten-7 α -17 β -diol 3-on; epitestosteron = androsten-17 α -ol-3-on; androstenedion = androsten-3,17-dion; 17 α -hydroksy-progesteron = progesteron-17 α -ol,3,20-dion; progesteron = pregnen-3,20dion; 5 α -dihydrottestosteron = androstan-17 β -ol-3-on.

graficznej i odparowywano w próbkach stożkowych do sucha, a następnie nakładano na płytki chromatograficzne typu DC — Plastikfolien Kieselgel F₂₅₄ i chromatogram rozwijano w systemie II. Po obu stronach chromatogramu nakładano standardy: testosteronu, 7 α OH-testosteronu, epitestosteronu, Δ^4 -androgen 3,17-dionu, 17 α OH-progesteronu, oraz progesteron o stężeniu 2 μ g (ryc. 1). Rozdział plam na chromatogramie uwiadczniano w świetle lampy UV. Plamę testosteronu zakreślano i eluowano 2 ml alkoholu metylowego. Testosteron oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 240 nm w obecności ślepej próby pobranej z chromatogramu. Wyniki odczytywano z krzywej standardowej.

f) Testy służące do potwierdzenia identyczności oznaczonej „plazmy” przyjętej jako testosteron z wzorcem testosteronu. Oznaczony spektrofotometrycznie ekstrakt „testosteronu” uzyskany od 30 szczurów zlewano łącznie, odparowywano do sucha a następnie chromatografowano w różnych systemach chromatograficznych ze standardem testosteronu. Uzyskane dane dotyczące migracji (R_f) standardu testosteronu i oznaczonej plamy przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wartości R_f badanej „plazmy” ekstraktu z krwi żyły jądrowej szczura oraz standardu testosteronu w różnych systemach chromatograficznych

Nr	Chromatografia	System	R_f	
			standard testosteronu	ekstrakt szczura
1	TLC *	I	0,41	0,41
2	TLC	II	0,32	0,33
3	TLC	III	0,51	0,51
4	TLC	IV	0,68	0,67
5	TLC	V	0,78	0,77
6	PPC **	VI	0,32	0,32

* TLC = chromatografia cienkowarstwowa

** PPC = chromatografia bibułowa

Eluowano z chromatogramu plamy „testosteronu” szczura i standard testosteronu poddano acetylacji (6). Wyekstrahowane octany testosteronu odparowano pod próżnią do sucha a następnie nałożono na płytki do chromatografii cienkowarstwowej DC — Plastikfolien — Kieselgel F₂₅₄ i chromatografowano w systemie VII. Uzyskane R_f dla octanu standardu testosteronu i badanej plamy były takie same i wynosiły 0,41.

Następnie powstałe octany testosteronu eluowano z chromatogramu i poddano zmydleniu celem otrzymania wolnych związków, które ponownie nakładano na płytki do chromatografii cienkowarstwowej (DC — Plastikfolien — Kieselgel F₂₅₄) i chromatografowano w systemie II uzyskując podobne R_f . Dalsze badania dotyczące identyfikacji przeprowadzono przy użyciu chromatografii gazowej i uzyskano zbliżone współczynniki migracji względnej (R_w obliczone w stosunku do standardu wewnętrznego) dla standardu octanu testosteronu $R_w = 0,86$ a dla testosteronu szczura $R_w = 0,87$.

Wykonano również krzywe absorpcyjne w świetle UV. Około 30 μ g związku z krwi żyły nasiennej szczura oraz standardu rozpuszczono w 2 ml absolutnego metanolu i mierzono absorpcję począwszy od dłu-

gości fali 220—350 nm. Uzyskano następującą charakterystykę optyczną: dla związku z krwi żyły nasiennej $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 241$ nm, zaś dla standardu testosteronu $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 243$ nm. Oznaczone widmo absorpcyjne w stężonym kwasie siarkowym wykazało maximum absorpcji przy 285 nm a minimum przy 235 i 350 nm (szczur), oraz maximum przy 290 nm a minimum przy 240 i 350 nm dla standardu testosteronu.

g) Ocena metody.

1. Odzyskanie testosteronu w opisanej wyżej metodzie oceniano przez dodanie jednakowych ilości ($1,2^3$ H) testosteronu do 5 różnych próbek krwi pobranych z żyły jądrowej szczurów i wykonanie ekstrakcji, oczyszczania, chromatografii oraz elucacji płam. Eluaty odparowano do sucha w naczynkach służących do pomiaru stopnia radioaktywności. Do trzech czystych naczynek odmierzono taką samą ilość ($1,2^3$ H) testosteronu jaką dodano do próbek krwi i również odparowano do sucha. Do wszystkich próbek dodano 10 ml roztworu scyntylacyjnego i po 24 godz. wykonano pomiar radioaktywności w spektrometrze scyntylacyjnym. Uzyskane dane przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Wyniki oznaczeń stopnia radioaktywności ($1,2^3$ H) testosteronu w (cpm) * dodanego do próbek krwi pobranej z żyły jądrowej szczura

Lp.	Ilość dodanego ($1,2^3$ H) testosteronu (cpm)	Ilość odzyskanego ($1,2^3$ H) testosteronu (cpm)	Odzyskano %
1	4811.000	4450.000	96,5
2	4350.000	3890.000	84,3
3	4673.000	4079.000	88,4
4	—	3925.000	85,1
5	—	4405.000	95,4
Srednio ±	4611.000 = 100%	4150.000 ± 263	89,4 ± 5,7

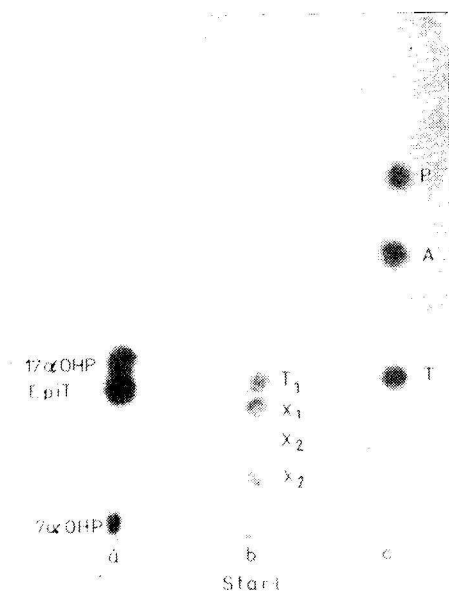
* cpm — ilość impulsów na minutę

2. Precyzję metody określono w sposób następujący: krew pobrana z żyły jądrowej od 10 szczurów zlano razem i podzielono na 10 różnych części, a następnie oznaczono w nich ilość testosteronu wg metody opisanej wyżej. Średnia ilość oznaczonego testosteronu wyniosła $370 \pm \pm 33$ ng/ml krwi a współczynnik wariancji 8,9%.

WYNIKI

Przedstawiony sposób ekstrakcji, oczyszczania i chromatografii cienkowsarstwowej pozwala na dość dokładne określenie ilości testosteronu we krwi żyły jądrowej szczura. Odzyskanie dodanego $1,2^3$ H testosteronu wynosiło średnio $89,4\% \pm 5,7\%$ (tab. II) a wyznaczony współczynnik wariancji 8,9. Poniżej przedstawiono zdjęcie rozwiniętego chromatogramu ekstraktu z krwi żyły jądrowej szczura oraz standardów. Na ryc. 1 oprócz intensywnej plamy testosteronu widoczne są jeszcze inne plamy bliżej niezidentyfikowanych związków, które oznaczono x_1 , x_2 i x_3 .

Z przytoczonych danych dotyczących identyfikacji testosteronu szczura we krwi żyły jądrowej widać, że w wyniku chromatografowania w różnych systemach chromatograficznych (tab. I) uzyskano b. zbliżone współczynniki migracji dla testosteronu szczura i standardu testosteronu.



Ryc. 1. Chromatograficzny rozdział ekstraktu z krwi żyły jądrowej szczura.

a i c — standardy:

T — testosteron,

A — androstendion,

P — progesteron,

7αOHT — 7α-hydroksytestosteron,

EpiT — epitestosteron,

17αOHP — 17α-hydroksyprogesteron,

b — ekstrakt z krwi żyły jądrowej szczura,

T₁ — testosteron,

x₁, x₂, x₃ — nieznanne związki.

Identyczne rezultaty uzyskano po acetylacji testosteronu szczura i ponownej chromatografii. R_f dla standardu testosteronu wynosił 0,31 a testosteronu szczura 0,32. Wykonane oznaczenia ilości testosteronu w krwi żyły jądrowej szczurów metodą opisaną wyżej wykazało, że stężenie testosteronu u 30 zwierząt wahało się od 220—780 ng/ml, średnio zaś 465 ± 170 ng/ml (tab. III).

DYSKUSJA

Porównanie własnych wyników oznaczeń ilości testosteronu w krwi żyły jądrowej szczura z danymi z piśmiennictwa natrafia na pewne trudności ze względu na małą ilość prac na ten temat oraz ze względu na to, że poszczególni badacze posługiwali się różnymi metodami przy oznaczaniu stężenia testosteronu. Suzuki i Eto (7) posługując się metodą chromatografii bibułowej do oznaczeń ilości testosteronu w krwi żyły jądrowej pochodzącej od 8 szczurów łącznie (ciężar ciała 250—340 g) podali, że średnie stężenie testosteronu wynosi w tych warunkach od 50 do 90 ng/ml, przy czym u wielu zwierząt w ogóle nie udało mu się oznaczyć testosteronu za pomocą stosowanej przez siebie metody. Natomiast Bardin i Peterson (1) stosując metodę izotopowych rozcieńczeń stwierdzili, że średnia ilość testosteronu we krwi żyły jądrowej oznaczona u 7 szczurów (ciężar ciała 230—250 g), wynosiła 42 ± 15 ng/ml. W wykonanej wcześniej pracy (2) średnie stężenie testosteronu oznaczone u 134 szczurów o wadze $242 \pm 14,1$ g wyniosło 190 ± 29 ng/ml. Jednakże zastosowana wówczas metoda oznaczania nie pozwalała na określenie ilości testosteronu u pojedynczego zwierzęcia (do jednorazowego oznaczania pobierano krew łącznie od 10 szczurów). Dopiero zastosowanie chromatografii cien-

Tabela III. Ciężar ciała, ilość krwi i stężenie testosteronu w krwi pobranej z żyły jądrowej pojedynczego szczura

Nr szczura	Ciężar ciała (g)	Ilość krwi (ml)	Testosteron (ng/ml)
1	240	9,8	370
2	210	3,3	660
3	210	5,8	390
4	240	8,6	340
5	210	7,2	230
6	235	8,5	320
7	210	7,0	360
8	240	5,0	360
9	255	4,0	600
10	230	7,8	560
11	230	10,5	220
12	235	10,0	480
13	240	12,0	800
14	240	5,0	450
15	240	6,2	320
16	240	7,5	470
17	240	6,8	390
18	240	12,6	420
19	230	4,5	690
20	240	10,8	740
21	220	7,0	540
22	210	7,0	370
23	210	7,0	230
24	250	7,0	540
25	210	5,5	310
26	210	7,0	780
27	230	7,0	540
28	210	7,0	240
29	240	7,0	360
30	220	7,0	770
Średnio ±	229 ± 14,4 (210—250)	7,4 ± 2,2 (3,3—12,6)	465 ± 170 (220—770)

kowarstwowej do oczyszczania ekstraktu, w systemie w którym testosteron nie wędruje z rozpuszczalnikiem pozwoliło na dość dokładne oczyszczenie ekstraktu, eliminując w dużej części substancje interferujące przy oznaczaniu spektrofotometrycznym. Uzyskane dość wysokie własne wyniki oznaczeń ilości testosteronu w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez *Bardin* i *Peterson* (1), *Suzuki* i *Eto* (7) oraz *Buntner* (2) mogą być wyrazem zastosowania przez nas bardziej dokładnego sposobu oczyszczania i rozdzielania chromatograficznego ekstraktu z krwi żyły jądrowej (odzyskanie $89,9 \pm 5,7\%$), jak również użyciem do badań pełnej krwi. *De Jong* i współ. (6) oznaczając testosteron w płazmie z krwi żyły jądrowej szczurów za pomocą chromatografii gazowej uzyskali również znacznie wyższe wyniki niż *Bardin* i *Peterson* (1) oraz *Suzuki* i *Eto* (7), a mianowicie u 32 zwierząt (ciężar ciała 200 ± 25 g) ilości testosteronu wahały się od 81 do 129 ng/ml. Z piśmiennictwa wiadomo również, że część sterydów jest związana w erytrocytach, np. wg *De Jong* i wsp. (6) w około 10%, zaś wg *Holzbauer* i *Vogt* (3) od 4% do 57%, tym samym wyniki oznaczeń ilości testosteronu byłyby prawdopodobnie wyższe gdyby badacze (1, 6, 7) oznaczali testosteron w pełnej krwi.

Porównanie wyników oznaczeń ilości testosteronu w krwi żyły jądrowej

wej szczurów oznaczonego za pomocą chromatografii cienkowarstwowej z danymi uzyskanymi przez zastosowanie do oznaczeń metody radioimmunologicznej pozwoli na wyjaśnienie tego zagadnienia.

Mimo pewnych niedogodności w opisanej wyżej metodzie jaką jest użycie do badań dość dużej ilości krwi (około 2 ml) prześledzenie szlaków metabolizmu androgenów w jądrze szczura jest możliwe jak widać przez zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej, czego dowodem jest wykazanie obecności bliżej niezidentyfikowanych związków x_1 , x_2 i x_3 (ryc. 1).

Б. Бунтнер

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА В КРОВИ ВЕНЫ ЯИЧКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

Описан метод определения концентрации тестостерона в крови семенной вены у крысы с применением тонкослойной хроматографии. Тестостерон идентифицировали путём:

- 1) сравнения R_f со стандартом в разных хроматографических системах растворителей
- 2) превращения в ацетил-производную, хроматографии и повторного омыления до свободного тестостерона
- 3) газовой хроматографии и
- 4) сравнения кривых абсорбции в ультрафиолете.

Точность, мера точности и потери вещества были удовлетворяющими. Концентрация тестостерона в крови семенной вены у 30 половозрелых крыс (средний вес тела 230 ± 14 г) составляла в среднем 465 ± 170 нг/мл.

B. Buntner

DETERMINATION OF TESTOSTERONE IN TESTICULAR VENOUS BLOOD OF RATS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Summary

A method for determination of testosterone concentration in the blood of the spermatic vein of rats by thin-layer chromatography is described.

Testosterone was identified by:

1. Comparison of R_f with a reference standard in different chromatographic systems.
2. Transformation to an acetyl derivative, chromatography and saponification again to free testosterone.
3. Gas chromatography.
4. Comparison of absorption curves in ultraviolet light.

The results were found to be satisfactorily accurate; the precision of the method and the losses were acceptable. The concentration of testosterone in the blood of spermatic vein in 30 sexually mature rats (mean body weight 230 ± 14 g) was 465 ± 170 ng/ml, on the average.

PIŚMIENNICTWO

1. Bardin C. W., Peterson R. E.: Studies of androgen production by the rat: Testosterone and androstenedione content of blood. *Endocrinology* 80, 38—44, 1967.
2. Buntner B.: Ilość testosteronu i jego metabolitów we krwi żyły nasiennej szczura w warunkach fizjologicznych. *Endokr. Pol.* 23, 343—349, 1972.
3. Holzbauer M., Vogt M.: Corticosteroids in plasma and cells of adrenal venous blood. *J. Physiol.* 157, 137—156, 1961.
4. Hall R. W., Gomes W. R.: Testosterone levels in the serum and testes of growing rats following prenatal exposure to busulfan. *J. Reprod. Fert.* 35, 131—134, 1973.

5. *Irsaliew Ch. J.*: Informacja ustna (Instytut Endokrynologii Akademii Nauk ZSRR — Moskwa).
6. *De Jong F. H., Hey A. H., Van der Molen H. J.*: Effect of gonadotropin on the secretion of oestradiol — 17 B and testosterone by the rat testis. *J. Endocr.* 57, 277—284, 1973.
7. *Suzuki Y., Eto T.*: Androgens in testicular venous blood in the adult rat. *Endocr. Jap.* 9, 277—283, 1962.

Adres autora: Barbara Buntner, Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
Śl. AM. ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze.