



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

198 489

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 06 06 77
(21) PV 3697 - 77

(51) Int. Cl. C 07 J 1/00

// C 07 J 5/00

(40) Zveřejněno 17 09 79

(45) Vydáno 01 8 82

(75)

Autor vynálezu BLOCHOVÁ MELÁNIE ing., PRAHA

(54) Způsob mikroextrakce pro stanovení frakcí 17-ketosteroidů a derivátů
progesteronu z moče

1

Vynález se týká způsobu mikroextrakce pro stanovení frakcí 17-ketosteroidů a derivátů progesteronu z moče pomocí chromatografické nebo fotometrické analýzy. Vynález umožňuje získat čistý extrakt uvedených steroidních hormonů, přičemž se celý extrakční a čistící proces provádí v jediné zkumavce a to bez nároků na speciální technické zařízení. Pod pojmem frakce 17-ketosteroidů a deriváty progesteronu se rozumí tyto látky: androsteron, etiocholanolon, dehydroepiandrosteron, 11-keto-androsteron, 11-keto-etiocholanolon, 11-hydroxy-androsteron, 11-hydroxy-etiocholanolon, pregnandiol, pernantriol a pregnantriolol.

Dosud známé způsoby extrakce jsou vícenásobné extrakce, přičemž vycházejí ze vzorku moče o objemu 4 až 100 ml, jsou pracné a vyžadují značné množství chemických činidel a několik laboratorních nádob. Tyto způsoby nelze použít jako mikrometodu, neboť neumožňují dosáhnout dostatečného množství a čistoty výtěžku pro další analýzu. Značně efektivní je postup podle článku "Evaluation of a gas-liquid chromatographic method for the determination of urinary steroids using high-resolution open-tubular glass capillary columns", Bailey E. - Fenoughty M. - Chapman J. R., Journal of Chromatography, 96/1974, str. 33-46, Elsevier, Amsterdam. Citovaný postup je dvojnásobná extrakce, která se provádí takto: K vzorku moči o objemu 4 ml se přidá 0,8 ml acetátového pufru a 0,04 ml extraktu Helix pomatia, poté se dvakrát extrahuje s 20 ml dietyleteru. Přitom se používají tři dělicí nálevky o objemu větší než 25 ml.

198 489

Po promytí sodným louhem a vodou se extrakt odpaří v rotační vakuové odparce. Potom se suchý extrakt derivatizuje a dále se zpracuje pro chromatografickou analýzu.

Postupem podle vynálezu se uvedené nedostatky známých postupů odstraňují. Podstatou vynálezu je jednonásobná extrakce, která se provádí, včetně čistění a promývání, jen v jediné zkumavce s uzávěrem, která má objem 1 až 3 ml. Díky tomu, že se používá jen jediné zkumavky, sníží se znečištění a ztráty výtěžku, čímž se zvýší účinnost extrakce. Postupuje se takto: Vzorek moče o objemu 0,5 až 2 ml se vloží do zkumavky o objemu 1 až 3 ml. Jako rozpouštědlo se přidá 0,35 až 1,4 ml dichlormetanu. Pak se tato extrakční směs vytřepe na rotačně-vibrační třepačce. Vodní vrstva se od dichlormetanové oddělí odstředěním. Vodní vrstva je lehčí než dichlormetanová a proto vystoupí nahoru, odkud se shora odsaje. Poté se dichlormetanová vrstva promývá louhem sodným a pak vodou, přičemž se po vytřepání a odstředění vodní vrstva odsaje opět shora. Zbytky vodní vrstvy se odstraní přidáním síranu sodného, vytřepáním a odstředěním. Teprve potom se extrakt přenesse do jiné zkumavky k odpaření a k následné analýze.

Vynálezem se dosahuje těchto účinků: extrakci lze provést na vzorcích moče o objemu 0,5 až 2 ml, zvýší se čistota výtěžku, usnadní se manipulace, zkrátí se čas na provedení a sníží se spotřeba chemických činidel a nádobí.

P ř í k l a d

K mikroextrakci se přistupuje až po předchozí enzymatické hydrolýze. Enzymatická hydrolýza a celá extrakce se provádí v jediné uzavíratelné zkumavce s kónickým zúžením o objemu 1,5 ml. Vychází se z 1 ml moče okyselené na pH 4,6 pomocí 1 mol/l HCl, ke kterému se přidá 50 ul 2 mol/l acetátového pufru s pH 4,6, dále 5 ul β glukuronidázy (arylsulfatázy z *Helix pomatia* 5,2 U) 2,6 U na 1 ml, dále 5 ul chloroformu p. a. a dále 2 ug androstandionu jako vnitřní standard. Zkumavka se uzavře, promíchá, pak se otevře a nechá se inkubovat 48 hodin při 37 °C. Inkubací se daný objem samovolně zahustí na 0,35 ml.

(Začátek postupu podle vynálezu.) K 0,35 ml zahuštěné moče se přidá 0,7 ml dichlormetanu p. a., poté se zkumavka uzavře a třepe se 5 minut na rotačně-vibrační třepačce, pak se odstřeďuje 1 minutu. Horní vodní vrstva se odsaje shora. Ke zbylé dolní dichlormetanové vrstvě se přidá 0,2 ml 0,1 mol/l NaOH. Pak se opět 2 minuty přepe a 1 minutu odstřeďuje při 12 000 ot/min., načež se horní vodní vrstva opět odsaje shora. Tento čistící proces se opakuje ještě jednou. Pak se přidá 0,4 ml demineralizované vody, 2 minuty se třepe, 1 minutu se odstřeďuje a pak se horní vodní vrstva odsaje shora. Tento promývací proces se provede třikrát - až do vymizení alkalické reakce. Zbytky vodní vrstvy se odstraní přidáním 0,2 g bezvodého síranu sodného p. a., 2 minuty se třepe a 1 minutu odstřeďuje. (Konec postupu podle vynálezu.)

Stanovení frakcí steroidních hormonů se provede pomocí plynové chromatografie. Extrakt se přenesse do zkumavky s kónickým zúžením a kompletně se odpaří. Pak se provede derivatizace hormonů pomocí 10 ul směsi silylačního činidla, tj. 1 díl trimetylohlorosilanu, 3 díly hexametyldisilazanu a 9 dílů dimetylformamidu, po dobu 2 hodin při teplotě 60 °C. Do plynového

chromatografu se aplikuje 2 ul této směsi.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob mikroextrakce pro stanovení frakcí 17-ketosteroidů a derivátů progesteronu z moče, vyznačující se tím, že se do vzorku moče o objemu 0,5 až 2 ml, okyseleného na pH 4,6 a zahuštěného na jednu třetinu svého objemu, přidá 0,35 až 1,4 ml dichlormetanu, odstředěním vzniklé kapalné vrstvy se oddělí, vodní vrstva se odsává shora, zbylá dichlor-
metanová vrstva se promývá louhem sodným a vodou, přičemž se pracuje v jedné zkumavce do objemu 3 ml, s výhodou od 1 do 2 ml, vzniklý extrakt se vyhodnocuje chromatograficky nebo fotometricky.