



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224 881

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 10 81
(21) PV 7701-81

(51) Int. Cl.³ G 01 N 33/62
//C 07 J 1/00
//C 08 F 220/06

(40) Zveřejněno 27 05 83
(45) Vydáno 01 08 85

(75)
Autor vynálezu

SEMĚNKA JIŘÍ ing.
CHROMÝ VRATISLAV ing.CSc., BRNO

(54) Prostředek pro izolaci celkových 17-oxosteroidů z biologického materiálu na bázi sorbentů

1

Předmětem vynálezu je prostředek pro izolaci celkových 17-oxosteroidů z biologického materiálu na bázi sorbentů.

Skupina látek, označovaná hromadně jako 17-oxosteroidy, je tvořena jednak sloučeninami, které jsou součástí skupiny steroidních hormonů produkovaných nadledvinami a gonádami, jednak sloučeninami, které vznikají při jejich metabolismu.

Přebytek těchto hormonů je z organismu vylučován močí buď ve volné formě nebo jako konjugáty s kyselinou glukuronovou. Stanovení těchto látek má značný význam pro diagnostiku chorob nadledvin a je běžnou součástí palety endokrinologických vyšetření.

Obvykle se provádí stanovení celkových 17-oxosteroidů v moči po jejich hydrolýze a separaci tak zvanou Zimmermannovou reakcí, kterou poskytují některé oxosloučeniny s 1,3-dinitrobenzenem. Izolace volných steroidů po hydrolýze moči je nutná zejména ze dvou důvodů. Moč obsahuje jen asi $5 \cdot 10^{-3}$ až $5 \cdot 10^{-2}$ % hmot. těchto látek spolu s velkým množstvím interferujících složek, které je nutné oddělit a volné steroidy zkoncentrovat.

Běžná je izolace volných 17-oxosteroidů extrakcí do organických rozpouštědel, například do benzenu, diethyletheru a do chlorovaných uhlovodíků. Jedná se vždy o pracný postup, vyžadující práci s hořlavinami nebo jedy v poměrně značných objemech. Jednodušší

je izolace těchto látek pomocí sorbentů na bázi polystyrenových gelů, která byla kupříkladu popsána Bradlowem (Bradlow, H.L.: Steroids 11, 256, 1968). Nevýhodou izolace na těchto sorbentech jsou zejména velké změny ve zbotnění vlivem rozdílných dielektrických konstant vodného roztoku vzorku a používaných eluentů, projevující se obvykle trháním sloupce polystyrenového gelu v izolačních kolonách. Další nevýhody spočívají v tom, že polystyrenové gely vykazují poměrně vysokou zádrž vody, což opět ztěžuje eluci volných 17-oxosteroidů. Polystyrenové gely se kromě toho obtížně regenerují a výsledky analýz celkových 17-oxosteroidů po izolaci na regenerovaných sorbentech tohoto typu vykazují značné rozdíly, a to až o $\pm 10\%$. Polystyrenové gely vhodné kvality nejsou kromě toho v tuzemsku dostupné.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje prostředek pro izolaci celkových 17-oxosteroidů z biologického materiálu na bázi sorbentů typu polymerů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že je tvořen makroporesním kopolymerem s 90 až 10 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 10 až 90 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $1,7 \cdot 10^{-23}$ až $1,6 \cdot 10^{-19}$ kg a velikosti částí 20 až 600 μm , s výhodou 61 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 39 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $5 \cdot 10^{-22}$ kg a velikosti částic 100 až 200 μm .

Prostředek pro izolaci celkových 17-oxosteroidů z biologického materiálu podle vynálezu má proti dosavadním prostředkům používaným k těmto účelům řadu předností.

Vylučuje nebezpečnou a zdlouhavou extrakci do organických rozpouštědel založenou na použití hořlavín nebo jedů a podstatně zkracuje dobu potřebnou na jednu analýzu, a to asi o dvě hodiny. Na rozdíl od dosud známých polystyrenových sorbentů lze prostředek podle vynálezu snadno regenerovat a opakovaně použít, aniž by bylo pozorováno zhoršení přesnosti nebo správnosti analýz. Regenerace je snadná a provádí se promytím methanolem a vodou. Materiál lze takto použít až dvacetkrát. Prostředek podle vynálezu vykazuje ve srovnání s polystyrenovými sorbenty podstatně vyšší přesnosti při analýze, neboť nedochází k trhání sloupce a zádrž vody je také minimální. Při srovnání analýz pomocí prostředku podle vynálezu se třemi postupy využívajícími extrakci do diethyletheru a dichlormethanu byly nalezeny prakticky totožné výsledky při stanovení celkových 17-oxosteroidů v moči s koeficienty korelace v rozmezí 0,98 až 0,99. Přesnost stanovení při opakované regeneraci a použití prostředku podle vynálezu se přitom pohybovala v oboru $\pm 4\%$ a pravděpodobnost 95 %.

Prostředek pro izolaci celkových 17-oxosteroidů podle vynálezu je na rozdíl od polystyrenových sorbentů dostupný v tuzemsku ve vhodné kvalitě a čistotě a jeho snadná regenerace se projevuje slevněním stanovení. Také jeho použití k izolaci a analýze celkových 17-oxosteroidů je jednoduché. Moč po kyselé hydrolýze se prolije kolonkou obsahující prostředek podle vynálezu v množství 10 ml hydrolyzátu na 1 g prostředku, kolonka se promyje roztokem hydroxidu alkalického kovu a potom vodou do neutrální reakce eluátu

a 17-oxosteroidy se z kolonky vymyjí 10 ml metanolu, přičemž se jímá posledních 6 ml eluátu. Dále se stanovení provádí například fotometricky po reakci s 1,3-dinitrobenzenem.

Příklad 1

Prostředek k izolaci celkových 17-oxosteroidů je tvořen kopolymerem o 71 % hmot. ethylendimethakrylátu a 29 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu s vylučovací mezi molekulové hmotnosti $1,7 \cdot 10^{-20}$ až $1,6 \cdot 10^{-19}$ kg a velikostí částic 25 až 40 μm .

Příklad 2

Jako prostředek k izolaci celkových 17-oxosteroidů se použije makroporézní kopolymer s 39 % hmot. ethylendimethakrylátu a 61 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $6,6 \cdot 10^{-23}$ kg a velikostí částic 200 až 600 μm .

Příklad 3

K izolaci celkových 17-oxosteroidů se použije kopolymer s 61 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 39 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $5 \cdot 10^{-22}$ kg a velikostí částí 100 až 200 μm .

Příklad 4

Prostředkem pro izolaci celkových 17-oxosteroidů je kopolymer 14 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 86 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $4 \cdot 10^{-19}$ kg a velikostí částic 100 až 300 μm .

Příklad 5

Jako prostředek k izolaci celkových 17-oxosteroidů se použije makroporesní kopolymer s 83 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 17 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $3,3 \cdot 10^{-23}$ kg a velikostí částic 150 až 400 μm .

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Prostředek pro izolaci celkových 17-oxosteroidů z biologického materiálu na bázi sorbentů typu polymerů, vyznačený tím, že je tvořen makroporézním kopolymerem s 90 až 10 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 10 až 90 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $1,7 \cdot 10^{-23}$ až $1,6 \cdot 10^{-19}$ kg a velikosti částic 20 až 600 μm , s výhodou 61 % hmot. hydroxyethylmethakrylátu a 39 % hmot. ethylendimethakrylátu o vylučovací mezi molekulové hmotnosti $5 \cdot 10^{-22}$ kg a velikosti částic 100 až 200 μm .