



УДК 577.175.62.088.5

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ РАДИОМЕТРИЯ [^3H]АНДРОГЕНОВ
НА ПЛАСТИНКАХ С АЛЮМИНИЕВОЙ ПОДЛОЖКОЙ*Дегтярь В. Г., Милосердов Ю. В., Кушлинский Н. Е.**Четвертое Главное управление
при Министерстве здравоохранения СССР, Москва*

Предложен метод радиометрического определения [^3H]андрогенов в присутствии пластинок с силикагелем на алюминиевой подложке без предварительной экстракции радиоактивных стероидов с сорбента. Показано, что присутствие в сцинтиляционном флаконе пластинки с сорбентом как с флуорофором, так и без него не оказывает влияния на результаты определения. Цветовое гашение может влиять на количественное определение [^3H]нуклида данным методом. Метод позволяет исключить потери радиоактивных веществ при количественном определении.

В настоящее время во многих областях органической и биоорганической химии, биохимии используются радиоактивные соединения. Широкое распространение получили меченные тритием соединения с высокой удельной радиоактивностью. Часто, особенно при изучении метаболизма природных соединений с использованием радионуклидов, необходимым этапом перед их количественным определением является разделение радиоактивных метаболитов хроматографией в тонких слоях сорбентов с различными подложками (пластик, алюминиевая фольга и др.). Радиометрию меченных тритием соединений сцинтиляционным методом после ТСХ проводят обычно, применяя предварительную экстракцию их с сорбента, так как предполагается, что неомогенность среды при радиометрии сцинтиляционным методом вызывает физические эффекты гашения [1, 2]. Экстракция с сорбента органических соединений — трудоемкая операция, связанная со значительными потерями радиоактивных соединений, что в свою очередь приводит к большому погрешностям определения. Указанные трудности тем более значительны при анализе близких по структуре и хроматографическому поведению соединений. Применение сканеров для детектирования трития непосредственно на пластинках из-за низкой эффективности затруднительно, особенно для небольших количеств радиоактивных соединений [1].

В данной работе описывается метод количественного радиометрического определения меченных тритием андрогенов сцинтиляционным методом в присутствии слоев силикагеля на алюминиевой подложке без предварительной экстракции меченых соединений со слоя сорбента после ТСХ, что значительно упрощает их определение.

Прежде всего возникает вопрос: влияет ли присутствие силикагеля и подложки из алюминиевой фольги на эффективность определения трития сцинтиляционным методом, т. е. сколь значительными могут быть эффекты гашения при использовании счетчиков с наиболее распространенными камерами с 2 π -геометрией? С использованием [^3H]гексадекана показано, что как без пластинок, так и в присутствии пластинок площадью от 0,5 до 3,0 см 2 эффективность счета в пределах ошибки определения остается постоянной — 25 \pm 2%. Следовательно, присутствие алюминиевой фольги со слоем силикагеля не вызывает определяемых эффектов физического гашения при данном методе радиометрии трития. В дальнейшем, исходя из практических соображений, во всех опытах использовали пластинки одинаковой площади (2,0 \pm 0,1 см 2).

Для обнаружения андрогенов на пластинках после ТСХ часто используется смесь (далее по тексту «проявляющая смесь») [3], компоненты ко-

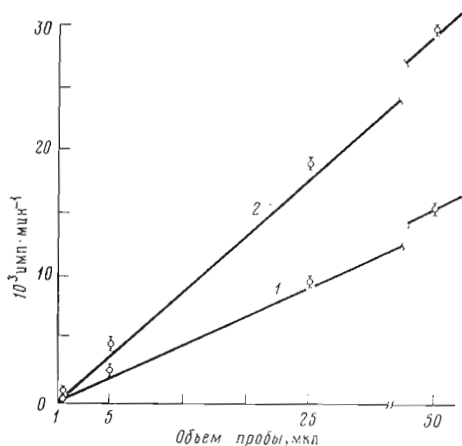


Рис. 1

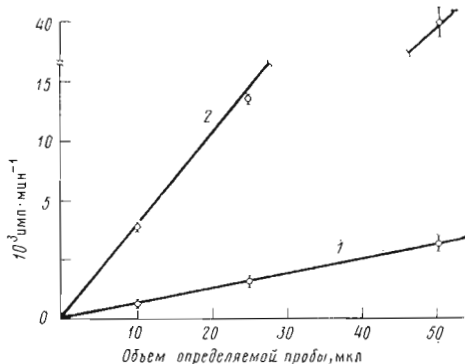


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость радиометрии трития от количества $[^3\text{H}]$ тестостерона в присутствии пластинок Silufol G без обработки (1) и обработки (2) «проявляющей смесью» [3]. В каждой точке показаны данные в виде среднего арифметического \pm среднее квадратичное отклонение из четырех определений (см. «Экспер. часть»)

Рис. 2. Зависимость радиометрии трития от количества $[^3\text{H}]$ тестостерона (1) и $[^3\text{H}]$ дигидротестостерона (2) после ТСХ на пластинке Silufol G и обработки «проявляющей смесью». В каждой точке представлены данные в виде среднего арифметического \pm среднее квадратичное отклонение из пяти определений (см. «Экспер. часть»)

торой (анисовый альдегид, ледяная уксусная кислота, серная кислота) могут вызывать химическое гашение [4]. На рис. 1 показаны данные по радиометрическому определению $[^3\text{H}]$ тестостерона в присутствии пластинок, обработанных и не обработанных «проявляющей смесью». Видно, что, хотя гашение в случае предварительной обработки пластинок имеет место, линейная зависимость определения сохраняется, как и для необработанных пластинок. Также наблюдается линейность определения $[^3\text{H}]$ тестостерона и $[^3\text{H}]$ дигидротестостерона после хроматографического разделения их смеси (рис. 2).

Химизм образования производных стероидов после обработки хроматограмм «проявляющей смесью», содержащей указанные выше компоненты, неясен. Образующиеся смеси окрашенных производных могут различаться по растворимости. Этот фактор следовало исключить, так как в конечном итоге проводится радиометрия растворов полученных хромогенов в сцинтилляционной смеси [1]. Из рис. 3 видно, что после инкубации пластинок с $[^3\text{H}]$ тестостероном в сцинтилляционной смеси при 8–10° С скорость счета достигает максимума через 6 ч и в дальнейшем практически не изменяется (рис. 3); при комнатной температуре это время сокращается до 4 ч.

Присутствие многих соединений в сцинтилляционной смеси при радиометрии β -излучателей может вызвать эффекты цветового гашения [2], поэтому было необходимо выяснить влияние образующихся окрашенных производных на количественное определение $[^3\text{H}]$ андрогенов. Образующиеся производные различаются по цвету [3, 5], поэтому могут возникать разные эффекты цветового гашения при радиометрии. В табл. 1 представлены данные по определению эффективности счета с помощью $[^3\text{H}]$ гексадекана в присутствии различных андрогенов и других типов пластинок. Присутствие окрашенных производных большинства андрогенов не сказывается на эффективности счета (табл. 1). Однако образование окрашенных соединений из андрогенов, имеющих 4,5-двойную связь, может оказывать влияние на радиометрию $[^3\text{H}]$ гексадекана — стандарта, который, по-видимому, сам не претерпевает изменений при обработке «проявляющей смесью», так как другие андрогены в данном случае влияния не оказывают (табл. 1).

В связи с вышесказанным возникает вопрос: может ли оказывать влия-

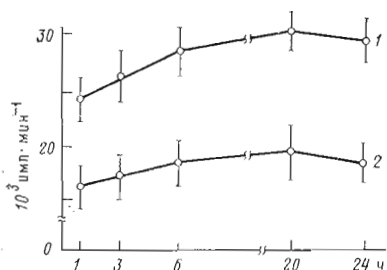


Рис. 3. Зависимость радиометрии [^3H]тестостерона от времени экстракции его со слоя сорбента пластинок Silufol G сцинтилляционной смесью без обработки (1) и с обработкой (2) «проявляющей смесью». В каждой точке представлены данные в виде среднеарифметического \pm среднеквадратичное отклонение из пяти определений (см. «Экспер. часть»)

ние на радиометрию трития образование окрашенных соединений, в молекулах которых содержится этот радионуклид? С этой целью определяли количество [^3H]тестостерона и [^3H]дигидротестостерона в присутствии различных андрогенов после окрашивания (табл. 2). Видно, что, как и в случае с [^3H]гексадеканом, существенное влияние при радиометрии оказывают андрогены с двойной связью в молекуле, причем это влияние (в данном случае гашение) особенно значительно, когда и радиоактивный и «холодный» андрогены имеют эту связь, т. е. в случае пары [^3H]тестостерон — тестостерон (табл. 2).

Таким образом, количественную радиометрию меченных тритием андрогенов сцинтилляционным методом можно проводить, вырезая соответствующие зоны вместе с сорбентом и подложкой после ТХС и обнаружения веществ и помещая их в сцинтилляционный флакон. Это позволяет не только значительно сократить время анализа (исключена операция экстракции), но и практически исключить потери радиоактивных соединений при подготовке проб для радиометрии. Однако, исходя из результатов данной работы, необходимо при этом вести тщательный контроль, чтобы учитывать возможность возникновения эффектов цветового и физического гашения (главным образом цветового). Цветового гашения можно избежать, если использовать для обнаружения веществ пары иода [6], однако при этом нужно более четкое разделение соединений после ТХС, чем в данном случае, когда некоторые андрогены имеют близкие значения R_f , но после окрашивания их пятна легко разделить при разрезании пластинок.

Можно полагать, что предлагаемый метод количественной радиометрии трития пригоден для определения не только андрогенов, но и других природных соединений.

Экспериментальная часть

Определение радиоактивности проводили на спектрометре модели 8100 (ЛКВ, Швеция) в 7 мл сцинтилляционной смеси состава: РРО (2,5-дифенилоксазол) — 4,0 г, РОРОР (2,2'-*n*-фенилен-бис-5-фенилоксазол) — 0,4 г, нафталин — 60,0 г, диоксан — 900 мл, метанол — 100 мл.

Радиоактивные соединения [^3H]гексадекан, [1,2,6,7- ^3H]тестостерон и 5 α -[1,2,4,6,7- ^3H]дигидротестостерон получены от фирмы Amersham (Англия). В работе использовали стероиды: андрост-4-ен-3,17-дион (BDH, Англия), тестостерон, 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол и 5 α -андростан-3,17-дион (Koch-Light Laboratories, Англия), 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (Sigma, США). Все остальные реактивы — производства СССР марки х. ч. Растворители перед использованием перегоняли с дефлегматором.

Общая методика радиометрии. Пластинки Silufol G или Silufol GF₂₅₅ (Kavalier, СССР) размечали карандашом на зоны площадью $2,0 \pm 0,1 \text{ см}^2$ (в специальных опытах использовали зоны разной площади), микрошприцем наносили на зоны радиоактивное соединение в смеси бензол — этанол (9:1) в объеме 10–50 мкл (количество радиоактивности указано в каждом конкретном опыте) полосой около $1,2 \times 0,2 \text{ см}$, при необходимости на эту же полосу наносили андроген в количестве около 10 мкг (раствор в метаноле), обрабатывали в течение 5 с «проявляющей смесью» [3] из пульверизатора (Sigma, США), нагревали 5 мин при 105–110° С в сушильном шкафу. Зоны вырезали, помещали в сцинтилляционные флаконы, инкубировали при 8–10° С в течение 6 ч и радиометрировали. В отдель-

Эффективность счета (%) * при определении с помощью [³H]гексадекана-стандарта в присутствии хромогенов различных андрогенов и пластинок Silufol

Андроген	Тип пластинки	
	Silufol G	Silufol GF ₂₅₄
Контроль	18,0±1,9	18,0±2,0
Тестостерон	21,6±0,4 **	20,0±1,9
Дигидротестостерон	17,7±0,2	18,4±1,3
Андрост-4-ен-3,17-дион	19,8±1,9	21,3±0,2 **
5α-Андростан-3β,17β-диол	20,1±1,9	20,8±2,1
5α-Андростан-3α,17β-диол	20,3±1,9	20,1±2,0
5α-Андростан-3,17-дион	18,9±1,9	20,8±2,1

* Среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение из пяти определений.

** Вероятность различий между величинами по сравнению с контролем: P < 0,05.

Таблица 2

Влияние андрогенов на радиометрию [³H]тестостерона и [³H]дигидротестостерона в присутствии пластинок Silufol *

Андроген	[³ H]Тестостерон		[³ H]Дигидротестостерон	
	Silufol G	Silufol GF ₂₅₄	Silufol G	Silufol GF ₂₅₄
Контроль	77828±785	75512±3052	18389±383	18392±433
Тестостерон	71514±794 **	74991±1415	21555±403 **	20022±1816
Дигидротестостерон	75981±3247	77229±619	17739±292	18389±1369
Андрост-4-ен-3,17-дион	76717±1445	77963±679	19815±1979	21297±306 **
5α-Андростан-3β,17β-диол	77840±1633	76046±2352	19375±1642	20842±1762
5α-Андростан-3α,17β-диол	76043±969	76207±2899	20271±1976	20143±2189
5α-Андростан-3,17-дион	Не определялось		18969±1854	21522±2029

* В таблице представлены данные в имп·мин⁻¹ в виде среднего арифметического ± среднеквадратичное отклонение из пяти определений.

** Вероятность различий по сравнению с контролем: P < 0,01.

ных опытах пластинки сразу после нанесения радиоактивного соединения разрезали на зоны, помещали во флаконы, инкубировали 6 ч и радиометрировали, как описано выше.

Определение эффективности счета при радиометрии [³H]гексадекана-стандарта в присутствии пластинок разной площади. В сцинтилляционные флаконы вносили около 0,1 г [³H]гексадекана удельной радиоактивности 5·10⁶ распадов·мин⁻¹·г⁻¹, взвешивали до четвертого знака, приливали сцинтиллятор, в половину флаконов помещали чистые пластинки Silufol G разной площади от 0,5 до 3,0 см² (4–5 флаконов на каждую пластинку) и все флаконы радиометрировали. Вычисляли эффективность определения трития, исходя из исходного количества [³H]гексадекана и его удельной радиоактивности. Была получена эффективность определения трития: 25,1±0,8% (без пластинок) и 25,0±2,0% (в присутствии пластинок).

Определение зависимости радиометрии трития от количества [³H]тестостерона, взятого на определение (рис. 1). На пластинки Silufol G площадью 2,0±0,1 см² наносили разное количество раствора [³H]тестостерона удельной радиоактивности 3,7 МБк·мкмоль⁻¹ и концентрацией ~10³ имп·мин⁻¹·мкл⁻¹. Половину пластинок обрабатывали «проявляющей смесью», все пластинки помещали во флаконы со сцинтилляционной смесью (четыре флакона на каждую точку опыта) и радиометрировали (см. выше). По результатам рассчитывали уравнения линейной регрессии (для построения линии регрессии) и коэффициенты корреляции. Для пластинок

без обработки было получено уравнение линейной регрессии $Y = 2009 + 577X$ и коэффициент корреляции $r = 0,986$, а для пластинок после обработки — уравнение линейной регрессии $Y = 1051 + 299X$ и коэффициент корреляции $r = 0,994$.

Влияние андрогенов на эффективность определения трития (табл. 1). На пластинки Silufol G площадью $2,0 \pm 0,1$ см² одинаковое количество ($\sim 25 \cdot 10^3$ распадов мин⁻¹) раствора [³H]гексадекана и по 10 мкг различных андрогенов (по одному андрогену на каждую пластинку). Пластинки обрабатывали «проявляющей смесью» и радиометрировали (см. выше). Контролем служили пластинки только с [³H]гексадеканом, обработанные аналогично. По результатам рассчитывали эффективность определения трития.

Влияние андрогенов на радиометрию [³H]тестостерона и [³H]дигидротестостерона (табл. 2). На пластинки Silufol G или Silufol GF₂₅, площадью $2,0 \pm 0,1$ см² наносили одинаковое количество [³H]тестостерона ($\sim 100 \cdot 10^3$ имп·мин⁻¹, удельную радиоактивность см. выше) или [³H]дигидротестостерона ($\sim 35 \cdot 10^3$ имп·мин⁻¹, удельная радиоактивность $4,7$ МБк·мкмоль⁻¹) и по 10 мкг различных андрогенов (по одному андрогену на каждую пластинку), пластинки обрабатывали «проявляющей смесью» и радиометрировали (см. выше). Контролем служили пластинки только с [³H]тестостероном или [³H]дигидротестостероном, обработанные аналогично.

Радиометрия после ТСХ. На пластинку Silufol микрошприцем наносили смесь стероидов (~ 10 мкг каждого немеченого андрогена) в метаноле в виде полосы около $1,2 \times 0,2$ см и на эти же полосы наносили смесь радиоактивных андрогенов. Пластинки хроматографировали в системе бензол — ацетон — абс. этанол (9:1:0,5) трижды, обрабатывали «проявляющей смесью», вырезали зоны с пятнами стероидов площадью $2,0 \pm 0,1$ см² и радиометрировали (см. выше).

Определение зависимости радиометрии трития от количества [³H]тестостерона и [³H]дигидротестостерона, взятых на определение после ТСХ (рис. 2). На пластинку Silufol G наносили разное количество [³H]тестостерона ($\sim 0,5 \cdot 10^3$ имп·мин⁻¹·мкл⁻¹, удельную радиоактивность см. выше) и [³H]дигидротестостерона ($\sim 1,5 \cdot 10^3$ имп·мин⁻¹·мкл⁻¹, удельную радиоактивность см. выше) вместе с одинаковым количеством немеченых тестостерона и дигидротестостерона (~ 10 мкг каждого), пластинку хроматографировали как описано выше, обрабатывали «проявляющей смесью», зоны вырезали и радиометрировали (см. выше). По результатам рассчитывали уравнения линейной регрессии (для построения линии регрессии) и коэффициенты корреляции. Для определения трития в случае [³H]тестостерона было получено уравнение линейной регрессии $Y = 202 + 116X$ и коэффициент корреляции $r = 0,987$, а в случае [³H]дигидротестостерона — уравнение линейной регрессии $Y = -1116 + 833X$ и коэффициент корреляции $r = 0,995$.

Зависимости радиометрии [³H]тестостерона от времени экстракции со слоя сорбента сцинтилляционной смесью (рис. 3). На пластинки Silufol G площадью $2,0 \pm 0,1$ см² наносили одинаковое количество [³H]тестостерона ($\sim 30 \cdot 10^3$ имп·мин⁻¹, удельную радиоактивность см. выше), половину пластинок обрабатывали «проявляющей смесью», все пластинки помещали в сцинтилляционные флаконы и радиометрировали через разные интервалы времени после инкубации при $8-10^\circ\text{C}$ (в отдельном опыте — при 20°C).

Статистическую обработку результатов проводили, используя t (критерий Стьюдента по [7]), а уравнения линейной регрессии и коэффициенты корреляции рассчитывали по работе [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Робертс Т. Радиохроматография. М.: Мир, 1981, с. 23–24, 78.
2. Fox B. W. In: Liquid scintillation counting / Eds Crook M. A., Johnson P., Scales B. London: Heyden and Son LTD, 1972, v. 2, p. 189–204.
3. Хроматография в тонких слоях / Ред. Шталь Е. М.: Мир, 1965, с. 249–279, 477.
4. Currie L. A. In: Liquid scintillation counting / Eds Crook M. A., Johnson P. London: Heyden and Son LTD, 1977, v. 4, p. 219–242.

5. Курхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981, т. 2, с. 316–317.
6. Duncombe W. G., Johnson P. In: Radiochemical methods in analysis/Ed Coomber D. J. New York – London – Philadelphia: Plenum Press, 1975, p. 219–268.
7. Закс С. Статистическое оценивание. М.: Экономика, 1975, с. 204, 249–250.
8. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М.: Иностранная литература, 1962, с. 129–130.

Поступила в редакцию

13.I.1983

После доработки

25.V.1983

QUANTITATIVE RADIOMETRY OF [³H]ANDROGENS ON SILICA GEL ALUMINIUM-FOIL PLATES

DEGTYAR V. G., MILOSERDOV Yu. V., KUSHLINSKY N. E.

Central Research Laboratory of Ministry of Health of the USSR, Moscow

A method for radiometry of [³H]androgens on silica gel aluminium-foil plates, without preliminary extraction of labeled steroids from the sorbent, was proposed. The presence of the plate with sorbent, with or without fluorophore, had no effect on quantitative radiometry. However, possible colour quenching effects should be taken into account. The method proposed allows to avoid losses of radioactive compounds at their quantitation.