

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GABRIELLA PENSO, LAURO GALZIGNA

**Cromatografia su strato sottile per il dosaggio  
quantitativo di steroidi. Analisi degli steroidi  
gonadici di Anguilla anguilla**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 35 (1963), n.5, p. 365–369.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1963\\_8\\_35\\_5\\_365\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_35_5_365_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



**Biologia generale.** — *Cromatografia su strato sottile per il dosaggio quantitativo di steroidi. Analisi degli steroidi gonadici di Anguilla anguilla* <sup>(\*)</sup>. Nota di GABRIELLA PENSO e LAURO GALZIGNA, presentata <sup>(\*\*)</sup> dal Socio U. D'ANCONA.

PREMESSA.

In una prima Nota <sup>(1)</sup> sono stati esposti alcuni dati, relativi all'estrazione e all'identificazione cromatografica degli ormoni ovarici e testicolari di Teleostei.

Il metodo impiegato, cromatografia su carta, presentava però dei limiti, specialmente dal punto di vista del dosaggio quantitativo, a causa del suo basso potere risolutivo e per le quantità molto piccole di steroidi presenti nella gonade. D'altra parte anche altri metodi, colorimetrici o di cromatografia su colonna <sup>(2)</sup>, non potevano essere applicati per il rilevamento di piccole quantità.

Recentemente, la cromatografia su strato sottile, secondo Stahl <sup>(3)</sup>, è stata applicata con successo all'analisi degli steroidi <sup>(4,5)</sup>. Con questo metodo, si è arrivati a distinguere anche steroidi a formula chimica analoga, poco differenziabili con altri metodi <sup>(6)</sup>. Questi risultati ci hanno spinti ad applicarlo all'analisi di estratti d'organo ottenuti con tecniche diverse, messe a punto di volta in volta.

Lo scopo della presente Nota è esporre due procedimenti di estrazione degli steroidi da gonadi adulte di *Anguilla anguilla* e un metodo di dosaggio quantitativo mediante cromatografia su strato sottile. Questo studio intende esaurire i preliminari metodologici di una ricerca più ampia che comprenderà l'analisi degli steroidi prodotti dall'anguilla in tutto il corso del suo sviluppo.

(\*) Ricerche eseguite nell'istituto di Zoologia e Anatomia comparata dell'Università di Padova, con contributi del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta del 9 novembre 1963.

(1) L. GALZIGNA, *Analisi cromatografica degli steroidi estratti da gonadi adulte di Salmo irideus e Cyprianus carpio*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 31, 92 (1961).

(2) L. CEDARD, M. FONTAINE, T. NOMURA, *Sur la teneur en oestrogenes du sang du Saumon adulte en eau douce*, « C. R. Acad. Sc. », 18, (252), 2656 (1961).

(3) E. STAHL, *Dünnschicht Chromatographie* - Spinger Verlag, Berlin 1962.

(4) J. MATTHEWS, A. L. PEREDA, A. AGUILERA, *The quantitative analysis of steroids by thin-layer chromatography*, « Journ. of Chrom. », 9, 331 (1962).

(5) L. L. SMITH, T. FOELL, *Thin-layer chromatography of steroids on starchbound silica gel chromatoplates*, « Journ. of Chrom. », 9, 339 (1962).

(6) T. GOLAB, D. S. LAYNE, *The separation of 19-nor-steroids by thin-layer chromatography on silica gel*, « Journ. of Chrom. », 9, 323 (1962).

## MATERIALI E METODI.

Gli animali impiegati per gli esperimenti erano anguille argentine di lunghezza variabile da 49,5 a 63 cm, con gonadi di peso oscillante tra i 0,59 e i 2,86 g.

L'estrazione degli steroidi dai testicoli e dagli ovari è stata attuata con due diverse modalità:

- a) su gonadi di un solo individuo;
- b) su un *pool* di organi appartenenti a sei individui.

Con il primo sistema, si omogeneizzavano in Waring-blendor 500 mg di organo in 5 ml di NaOH 2 N. L'omogenato veniva estratto, in imbuto separatore, con cloroformio e la fase organica veniva concentrata, mentre la fase acquosa, portata a neutralità con HCl, veniva riestratta con cloroformio.

Con il secondo sistema, disponendo di maggiori quantità di materiale, si è cercato di effettuare un'estrazione differenziale, modificando il metodo di Pincus (7).

Gli omogenati, saponificati con KOH (20 ml/g) a 45° per 45 min. e raffreddati a 0°, venivano diluiti con acqua dist. Il loro estratto etereo, lavato con NaOH 2 N, acqua dist. e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 %, veniva concentrato. In questo modo gli steroidi neutri restavano nella fase organica, mentre estriolo, estrone ed estradiolo passavano nella fase acquosa. Per separare i tre steroidi, la fase acquosa, portata a pH 6, veniva estratta con etere. L'estratto, lavato con NaHCO<sub>3</sub>, era portato a secco e quindi ridisciolto con benzene. Trattando la soluzione con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 9 % e acqua dist. si rimuoveva l'estriolo insieme con gli altri fenoli. La fase acquosa, portata a pH 6, si estraeva con etere. Si lavava l'etere con NaHCO<sub>3</sub> 9 % e si portava a secco, si riprendeva con benzene, e, dopo aggiunta di etere di petrolio, si estraevano i fenoli con acqua.

Per ottenere infine estrone ed estradiolo, che erano rimasti nella fase benzenica dopo il trattamento con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, si lavava quest'ultima con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 % e acqua e si estraeva con NaOH 1 N. Dopo aver portato a pH 6 si estraeva un'ultima volta con benzene e si lavava con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 %, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 9 % e acqua dist.

I vari estratti venivano quindi cromatografati su piastre (18 × 12), preparate con Kieselgel G (Merck) (20 mg/cm<sup>2</sup> di superficie + 2,5 ml di H<sub>2</sub>O/g) e attivate per 1 ora a 110°C.

I solventi impiegati per le corse erano quelli proposti da Stahl (3): cloroformio, cloroformio-acetone, (80 : 10), cloroformio-acetone (80 : 20). Dopo un'ora di corsa, le piastre, asciugate, venivano colorate con vari reattivi

(7) G. PINCUS, K. V. THIMANN, *The hormones*, Academic Press. N.Y. (1948).

come:  $\text{SbCl}_3$  in cloroformio,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -ac. acetico-alcol etilico, vanillina in etanolo- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , vapori di iodio. Il più usato di questi è stato il primo. Le macchie che venivano individuate mediante l'osservazione della loro fluorescenza alla lampada di Wood, si eluivano con etanolo 80 %- $\text{NaOH}$  0,5 N, per il controllo degli spettri U. V. mediante spettrofotometro Beckman D. B. Gli eluati venivano quindi portati a secco in corrente d'azoto ed i residui ripresi con il reattivo di Zimmermann. La lettura quantitativa si effettuava a 515  $\mu$  con spettrofotometro Uvispek, dopo aver allestito, con prodotti standard, una curva di taratura. La sensibilità di questo metodo arrivava fino a 25  $\mu$ g

## RISULTATI E DISCUSSIONE.

L'analisi degli organi di singoli individui, estratti con il primo sistema, ha messo in evidenza, per il testicolo, la presenza di due sostanze negli estratti alcalini ed altri due negli estratti portati a neutralità. In qualche caso il primo estratto conteneva altre due sostanze. La tabella riassume le caratteristiche cromatografiche degli estratti di testicolo e di quelli d'ovario riscontrato nei singoli individui esaminati.

TABELLA I.

Organo	Estratto	N° macchie	Rf	Colore	Fluorescenza	
OVARIO . . . . .	Alcalino	1	0,09	grigio-bruno	gialla	
		2	0,19	—	verde	
		3	0,85	viola	gialla	
	Neutro	1	0,33	marrone	gialla	
		Alcalino	(1)	0,08	—	gialla
			2	0,27	marrone	gialla
TESTICOLO . . . . .	(3)		0,45	grigio	—	
		4	0,85	viola	gialla	
		Neutro	1	0,04	grigio	—
	2		0,18	marrone	—	

N.B. - Le macchie segnate col numero fra parentesi sono state rilevate solo in qualche individuo.

L'estrazione da *pool* di organi con il secondo sistema non ha fatto rilevare, negli estratti di testicolo, sostanze diverse da quelle estratte con il primo sistema.

Per gli ovari, l'estrazione differenziale non ha messo in evidenza la presenza di steroidi neutri o di estriolo.

L'ultimo estratto benzenico, ottenuto con il secondo sistema di estrazione, cromatografato, mostrava le macchie schematizzate nella figura. Come si vede, si tratta di quattro sostanze. Una di esse, segnata col numero 2, si può identificare con l'estradiolo, quella segnata col numero 3, presenta carat-

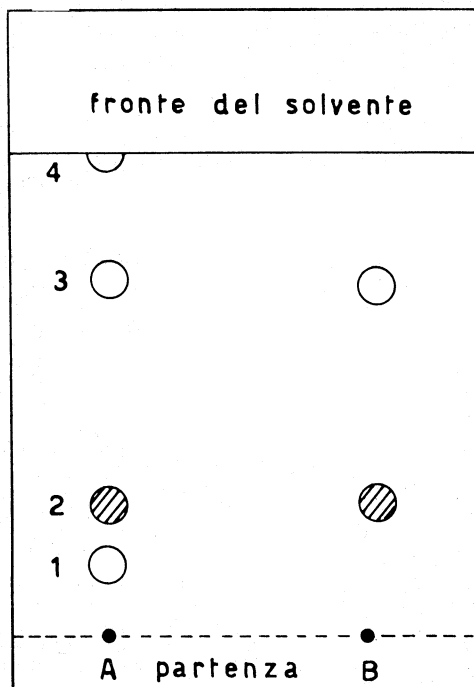


Fig. 1.

A = Estratto; B = Standard (estrone + estradiolo);  
Solvente: acetone-cloroformio (80 : 20); Colorazione:  $\text{SbCl}_5$ .

teristiche di analogia con l'estrone, quella che corre con il fronte è probabilmente colesterolo e l'ultima, segnata col numero 1 non è identificabile.

Confrontando i dati ottenuti con i due procedimenti d'estrazione, riassunti rispettivamente in tabella ed in figura, risulta sia nel testicolo che nell'ovario la presenza di un composto con caratteristiche analoghe ( $\text{RF} = 0,85$ ). Dal confronto con lo standard, sembrerebbe trattarsi di estrone. In analogia a quanto avviene per i vertebrati superiori, potrebbe essere un prodotto di interconversione in vie metaboliche comuni sia al maschio che alla femmina. È noto infatti che attraverso il  $\Delta^4$ androstene-3-17-dione si può passare da testosterone ad estradiolo ed estrone e viceversa <sup>(7)</sup>.

Le impurità presenti negli eluati, dovute essenzialmente alla presenza della silice, hanno reso difficile l'esame degli spettri U. V., per cui non è stato possibile confermare le caratteristiche cromatografiche delle sostanze estratte, con quelle spettrali.

#### CONCLUSIONI.

I dati raccolti nella presente ricerca, permettono di concludere che l'ormone femminile presente negli ovari di *Anguilla anguilla* adulti, è l'estradiolo-17- $\beta$ . Dall'ovario inoltre, si sono potuti estrarre altri tre composti, uno dei quali potrebbe essere estrone ed un altro colesterolo.

Nel testicolo, con i procedimenti impiegati, non è stato possibile mettere in evidenza ormoni maschili di tipo noto, come il testosterone. È stato però riconosciuto un probabile metabolita di quest'ultimo che sembra essere l'estrone. Le altre sostanze estratte e cromatografate non sono state identificate con ormoni conosciuti.