

Étude critique d'une méthode de dosage des 17-Hydroxycorticostéroïdes urinaires

Autor(en): **Lavanchy, E. / Neukomm, S.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **67 (1958-1961)**

Heft 304

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-275115>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Etude critique d'une méthode de dosage des 17-Hydroxycorticostéroïdes urinaires

PAR

E. LAVANCHY et S. NEUKOMM *

Les méthodes que l'on peut trouver dans la littérature pour le dosage clinique des corticoïdes présentent toutes des inconvénients. D'une manière générale, elles manquent de sélectivité, étant basées comme celle de HEARD-SOBEL (1) uniquement sur le pouvoir réducteur des substances isolées, qu'elles soient ou non des corticoïdes.

Pour les besoins de nos laboratoires, il était devenu nécessaire de posséder une méthode plus sélective. C'est pourquoi nous avons commencé par passer en revue les divers procédés analytiques décrits, afin de trouver une méthode qui présente le moins d'inconvénients possible.

L'organisme élimine les stéroïdes principalement par la voie urinaire. Ils se trouvent alors essentiellement sous forme de glucuronocconjugués et de sulfoconjugués, et en très faible quantité sous forme libre.

Cela implique deux possibilités pour l'extraction globale des corticostéroïdes.

1) Extraction des hormones libérées de leurs complexes, soit par hydrolyse acide, soit par hydrolyse enzymatique.

2) Extraction au moyen d'un solvant polaire de l'ensemble des stéroïdes libres et conjugués. La méthode de REDDY (2) utilise cette dernière technique, avec l'alcool butylique comme solvant polaire. Le désavantage de cette méthode est que de trop nombreuses impuretés sont extraites en même temps que les stéroïdes.

L'hydrolyse acide présente l'inconvénient d'être incomplète; de plus, de nombreux corticoïdes subissent une destruction non négligeable (3).

L'intégrité chimique des corticoïdes est conservée par l'hydrolyse enzymatique; la β -glucuronidase permet la scission de l'éther formé entre l'acide glucuronique et le stéroïde. L'hydrolyse enzymatique

* Centre anticancéreux romand (Lausanne).

est complète dans certaines conditions et fournit des valeurs nettement supérieures à celles observées après hydrolyse acide (3).

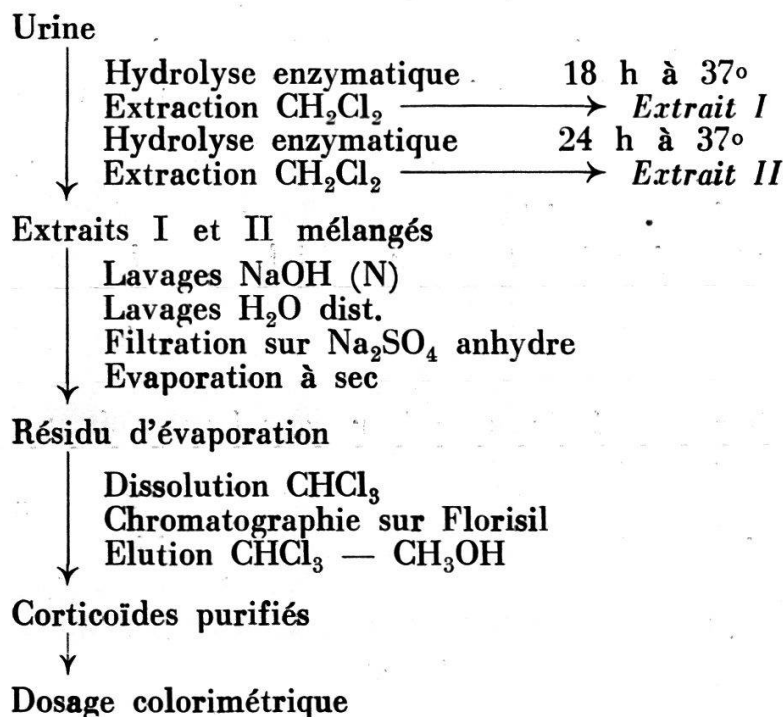
Les sulfoconjugués échappent au dosage dans ces conditions.

Dans la plupart des méthodes, l'extraction est suivie d'une purification qui peut être faite entre autres par lavage avec différents solvants, par chromatographie.

Dans de nombreux cas, l'analyse se termine par un dosage colorimétrique. Ce dosage peut être plus ou moins spécifique, suivant les substances à déterminer.

La réaction de PORTER et SILBER (4) entre la phénylhydrazine en milieu sulfurique et les stéroïdes qui contiennent le groupe 17:21-dihydroxy-20-céto a ceci d'intéressant qu'elle permet le dosage des hormones les plus actives, telles que le cortisol, la cortisone, le « composé S de Reichstein », ainsi que leurs métabolites.

Parmi les diverses méthodes qui utilisent cette réaction colorimétrique comme phase finale, celle proposée par C. HEUSGHEM (communication personnelle) a constitué la base de notre travail. Le schéma qui suit en montre les principales opérations.



Plusieurs modifications ont été apportées après l'étude systématique des différentes étapes proposées. Cette étude fait l'objet de notre publication.

RÉACTION COLORIMÉTRIQUE.

Les 17:21-dihydroxy-20-cétostéroïdes réagissent avec la phénylhydrazine en milieu sulfurique (4) pour donner vraisemblablement des bis-phénylhydrazones, composés jaunes qui présentent un maxi-

num d'absorption à 410 m μ . Le réactif est composé de 130 mg de chlorhydrate de phénylhydrazine dissous dans le mélange constitué de 200 ml H₂SO₄ à 62 % (v/v) et 100 ml d'alcool éthylique purifié. Les déterminations ont été faites au spectrophotomètre Unicam SP 500, avec des cuves de verre ordinaire de 10 mm d'épaisseur de couche (vol. 4 ml).

Pour être complète, la réaction doit se produire dans des conditions de température et de temps déterminées.

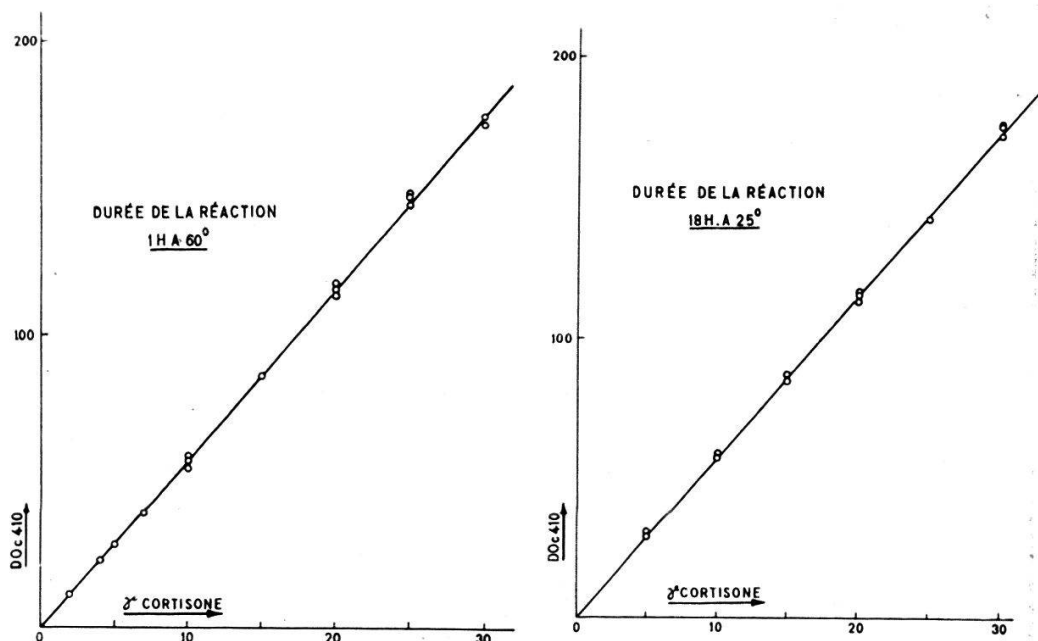


FIG. 1.

La densité optique des échantillons est établie en appliquant la correction d'ALLEN (5). Les densités optiques sont mesurées à 370, 410 et 450 m μ . La valeur corrigée à 410 m μ s'obtient par la formule :

$$DO_c 410 = D_c 410 - \frac{D_c 370 + D_c 450}{2}$$

Cette correction implique que l'absorption de fond est linéaire, ce qui ne correspond pas toujours à la réalité. Les droites d'étalonnage obtenues avec la cortisone pour des temps de chauffage de 18 h à 25° et de 1 h à 60° sont superposables (fig. 1).

Des essais pratiqués avec de la cortisone montrent qu'à 60°, des temps de chauffage de 20 minutes, 30 mn et 40 mn sont insuffisants (fig. 2).

Les droites d'étalonnage ont été établies également pour le cortisol et le « Reichstein S » (1 h à 60°).

De cette série d'essais, on peut conclure que la réaction colorimétrique se développe favorablement à 60° pour un temps de chauff-

fage de 1 heure. Dans ces conditions, les densités optiques corrigées deviennent :

10 γ cortisone	:	$DO_c 410 = 58$
10 γ cortisol	:	$DO_c 410 = 55$
10 γ « Reichstein S »	:	$DO_c 410 = 62$

Afin d'établir quels étaient les divers témoins qui convenaient le mieux pour la colorimétrie, des surcharges de 10 γ de cortisone ont été faites sur 38 extraits urinaires qui avaient subi tout le processus analytique.

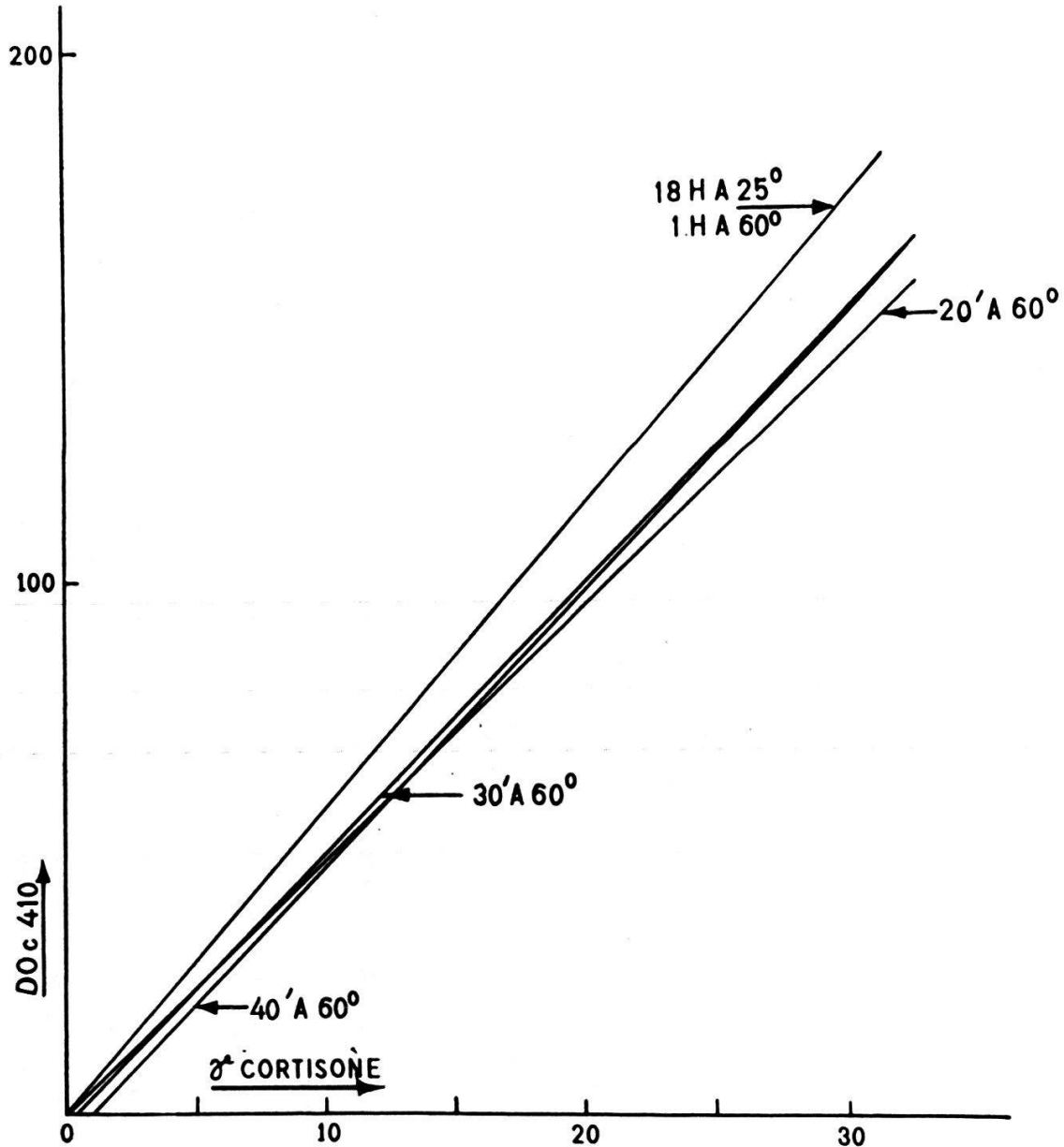


FIG. 2.

Le 63 % des essais montre que l'on retrouve entre 98 et 102 % des quantités ajoutées. Les valeurs extrêmes obtenues ont été de 93 et 110 %.

En conclusion, toutes les lectures de densité optique doivent se faire contre le mélange H_2SO_4 à 62 % — C_2H_5OH , solvant du réactif. Tous les témoins doivent subir le chauffage de 1 heure à 60°. On déterminera donc, à 370, 410 et 450 $m\mu$ les densités optiques de :

- 1) Réactif \longrightarrow DO due à la phénylhydrazine seule
- 2) Solvant du réactif + extrait urinaire \longrightarrow DO de la réaction colorée entre les impuretés de l'extrait et le solvant du réactif
- 3) Réactif + extrait urinaire \longrightarrow DO de l'excès de phénylhydrazine + DO des impuretés + DO de la réaction colorimétrique

Pour chaque longueur d'onde considérée, on soustrait de 3) la somme 1) + 2). Enfin, sur les chiffres obtenus, on pratique la correction d'ALLEN (5).

La figure 3 montre qu'après ces divers calculs, on obtient bien la courbe d'absorption du corticoïde dosé.

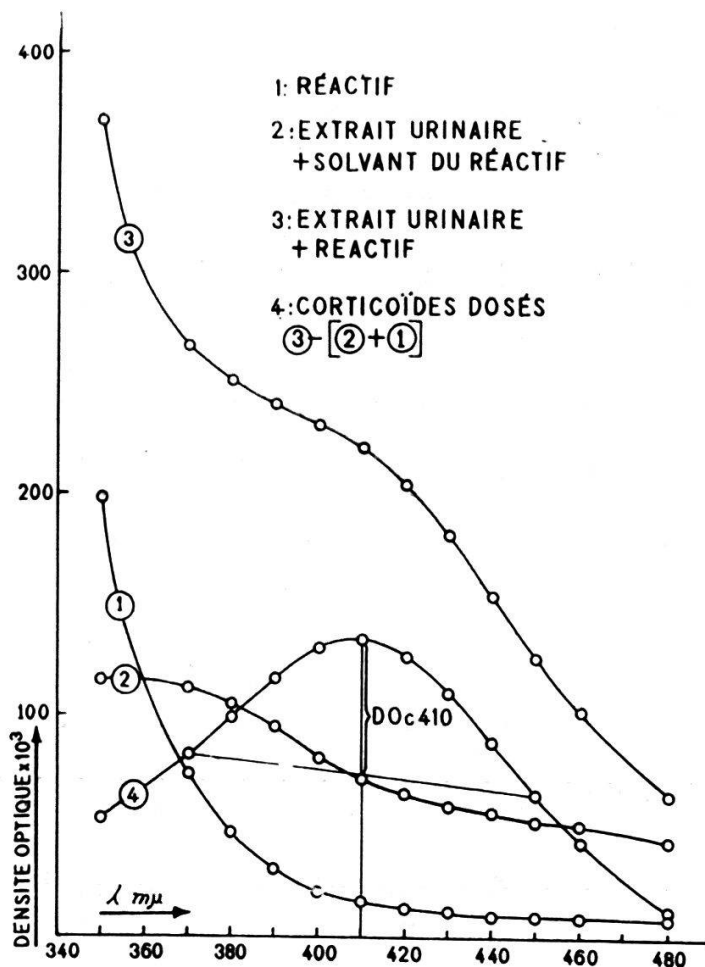


FIG. 3.

CHROMATOGRAPHIE SUR FLORISIL.

Deux qualités différentes de Florisil (= silicate de Mg) ont été étudiées. Ce produit doit subir plusieurs lavages à l'eau, à l'alcool méthylique, puis au chloroforme, après quoi il est soumis à une réactivation au four à 600° pendant 4 heures. Certains auteurs prétendent qu'une réactivation à 120° suffit. Nous avons examiné ces deux possibilités (tableau I) en fixant sur colonnes de Florisil (3 g) des quantités connues de cortisone (entre 10 et 30 γ) qui ont été éluées avec le mélange $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3$ à 25 % (v/v).

TABLEAU I.

Florisil 200/300 mesh (10-30 γ cortisone)		Florisil 60/100 mesh (10-25 γ cortisone)		
non traité (10 essais)	réactivé à 600° R. moyen (30 essais)	non traité (8 essais)	réactivé à 120° R. moyen : (12 essais)	réactivé à 600° R. moyen : (40 essais)
Rendement moyen : 38 \pm 18 %	84 \pm 10 %	50 \pm 12 %	69 \pm 14 %	84 \pm 9 %

Ces résultats montrent la nécessité du traitement à 600°. Ils indiquent d'autre part l'équivalence des deux qualités de produit. Le Florisil 60/100 mesh est préférable au 200/300 mesh, car ce dernier contient trop de particules très fines dont le diamètre est inférieur à celui spécifié. Toutefois, soit l'un soit l'autre laissent passer des poussières qu'il est nécessaire de centrifuger avant de pratiquer le dosage colorimétrique.

EXTRACTION ET LAVAGE DES EXTRAITS.

L'extraction de l'urine après hydrolyse enzymatique se pratique au moyen d'un extracteur rotatif. On évite de cette manière la formation d'émulsions; de plus, les liquides étant placés dans des cylindres horizontaux, la surface de contact entre le chlorure de méthylène (liquide extractant) et l'urine est fortement augmentée.

Une vingtaine d'essais d'extraction par le chlorure de méthylène (40 ml) ont été faits avec des solutions aqueuses de cortisone à la concentration de 20 γ de cortisone pour 30 ml de solution.

On obtient des résultats identiques après extraction de 10 mn et de 20 mn. La quasi totalité de l'hormone passe dans le solvant organique après 2 opérations. Le tableau II donne le pourcentage d'extraction en fonction du nombre et du temps d'extraction.

TABLEAU II.

	Durée d'extraction	
	10 mn	20 mn
1 extraction	94 \pm 4 %	93 \pm 3 %
2 extractions	99 \pm 3 %	99 \pm 3 %

A cette occasion, nous avons pu observer une diminution rapide de la quantité de cortisone en solution aqueuse; deux jours après la préparation de la solution, contenant 1 γ de cortisone par ml, on n'en pouvait retrouver que le 66 %. Cela prouve soit une destruction du produit, soit une adsorption par les parois de verre du flacon.

Ensuite, nous avons fait subir à 20 γ de cortisone dissous dans 30 ml H₂O dist. les étapes de l'extraction, suivies de 3 lavages avec NaOH (N) (40 ml) et de 5 lavages à l'eau distillée (40 ml). Le dosage de cortisone après ces opérations a donné une récupération moyenne de 82 \pm 2 %.

Les mêmes manipulations suivies du séchage de l'extrait sur Na₂SO₄ et de la filtration sur papier ont montré que les pertes pouvaient ainsi atteindre 80 %.

Par conséquent, ces dernières opérations doivent être supprimées. Nous avons essayé de remplacer Na₂SO₄ par MgSO₄. Le rendement augmente, puisque le 66 % du stéroïde peut être récupéré. La filtration sur ouate d'une solution de cortisone à 20 γ pour 50 ml CH₂Cl₂ suivie de rinçages abondants, occasionne une perte de 17 %; sur laine de verre, les pertes s'élèvent à 10 %. Quant au papier, il retient jusqu'à 87 % du stéroïde.

HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

La méthode envisagée préconise deux hydrolyses successives à pH 6,2 avec la β -glucuronidase, l'une de 18 h à 37° suivie de deux extractions, après quoi l'urine est incubée à nouveau pendant 24 h à 37°.

Nous avons effectué une trentaine d'essais où les deux extraits ont été analysés séparément. Ils ont montré que si la première incubation durait 24 h la seconde devenait inutile. En moyenne, la deuxième incubation ne libère que le 2,5 % des valeurs obtenues avec la première. Les chiffres extrêmes ont été de 0 et 6 %. Les quantités sont largement inférieures aux incertitudes d'analyse; elles peuvent être négligées.

Afin d'apprécier l'efficacité de la β -glucuronidase, plusieurs extractions d'urine ont été faites sans pratiquer l'hydrolyse enzymati-

que. Les valeurs obtenues correspondent aux 17-OH-corticostéroïdes libres. Les quantités extraites n'ont atteint que 3 à 6 % des quantités présentes après hydrolyse.

Certains auteurs effectuent l'hydrolyse enzymatique au pH de 4,5. Nous avons fait une vingtaine d'essais dans ces conditions avec incubation de 18 heures, suivie d'une seconde incubation de 24 heures. En général, la première hydrolyse libère des quantités de corticoïdes plus faibles qu'à pH 6,2. La 2^e incubation par contre fournit des valeurs qui représentent le 20 à 45 % de celles de la 1^{re} hydrolyse. Au pH de 4,5, les fluctuations sont grandes, les résultats peu reproductibles.

Le pH de l'hydrolyse doit donc être maintenu à 6,2. Une seule incubation de 24 h à 37° est suffisante.

REPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE.

Une soixantaine d'essais ont été réalisés, 2 à 8 analyses sur la même urine ont permis de calculer les écarts entre les diverses prises. Pour le 40 % des résultats, les écarts sont compris entre 0 et 10 %. Le 50 % des essais ont montré des écarts compris entre 10 et 20 %. Les 10 % restants ont des écarts situés entre 20 et 50 %.

A titre d'exemple, voici les résultats obtenus avec une série de 8 analyses pratiquées sur la même urine.

Poids de 17-OH-corticostéroïdes éliminés en 24 heures.

2,70	2,80	
2,72	2,80	
2,74	2,89	
2,75	2,94	mg en 24 h.
		L'écart maximum est de 9 %.

Quelques analyses, faites sur l'urine de personnes qui avaient reçu de nombreux médicaments, ont montré que certains de ceux-ci pouvaient interférer sur la réaction colorimétrique et donner des résultats erronés. Lorsque ces médicaments seront connus, une étape supplémentaire de purification devra être ajoutée au processus analytique, chaque fois qu'ils auront été administrés.

EXPÉRIENCES DE RÉCUPÉRATION.

Des quantités connues de cortisone et de « Reichstein S » comprises entre 10 et 100 γ ont été ajoutées à de l'urine avant hydrolyse enzymatique. Les analyses faites en tenant compte des modifications précitées, ont montré que le taux moyen de récupération s'élevait à 65 % pour la cortisone. Les valeurs extrêmes ont

été de 53 et 71 %. 20 γ de « Reichstein S » ont donné une récupération moyenne de 62 %.

Des comparaisons entre notre méthode et celle de REDDY (2) (extraction directe des corticoïdes libres et conjugués avec le butanol) ont montré que cette dernière fournit des valeurs plus élevées, et qu'il n'existe pas de proportionnalité entre les quantités appréciées par les deux méthodes.

Les analyses faites selon la méthode de HEUSGHEM modifiée ont donné jusqu'ici des taux d'élimination de 17-OH-corticostéroïdes compris entre 0,25 et 3,5 mg en 24 heures (urines de patients, hommes et femmes, hospitalisés à l'Hôpital cantonal de Lausanne). Il reste à établir les valeurs normales d'élimination en mesurant l'excrétion des 17-OH-corticostéroïdes sur des personnes bien portantes, en fonction de l'âge et du sexe.

DOSAGE DES 17-HYDROXY-CORTICOSTÉROÏDES URINAIRES (Technique HEUSGHEM modifiée).

Hydrolyse.

Prélever 30 ml d'urine de 24 h bien mélangée. Mettre à pH 6,2 avec l'acide acétique dil. ou de la soude dil., après avoir introduit dans l'urine 250 U/ml de β -glucuronidase (Schering) et une pointe de spatule de Complexon III. Tamponner avec 1 ml de tampon Sørensen. Mettre à l'étuve à 37° pendant 24 h.

Extraction et lavages.

Extraction avec 2 fois 40 ml de chlorure de méthylène au moyen de l'appareil rotatif pendant 15 mn chaque fois. L'extrait total est lavé de 3 à 5 fois avec de la soude normale (en général 3 fois suffisent). 30 ml de soude sont nécessaires pour chaque lavage. Le lavage est pratiqué jusqu'à ce que la soude soit incolore. Puis on lave avec 5 fois 30 ml d'eau distillée. Vérifier que la dernière eau de lavage soit faiblement acide (pH de l'eau distillée). Tous ces lavages s'effectuent dans des ampoules à décanter de 250 ml.

L'extrait est évaporé à sec dans une étuve à vide à la température de 40°.

Chromatographie sur colonne de Florisil.

Peser 3 g de Florisil 60/100 mesh activé par colonne. Le verser dans la colonne (11 mm de diamètre intérieur) contenant un tampon d'ouate vers le robinet. Environ 10 ml de chloroforme sont introduits avant le Florisil. Rincer les parois avec du chloroforme. On laisse sédimenter, puis fait couler le chloroforme jusqu'au niveau d'affleurement.

L'extrait sec est repris par 5 ml de chloroforme qui sont introduits dans la colonne. Le récipient est rincé 2 fois avec environ 3 ml du même solvant. Après avoir rincé les parois de la colonne, on laisse couler goutte à goutte jusqu'au niveau d'affleurement; puis on ajoute 25 ml de chloroforme que l'on fait couler goutte à goutte.

L'éluion se fait avec le mélange $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3$ à 25 % (v/v). 45 ml de ce mélange sont versés dans la colonne et recueillis dans un récipient propre. L'éluat est évaporé à sec dans l'étuve à vide à 40°.

Dosage colorimétrique.

Le résidu sec est dissous dans 5,00 ml de chlorure de méthylène. Deux fois 2,00 ml de la solution sont pipetés dans des tubes à centrifuger à bouchons rodés. Evaporer à sec, sous vide à 40°.

Dans l'un des tubes, on introduit 4,00 ml de réactif de Porter-Silber, dans l'autre 4,00 ml du mélange acide sulfurique-alcool éthylique, constituant le solvant du réactif.

Ces tubes sont abandonnés pendant 1 heure au bain-marie à 60°, puis refroidis à l'eau courante, centrifugés pendant 20 mn à environ 4000 t/mn et finalement refroidis à l'eau courante.

Toutes les lectures de densités optiques se font contre le mélange acide sulfurique-alcool, solvant du réactif.

On aura donc à mesurer les densités optiques de :

- 1) Réactif de Porter-Silber.
- 2) Résidu urinaire + 4,00 ml solvant du réactif.
- 3) Résidu urinaire + 4,00 ml réactif de Porter-Silber.

Comme standard, on emploie une solution de cortisone dans le chlorure de méthylène (12 % de cortisone par ml de solvant). 1,00 ml de cette solution est pipeté dans un tube à bouchon rodé, puis évaporé à sec. La densité optique corrigée du standard sera DO_c 410 st.

Toutes ces solutions doivent subir le chauffage à 60° pendant 1 h. Lire les densités optiques à 370, 410 et 450 m μ .

Calculs.

La quantité de 17-OH-corticostéroïdes éliminée en 24 h est donnée par la formule

$$\frac{\text{DO}_c \text{ 410 (volume urinaire en 24 h)}}{\text{DO}_c \text{ 410 st.}}$$

Elle est exprimée en poids de cortisone.

PURIFICATION DES SOLVANTS.

Alcool méthylique (Méthanol pour chromatographie Merck).

Redistiller avec environ 1 g par litre de 2,4-dinitrophényl-hydrazine.

Chloroforme (Chloroforme pur Ph. H. V. Siegfried).

Redistiller sur permanganate de potassium.

Alcool éthylique (alcool éthylique absolu Ph. H. V. Siegfried).

Pour 5 l d'alcool, laisser en contact avec environ 5 g de chlorhydrate de m-phénylènediamine pendant 8 jours, puis distiller. Ajouter au distillat 25 mg par litre de bleu de tétratholium et 5 ml de potasse alcoolique saturée. Distiller après contact d'une nuit.

Chlorure de méthylène (chlorure de méthylène pur, Siegfried).
Laver avec de la soude dixième normale, puis 2 fois avec de l'eau dist. Sécher sur chlorure de calcium puis distiller.

Réactif de Porter.

6,5 mg de chlorhydrate de phénylhydrazine (puriss. p. a. Fluka).
pour 15 ml d'un mélange H_2SO_4 à 62 % (v/v) et d'alcool éthylique
dans les proportions de 100 : 50.

Titrer la solution.

Tampon de Sørensen.

Solution A : KH_2PO_4 0,9078 g pour 100 ml d'eau distillée.

Solution B : Na_2HPO_4 1,1876 g pour 100 ml d'eau distillée.

Pour obtenir une solution tampon à pH 6,2-6,5, mélanger 7 ml
A + 3 ml B.

Préparation du Florisil.

Florisil de 60/100 mesh. Laver le Florisil plusieurs fois avec de l'eau distillée, puis 2-3 fois avec de l'alcool méthylique. Sécher à l'étuve. Laver 2-3 fois avec du chloroforme, sécher puis activer par chauffage à 600° pendant 4 h.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. HEARD R. D., SOBEL H. M., VENNING E. H. — *J. Biol. Chem.* 165, 699 (1946).
2. REDDY W. J., JENKINS D., THORN G. W. — *Metabolism* 1, 511 (1952).
3. DEMEY E., VIVARIO R., HEUSGHEM C., etc. — *Ann. Endocr.* 16, 665 (1955).
4. PORTER C. C. et SILBER R. H. — *J. Biol. Chem.* 185, 201 (1950).
5. ALLEN W. M. — *J. Clin. Endocrinology* 10, 71 (1950).

Manuscrit reçu le 5 janvier 1961.