616.633]:577.17.453]547.92]]-074:544.83

STANOVENÍ 17-HYDROXYKORTIKOIDŮ V MOČI SEMIMIKROMETODOU

PhMr. Miroslav HORÁK, technická spolupráce O. HORÁČKOVÁ
Ústřední biochemická laboratoř VLA JEvP, Hradec Králové, přednosta MUDr. Josef JÍCHA

Hladina kortikoidů v plasmě a moči je citlivým ukazatelem aktivity nadledvinkové kůry, obzvláště je-li sledována během stimulace ACTH a útlumu některým z prednisonových derivátů. Určování této skupiny steroidů má význam nejen pro diagnostiku, ale i pro kontrolu terapie.

Ke stanovení kortikoidů bylo vypracováno několik metod využívajících společných chemických vlastností určité skupiny kortikoidů.

Mezi biologicky nejúčinnější patří 17-hydroxykortikosteroidy (17-OH-CS), což jsou steroidy s postranním řetězcem dihydroxyacetonového typu (např. kortison, hydrokortison, Reichsteinova S látka). Tyto látky dávají s fenylhydrazinhydrochloridem v prostředí kyseliny sírové žluté zabarvení, známé pod pojmem Porter-Silberova reakce (1).

V moči nacházejí se 17-OH-CS jednak volné, jednak vázané, převážně na kyselinu glukuronovou. Volné 17-OH-CS jsou přítomny v moči v nepatrné koncentraci a lze je extrahovat přímo chloroformem (2). Vázané 17-OH-CS nutno před vlastní extrakcí chloroformem uvolnit z vazby enzymatickou hydrolysou β-glukuronidásou (2). Reddy a spol. (3, 4) stanovují celkové 17-OH-CS po butanolové extrakci, jak ji v naší literatuře popsal Doleček a Novák (5).

V naší laboratoři užíváme obou uvedených metod. V tomto sdělení se budeme zabývat stanovením celkových 17-OH-CS v moči butanolovou extrakcí. Naše zkušenosti s enzymatickou hydrolysou uvedeme na jiném místě (6).

Pokusili jsme se reprodukovat Reddyho metodu (4), jak ji přebírá Doleček (6), ale výsledky byly pro vysoké slepé hodnoty při fotometrii neodečitatelné. S podobnými obtížemi se setkali i jiní autoři (7). Modifikovali jsme proto metodu tak, že k barevné reakci používáme fenylhydrazin-sírové reagens s přídavkem absolutního alkoholu jako u plasmy (2), čímž jsme dosáhli značného snížení slepých hodnot (8). Metoda vyžaduje značnou čistotu butanolu používaného k extrakci. Jeho čištění je pracné a výtěžek přečištěného butanolu je malý. Další nevýhodou této metody je zdlouhavost.

Věnovali jsme proto pozornost semimikrometodě Sulmanově (9), která používá k extrakci malého množství butanolu a je rychlá. Uvádíme tuto metodu v naší modifikaci ve srovnání s původní Reddy-Jenkins-Thornovou metodou (4).

Metodická část

Reagencie:

1. 50% kyselina sírová ((v/v))
2. Bezvodý uhličitan sodný p. a.
3. 62% kyselina sírová. 310 ml konc. kyseliny sírové p. a. se smísí se 190 ml destilované vody za důkladného chlazení, doplní se na 500 ml vodou.
4. Ethanol absolutní. Čištění: k 1000 ml ethanolu se přidají 4 g m-fenylendiaminhydrochloridu a nechá se to stát několik týdnů v temnu za občasného míchání. Ethanol se pak redestiluje. Jímá se jen střední frakce, tj. asi 600 ml.
5. Slepé činidlo. 100 ml 62% kyseliny sírové se smísí s 50 ml abs. ethanolu za důkladného chlazení.
6. Činidlo fenylhydrazin-sírová kyselina. 65 mg fenylhydrazinhydrochloridu překryst. se rozpustí ve 150 ml slepého činidla.

Obě činidla se připravují v den vyšetření.

7. Fenylhydrazinhydrochlorid překryst.

Čištění: Připraví se nasycený roztok fenylhydrazinhydrochloridu v malém množství abs. ethanolu za horka, nechá se stát v lednici asi 1 hodinu a krystaly se odfiltrují. Krystalisace se opakuje ještě dvakrát. Konečný produkt je bílé barvy. Uchovává se v temnu a suchu.

8. Normální butanol p. a.

Čištění: k 1 l butanolu se přidá 100 ml fenylhydrazinsírového reagens a nechá se stát týden v lednici. Promyje se dvakrát s 500 ml destilované vody a uloží na několik hodin do ledničky. Vodná vrstva se odleje, přidá se 30 g bezv. síranu sodného a uloží se přes noc do lednice. Horní vrstva se odleje a destiluje. Sbírá se frakce vroucí při 117° C, kterou tvoří čistý butanol. Z frakce vroucí pod 117° C se oddělí vodná vrstva a k butanolové vrstvě se přidá 30 g bezv. uhličitanu sodného na 1 L, nechá se stát přes noc v lednici a destiluje.

Sbírá se frakce vroucí při 117° C. Butanol z obou destilací se zredestiluje.

9. Standardní roztok kortisonu. 5 mg kortisonu se rozpustí ve 100 ml butanolu. 0,1 ml obsahuje 5 gamma kortisonu. Uchovává se v lednici.

Sběr moče: sbírá se moč po dobu 24 hodin a během sběru se uchovává v lednici. Stanovení se provádí ihned po ukončení sběru.

Postup vyšetření

Vlastní vzorek

Do centrifugační zkumavky se zabroušenou zátkou odměříme 3 ml filtrované moče a několika kapkami 50% kyseliny sírové upravíme pH na 2. Přidáme 3 ml butanolu a zahříváme 10 minut na vodní lázni při 60° C. Uzátkujeme a třepeme 30 vteřin.

Vzniklou emulsi ostře zcentrifugujeme při 2500 obr./min.

Spodní vodnou vrstvu odsajeme kapilárou.

Ke zbývajícímu butanolu přidáme 0,15 g bezv. uhličitanu sodného a třepeme 30 vteřin.

Zcentrifugujeme a odpipetujeme 2krát po 1 ml butanolového extraktu do dvou zkumavek.

Slepá zkouška

Odměříme do dvou zkumavek 2krát po 1 ml butanolu.

Kalibrace

Odměříme do dvou zkumavek
0,1 ml stand. rozt. a 0,9 ml butanolu. Odpov. 5 gam.

0,2 ml	„	„	a 0,8 ml	„	„	10	gamma
0,4 ml	„	„	a 0,6 ml	„	„	20	gamma
0,6 ml	„	„	a 0,4 ml	„	„	30	„
0,8 ml	„	„	a 0,2 ml	„	„	40	„

Měření a výpočet

Do jedné řady zkumavek s butanolovým extraktem odměříme 4 ml činidla fenylhydrazin-sírové kyseliny a do druhé řady 4 ml slepého činidla.

Všechny zkumavky důkladně promícháme.

Inkubujeme 20 minut ve vodní lázni při 60° C, chladíme 5 minut ve studené vodě.

Zabarvení měříme při 410 milimí vždy proti příslušnému vzorku se slepým činidlem.

Ode všech naměřených extinkcí odečteme extinkci slepé zkoušky.

Hodnotu vlastního vzorku nalezneme v kalibrační křivce a přenásobíme množstvím moče za 24 hod.

Výsledky

Uvedenou metodou jsme provedli v naší laboratoři asi 1000 vyšetření obzvláště ve spojení s podáváním ACTH a současným sledováním 17-OH-CS v plasmě. Metodu jsme porovnali s dříve prováděnou metodou Reddy-Jenkins-Thornovou (4) a výsledky uvádíme v tabulce 1.

Tabulka 1

Číslo vzorku	17-OH-CS mg/24 hod. podle Reddyho	17-OH-CS mg/24 hod. novou metodou	Rozdíl v mg
1.	29,3	27,6	1,7
2.	12,7	12,2	0,5
3.	8,4	7,5	0,9
4.	7,9	6,9	1,0
5.	10,0	10,0	0,0
6.	15,6	14,2	0,6
7.	4,0	3,7	0,3
8.	5,5	4,8	0,7
9.	1,7	1,7	0,0
10.	1,37	1,35	0,02
11.	9,0	9,0	0,0
12.	19,5	19,5	0,0
13.	11,1	11,1	0,0
14.	17,4	17,4	0,0
15.	19,4	18,5	0,9

Tabulka 2

Číslo vzorku	Test mg/24 hod.	Kontrola mg/24 hod.	Rozdíl v mg
1.	12,7	12,98	0,28
2.	11,2	10,8	0,4
3.	1,7	1,5	0,2
4.	11,66	11,72	0,06
5.	10,45	10,56	0,11
6.	4,1	4,2	0,1
7.	21,7	21,2	0,5
8.	5,9	6,05	0,15
9.	39,3	39,1	0,2
10.	1,59	1,49	0,1

Tabulka 3

Číslo vzorku	17-OH-CS gamma/3 ml moče	Přidáno gamma kortisonu	Nalezeno gamma/3 ml moče	Výtěžek %
1.	13,2	10	23,2	100,0
2.	48,3	20	62,0	90,5
3.	25,8	30	51,9	93,0
4.	62,2	40	104,0	101,8
5.	31,2	50	88,5	109,0

V průměru jsou hodnoty 17-OH-CS získané novou metodou asi o 4 % nižší.

Reprodukovatelnost metody jsme si ověřovali jednak dvojím vyšetřováním stejného vzorku (tab. 2), při čemž průměrná odchylka činila 1,74 %, jednak metodou kvantitativního výtěžku (tab. 3).

Z uvedených tabulek vyplývá, že chyba stanovení nepřesahuje mez klinicky hodnotitelných výsledků.

Popsaná metoda se osvědčila v naší laboratoři stejně dobře, jako dříve používaná metoda Reddyho (4) a poskytuje proti ní několik výhod. Velkou předností metody je úspora butanolu používaného k extrakci a rychlost, takže je možno zpracovat velký počet vzorků v sérii. Malé množství použitého biologického materiálu umožňuje provádět vyšetření i v těch případech, kdy je moče málo (např. u kojenců, laboratorních zvířat), a tam, kde chceme sledovat hladinu 17-OH-CS společně s jinými vyšetřeními v moči.

Enzymatickou hydrolysu považujeme sice za exaktnější metodu než popsanou butanolovou extrakci. Vzhledem k tomu, že β-glukuronidasa je těžko dostupná, lze tuto metodu úspěšně použít, protože je dobře reprodukovatelná a výsledky jsou klinicky hodnotitelné.

Souhrn

Autoři popsali semimikrometodu stanovení celkových 17-OH-CS v moči butanolovou extrakcí. Metodu porovnali s původní metodou Reddyho, vyzkoušeli reprodukovatelnost a uvádějí výsledky.

Přednosti uvedené metody jsou rychlost a malá spotřeba chemikálií.

Písemnictví u autora