

*Journal of Chromatography*, 145 (1978) 478–482

*Biomedical Applications*

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 145

## Note

---

### Le comportement du 16 $\alpha$ -glucuronide d'oestriol sur resine Amberlite XAD-2

E.A. YAPO, V. BARTHELEMY-CLAVEY, A. RACADOT et J. MIZON\*

*Laboratoire de Biochimie, Faculté de Pharmacie, Rue du Professeur Laguesse, 59045 Lille Cedex (France)*

(Reçu le 24 octobre 1977)

L'Amberlite XAD-2 est une résine polystyrène, macromoléculaire, neutre, qui a trouvé de nombreuses applications en raison de ses capacités d'adsorption. Celles-ci ont été mises à profit, notamment pour l'extraction des médicaments [1–4], des acides biliaires [5, 6] et des hormones stéroïdes [7–15] à partir des échantillons biologiques. L'utilisation de ce support a été ainsi préconisée pour l'extraction des oestrogènes de l'urine, en vue de leur dosage colorimétrique [11, 12] ou fluorimétrique [13] par la réaction de Kober, ou par chromatographie en phase gazeuse [14, 15].

Cherchant à évaluer l'intérêt réel des méthodes ainsi proposées, et notamment de celles qui excluent l'hydrolyse des oestrogènes conjugués [11–13], nous avons testé le comportement, sur cette résine, de l'oestriol ( $\Delta$  1,3,5(10) oestratriène 3,16  $\alpha$ ,17  $\beta$ -triol et surtout celui de 16  $\alpha$ -glucuronide d'oestriol qui représente, au cours de la grossesse, la principale forme d'élimination de l'oestriol dans l'urine.

### MATERIELS ET MÉTHODES

La résine Amberlite XAD-2, 300–1000  $\mu$ m (Serva, Heidelberg 1, G.F.R.), est purifiée par lavages successifs avec 3 fois 3 volumes d'eau, 2 volumes de méthanol, puis 3 fois 3 volumes d'eau. Elle est conservée dans l'eau, à 4°. Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique: Oestriol et 16  $\alpha$  glucuronide d'oestriol (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.); Hydroquinone, paranitrophénol,

---

\* À qui adresser toute la correspondance.

éthanol, méthanol et acide sulfurique (Merck, Darmstadt, G.F.R.); Chloroforme R.P. (Prolabo, Paris, France)

### *Chromatographie*

La chromatographie est réalisée dans de petites colonnes en polypropylène (Bio-Rad, Richmond, Calif., U.S.A.). Le volume utile ( $4 \times 0.7$  cm) est garni de 1.5 ml de résine purifiée (ceci correspond à 0.4 g de résine sèche).

Un ml d'urine ou des divers échantillons contenant l'oestriol ou le 16  $\alpha$ -glucuronide d'oestriol est déposé sur chaque colonne dont le débit est réglé à environ 0.3 ml/min.

Les colonnes sont ensuite lavées avec 8 ml de solution aqueuse (de force ionique variable) au débit de 3 ml/min, puis éluées par 5 ml de méthanol (débit: 1 ml/min).

Les dosages des oestrogènes éventuellement entraînés dans les eaux de lavage, et celui des oestrogènes élués, sont effectués selon la réaction colorimétrique de Kober-Ittrich [16], comportant l'extraction du chromophore par une solution chloroformique de paranitrophénol à 2 g pour 100 ml.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, la capacité d'adsorption de la résine pour l'oestriol et le 16  $\alpha$ -glucuronide d'oestriol, a été contrôlée. Cette étude permet de confirmer les résultats de Bradlow [7] et d'Osawa et Slaunwhite [11]; aucune perte d'oestrogène n'est enregistrée dans les eaux de lavage après dépôt de 10  $\mu$ g d'oestriol ou de son dérivé 16  $\alpha$ -glucuroconjugué, en solution dans l'eau ou dans l'urine. La capacité d'adsorption pour l'oestriol paraît très grande puisqu'après dépôt de 100  $\mu$ g sur les colonnes décrites, on n'en retrouve que 0.6  $\mu$ g dans les eaux de lavage.

L'éluat par le méthanol a été ensuite étudiée. Celle de l'oestriol paraît excellente puisque le pourcentage de récupération est supérieur à 95% avec 5 ml de méthanol. Par contre, dans le cas du 16  $\alpha$ -glucuronide d'oestriol, l'éluat dépend fortement des conditions opératoires, comme le montre le tableau I; l'influence de la force ionique du milieu utilisé pour solubiliser le glucuronide d'oestriol ou pour laver la colonne de résine est bien mise en évidence puisque l'addition de chlorures de sodium ou de potassium permet d'obtenir un pourcentage de récupération dans l'éluat méthanolique voisin de 95%. L'addition d'urée, par contre, ne modifie pas le comportement de l'oestriol 16  $\alpha$ -glucuroconjugué.

L'effet de la force ionique qui vient d'être rapporté, présente un intérêt particulier dans le cadre du dosage des oestrogènes conjugués urinaires, puisqu'il affecte le pourcentage de récupération des oestrogènes dans ce milieu, comme le montre le tableau II. Cet effet ne semble pas avoir été mentionné par d'autres auteurs [7, 11, 15]. Ceux-ci préconisent généralement le lavage de la résine par un volume d'eau plus faible (par rapport au volume d'urine déposé) que dans les conditions décrites ici, de sorte qu'il persiste vraisemblablement sur la résine

TABLEAU I

MODALITÉ D'ÉTUDE DE L'ÉLUTION PAR 5 ML DE MÉTHANOL DU 16  $\alpha$ -GLUCURONIDE D'OESTRIOL APRÈS SON DÉPÔT SUR LA COLONNE ET LAVAGE DE LA RÉSINE DANS DIVERSES CONDITIONS

Composition des solutions de 16 $\alpha$ -glucuronide d'oestriol (10 $\mu$ g déposés par colonne)	Solution de lavage (8 ml)	Récupération après élution par 5 ml de méthanol* (%)
Eau	Eau	6.9 $\pm$ 2
Urée 0.33 M	Urée 0.33 M	1.5 $\pm$ 0.5
NaCl 0.14 M	Eau	29.3 $\pm$ 20
NaCl 0.85 M	Eau	44 $\pm$ 11
NaCl 1.29 M	Eau	73 $\pm$ 3
NaCl 1.72 M	Eau	89.5 $\pm$ 5.5
Eau	NaCl 0.14 M	90 $\pm$ 2
NaCl 0.14 M	NaCl 0.14 M	96 $\pm$ 3
KCl 0.13 M	KCl 0.13 M	94.5 $\pm$ 3.5

\*Pour chaque essai, les valeurs indiquées représentent les moyennes calculées à partir de trois résultats au minimum.

TABLEAU II

EFFET DE LA FORCE IONIQUE SUR L'ÉLUTION DU 16  $\alpha$ -GLUCURONIDE D'OESTRIOL EN SOLUTION DANS L'URINE

Composition des solutions urinaires de 16 $\alpha$ -glucuronide d'oestriol (10 $\mu$ g déposés par colonne)	Solution de lavage (8 ml)	Récupération après élution par 5 ml de méthanol* (%)
Urine pure	Eau	84.4 $\pm$ 4.5
Urine-eau (1:1)	Eau	55 $\pm$ 8
Urine-NaCl 3.44 M (1:1)	Eau	87 $\pm$ 8.5
Urine-NaCl 0.14 M (1:1)	NaCl 0.14 M	93.5 $\pm$ 3

\*Pour chaque essai, les valeurs indiquées représentent les moyennes calculées à partir de trois résultats au minimum.

une certaine quantité résiduelle de sels apportés par l'urine; l'irréversibilité de la fixation du 16  $\alpha$ -glucuronide d'oestriol par la résine, serait alors masquée partiellement.

En fait, le défaut d'élution du 16  $\alpha$ -glucuronide d'oestriol par le méthanol en l'absence de sels est surprenant puisque, normalement, la glucuroconjugaison des stéroïdes, en renforçant leur hydrophilie, devrait diminuer leur affinité pour la résine XAD-2. Ainsi, selon Osawa et Slaunwhite [11], les oestrogènes conjugués peuvent être élués assez sélectivement de l'amberlite XAD-2, par de

l'éthanol à 30% alors que l'essentiel des formes libres, reste fixé sur la résine dans ces conditions.

Il semble que l'effet de la force ionique puisse être expliqué par la présence possible de liaisons électrostatiques entre le radical glycuronate et la résine XAD-2. En effet, bien que les mesures titrimétriques classiques ne permettent pas de mettre en évidence la présence de charges sur la résine, Puon et Cantwell [17] concluent à l'existence d'un très petit nombre de charges cationiques et anioniques pour expliquer l'adsorption particulière de certains solutés. Ces observations sont aussi compatibles avec celles de Zaika [18] qui note une certaine difficulté à éluer l'ion hydroxyle ( $\text{OH}^-$ ) de l'Amberlite XAD-2.

Les mesures de la conductibilité de la phase aqueuse en équilibre avec cette résine, sont aussi en faveur d'une libération lente de composés ionisés, comme le montre le tableau III. Quel qu'en soit le mécanisme, l'adsorption irréversible de l'oestriol 16  $\alpha$ -glucuroconjugué sur la résine XAD-2, à faible force ionique, doit être efficacement contrôlée pour permettre l'utilisation de ce support dans des conditions satisfaisantes, en vue du dosage des oestrogènes conjugués urinaires.

Pour mettre en évidence l'intérêt de la purification des oestrogènes urinaires réalisée dans ces conditions, 30 urines de grossesse âgées de 26-42 semaines ont été dosées, en double, par la méthode colorimétrique d'Ittrich [16] avec et sans extraction chromatographique des oestrogènes sur résine XAD-2. Les résultats obtenus (Fig. 1) montrent que les points figuratifs du nuage de corrélation sont très dispersés et que la pente de la droite de régression ( $a = 0.794 \pm 0.302$ ) est relativement faible et très variable; ceci traduit une importante erreur liée à l'une des deux méthodes. On observe aussi que l'ordonnée à l'origine ( $b = 2.905$ ) est élevée et reflète une erreur systématique constante qui n'est pas négligeable. Ces erreurs sont liées, nous le pensons, à la méthode

TABLEAU III

MESURE DE LA CONDUCTIBILITÉ DE LA PHASE AQUEUSE EN ÉQUILIBRE AVEC LA RÉSINE XAD-2

Les conductibilités exprimées en Siemens par cm ( $\text{Scm}^{-1}$ ) ont été corrigées en tenant compte de la constante de cellule  $C = 0.84$ . Les valeurs indiquées représentent les moyennes des résultats de 3 essais. La conductibilité de l'eau bidistillée est de  $2.1 \text{ Scm}^{-1}$ .

	Conductibilité		
	1 g de résine préalablement purifiée et séchée, remise en suspension dans 40 ml d'eau bidistillée. Mesure de la conductibilité après agitation	La suspension de résine précédente est décantée, puis reprise par 40 ml d'eau bidistillée. Mesure:	
		avant agitation	après agitation
Résine neutre XAD-2	$11.50 \text{ Scm}^{-1}$	$2.35 \text{ Scm}^{-1}$	$3.80 \text{ Scm}^{-1}$

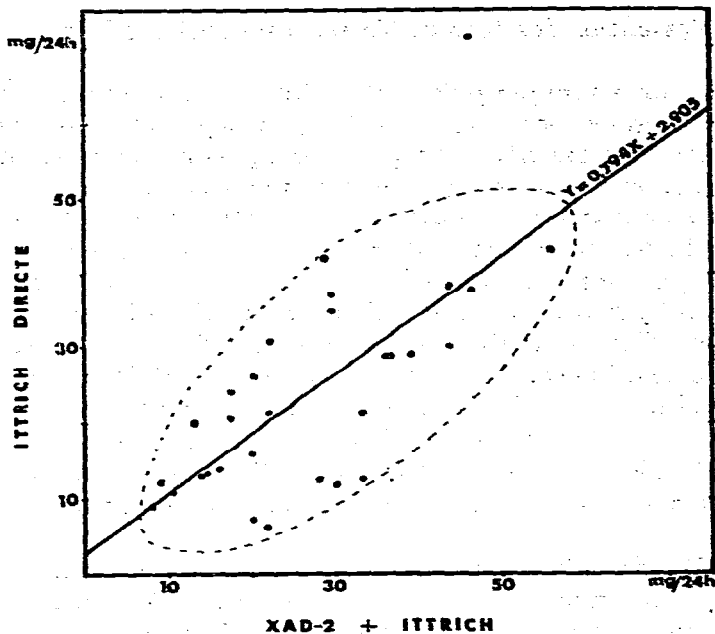


Fig. 1. Comparaison des valeurs de l'oestrogénurie, exprimées en oestriol et obtenues par la méthode d'Itrich pratiquée directement ou après extraction par l'Amberlite XAD-2. Les urines ont été dosées deux fois par chaque méthode et chaque point figuratif est obtenu à partir de la valeur moyenne des deux résultats.

directe d'Itrich et s'expliquent par la présence dans l'urine de nombreux composés susceptibles de gêner le développement de la réaction de Kober, et par celle de chromogènes interférents. Ces résultats confirment, par conséquent, le manque de fiabilité de la méthode directe d'Itrich signalé par plusieurs auteurs, notamment par Scholler et al. [19] et soulignent l'intérêt de la méthode proposée.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 A.W. Missen and J.F. Lewin, *Clin. Chim. Acta*, 53 (1974) 389.
- 2 J.M. Fujimoto and R.I.H. Wang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16 (1970) 186.
- 3 L.B. Hetland, D.A. Knowlton and D. Couri, *Clin. Chim. Acta*, 36 (1972) 473.
- 4 A. Stolman and P. Prانيتis, *Clin. Toxicol.*, 10 (1977) 49.
- 5 I. Makino and J. Sjövall, *Anal. Lett.*, 5 (1972) 341.
- 6 G.P. van Berge Hennegouwen and A.F. Hofmann, *Clin. Chim. Acta*, 73 (1976) 469.
- 7 H.L. Bradlow, *Steroids*, 11 (1968) 265.
- 8 M. Alemany, J. Balash and G. Riba, *Biochimie*, 57 (1975) 1107.
- 9 Y. Ariyoshi and Y. Osawa, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 232.
- 10 B. Rademaker, A. Jongejan-Timmer and J. Poortman, *Clin. Chim. Acta*, 70 (1976) 349.
- 11 Y. Osawa and W.R. Slaunwhite, *Steroids*, 15 (1970) 73.
- 12 E. von Kuss and R. Goebel, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 14 (1976) 549.
- 13 L. Lee and R. Hähnel, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 1194.
- 14 G.R. Gotelli, P.M. Kabra and L.J. Marton, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 165.
- 15 T.M. Chu, Y. Osawa and G. Reynoso, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 438.
- 16 G. Itrich, Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 312 (1958) 1.
- 17 S. Puon and F.F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 1256.
- 18 L.L. Zaika, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 222.
- 19 R. Scholler, J. Grenier, M. Fortin and M. Carton, *Rev. Fr. Gynécol.*, 69 (1974) 403.