

76. Aurelio MARIANI e Leonardo TENTORI. — La determinazione fluorimetrica delle sostanze estrogene.

Riassunto. — Vengono presi in esame i vari metodi chimico-fisici per la determinazione delle sostanze estrogene. Si stabiliscono gli accorgimenti necessari per eseguire il metodo con l'attrezzatura fluorimetrica del fotometro di Pulfrich. Si riportano i dati sperimentali ottenuti impiegando soluzioni di estrone puro; si fissano i limiti di impiego e le modalità per ridurre al minimo le incostanze proprie del metodo.

Résumé. — On examine les diverses méthodes physico-chimiques pour le dosage des substances oestrogènes. On établit les mesures appropriées pour appliquer la méthode qui utilise l'équipement fluorimétrique du photomètre de Pulfrich. On reporte les données expérimentales obtenues par l'emploi de solutions d'oestron pur; on fixe les limites à observer dans la pratique et les modalités pour réduire au minimum l'inconstance de résultats qui est propre de cette méthode.

Summary. — An investigation is made of the various physico-chemical methods for the determination of oestrogenic substances. Practical directions are given for carrying out the method utilizing the fluorimetric equipment of the Pulfrich photometer. The experimental data, obtained by using solutions of pure oestrone, are then reported; finally, the limits are fixed which in practice should be observed, together with the rules for minimizing the inconstancies inherent in this method.

Zusammenfassung. — Es werden die verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden zur Bestimmung der oestrogenen Substanzen studiert. Ferner bestimmt man alle praktischen Einzelheiten, die zur Durchführung einer solchen Bestimmung mittels der fluorimetrischen Apparatur des Pulfrich Photometers zu befolgen sind. Darauf werden die experimentellen, durch Verwendung von Lösungen reinen Oestrone erhaltenen Daten wiedergegeben, die Verwendungsgrenzen fixiert und alle praktischen Einzelheiten angegeben, um die mit dieser Methode verbundenen Unbeständigkeit der Ergebnisse so niedrig als möglich zu halten.

Le sostanze finora conosciute come responsabili della attività estrogena follicolinica sono l'estrone, isolato da Doisy nel 1929 dalle urine di donna gravida, l'estriolo, scoperto dal Marrian nel 1939, e l'estradiolo, preparato per via sintetica prima, e poi isolato dalle ovaie di scrofa e rintracciato nelle urine di donna gravida.

Per la ricerca e la determinazione di tali sostanze, il cui luogo di produzione, nello stato di non gravidanza è l'ovaio, e che si ritrovano diffusamente nei tessuti animali con prevalenza nella placenta, esistono test biologici che si basano tutti sulla azione che gli ormoni estrogeni sono capaci di esercitare sull'apparato genitale di diversi animali. Di questi il più usato è quello basato sul metodo originale di Allen e Doisy che impiega ratte o topine previamente castrate.

Accanto ai metodi biologici sono state studiate, specialmente di recente, alcune reazioni chimiche, che permettono con maggiore semplicità di ricercare qualitativamente ed anche, per alcune, quantitativamente, le sostanze estrogene.

Kober ⁽¹⁾ fu il primo, nel 1931, a proporre un metodo chimico per la determinazione delle sostanze estrogene contenute nelle urine; il metodo è basato sulla formazione di una colorazione rossa che si sviluppa per trattamento della sostanza in esame con acido fenolsulfonico. Tale colorazione è paragonabile con una soluzione standard di rosso cresolo.

Cohen e Marrian ⁽²⁾ hanno applicato il metodo di Kober per la determinazione dell'estrone e dell'estriolo ottenuti per frazionamento dalle urine servendosi di curve standard ottenute da soluzioni di ormone puro ed impiegando il tintometro di Lovibond.

Successivamente, nel 1935, Cartland, Meyer, Miller e Rutz ⁽³⁾ hanno ancora perfezionato il metodo originale di Kober ed hanno ricavato alcune curve impiegando gli ormoni allo stato cristallino.

Altre reazioni colorate sono state in seguito proposte per l'identificazione e la determinazione degli ormoni estrogeni, così Zimmermann ⁽⁴⁾ ha osservato che con il m-dinitrobenzene in soluzione alcolica

⁽¹⁾ Bioch. Z., 239, 209 (1931).

⁽²⁾ Bioch. J., 28, 1603 (1934).

⁽³⁾ J. Biol. Chem., 109, 213 (1935).

⁽⁴⁾ Z. physiol. Chem., 233, 257 (1935).

alcalina si può avere un colore violetto in presenza di estrone; tale colorazione non è strettamente caratteristica di questa sostanza in quanto viene data da un certo numero di altri chetoni.

Schmulovitz e Wylie ⁽⁵⁾ hanno invece consigliato di copulare le sostanze estrogene con la p-nitroanilina diazotata in modo da ottenere un bel colore arancione.

David ⁽⁶⁾ ha descritto un test colorimetrico specifico dell'estriolo servendosi dell'acido solforico concentrato caldo ed acido arsenico in modo da ottenere un tipico colore blu.

Infine Pincus, Wheeler, Joung e Zahl ⁽⁷⁾ osservando la poca specificità dei metodi colorimetrici precedenti ne proposero uno nuovo basato su una reazione colorata ottenuta per mezzo di cloruro di benzoile. Tale reazione, che è più fortemente positiva per l'estrone rispetto all'estradiolo, non è data dall'estriolo, e quindi permette una certa distinzione fra le varie sostanze estrogene.

Del metodo spettrofotometrico si sono invece serviti Chevallier, Cornil e Verdollin ⁽⁸⁾ per determinare le sostanze estrogene estratte con idrolisi alcalina dalle urine di donna gravida.

Sala ⁽⁹⁾ è stato il primo ad indicare un metodo qualitativo per la ricerca degli ormoni estrogeni nelle urine basato sulla fluorescenza verde che si sviluppa per azione dell'acido solforico concentrato ed a consigliare il metodo come mezzo semplice e pratico per il rilievo della gravidanza nella giumenta. Data la relativa facilità di ottenere prodotti fluorescenti dalle sostanze estrogene, specie negli ultimi tempi si è affermata la tendenza ad abbandonare i metodi colorimetrici, che in definitiva risultavano poco specifici e di limitata specificità, ed hanno preso maggiore sviluppo i metodi di determinazione dei tre ormoni estrogeni per mezzo di misure fluorimetriche, resi ancora più pratici dal perfezionamento degli apparecchi di misura. La determinazione però degli estrogeni eseguita con acido solforico non presentava la necessaria sicurezza dal punto di vista della specificità in quanto molte sostanze organiche forniscono pro-

⁽⁵⁾ J. Lab. and Clin. Med., 21, 210 (1935).

⁽⁶⁾ Acta brev. Neerland, 4, 64 (1934).

⁽⁷⁾ J. Biol. Chem., 116, 253 (1936).

⁽⁸⁾ Bull. Acad. méd., 114, 171 (1935).

⁽⁹⁾ Rev. sud-am. endocrin., 18, 325 (1935).

dotti fluorescenti per trattamento con acido solforico. Sostituendo invece l'acido solforico con l'ortofosforico si è trovata una specificità molto più spinta ed una possibilità di eseguire determinazioni quantitative ⁽¹⁰⁾.

Recentemente Finkelstein, Hestrin e Koch ⁽¹¹⁾ hanno preso in studio la determinazione fluorimetrica degli ormoni estrogeni ed hanno descritto un metodo di esecuzione relativamente facile, con il quale si possono ottenere relazioni lineari fra quantità di sostanza ed intensità di fluorescenza. Il metodo consigliato, nelle sue linee generali, è molto semplice, in quanto è basato sul trattamento della sostanza ben secca con acido fosforico puro di densità 1,75, in tubo chiuso con tappo a smeriglio, facendo avvenire la reazione al buio ed immergendo i tubi in b. m. bollente. La fluorescenza che si sviluppa viene misurata fotoelettricamente con un fotofluorimetro del tipo Lumetron usando microvaschette da 2 cm³. Dovendoci interessare dei metodi di determinazione delle sostanze estrogene, abbiamo a lungo sperimentato il metodo fluorimetrico consigliato dai suddetti AA. anche perchè, al fine di rendere il metodo di applicazione più vasta, ci interessava vedere se esso era applicabile alla attrezzatura fluorimetrica del fotometro di Pulfrich. Poichè si era in possesso di un campione standard di estrone puro le nostre ricerche si sono limitate per il momento alla determinazione di tale sostanza. In un primo tempo ci siamo serviti di acido fosforico di densità 1,75 preparato per idratazione dell'anidride fosforica Merck, controllandone sempre la densità per via picnometrica. Per quanto concerne l'apparecchio, abbiamo potuto constatare che il fotometro di Pulfrich ha una sensibilità sufficiente per la determinazione di quantità fino a 6 gamma di estrone. Per quanto riguarda il metodo abbiamo notato:

1) Tutti i campioni di acido fosforico di densità 1,75 presentano più o meno una fluorescenza bluastra che danneggerebbe la determinazione delle sostanze estrogene se non si prendesse la precauzione di filtrare opportunamente la fluorescenza proveniente dalle sostanze estrogene. Tale precauzione è stata da noi attuata facilmente interponendo tra campione in esame ed oculare dell'apparecchio una vaschetta da un cm riempita di soluzione al 2% di bicromato di potassio. Attraverso tale

⁽¹⁰⁾ HESTRIN e MAGER, *Nature*, 158, 95 (1946).

⁽¹¹⁾ *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 64, 64 (1947).

strato di liquido qualunque campione di acido fosforico appariva completamente esente da fluorescenza, mentre era possibile misurare la fluorescenza propria delle sostanze estrogene anche se presenti in piccole quantità.

2) Come fluorescenza tipo, per poter eseguire misure quantitative abbiamo usato una soluzione di fluoresceina sodica alla concentrazione

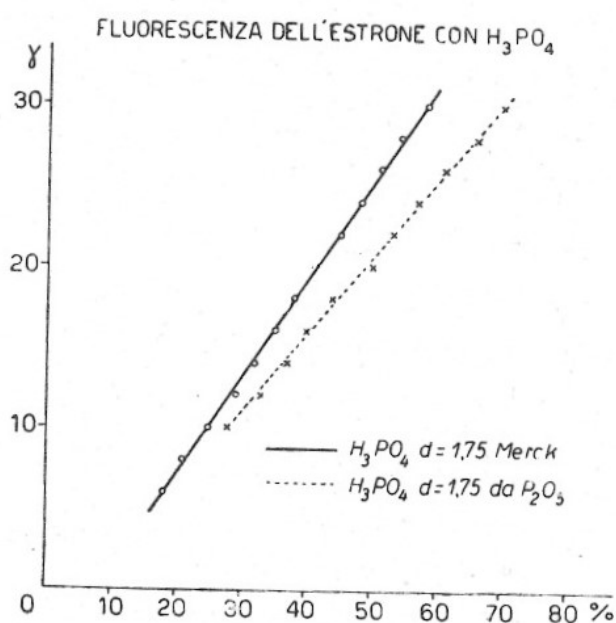


FIG. 1.

di 10 mg per litro che ci ha dato la possibilità di una buona comparazione visiva entro i limiti 6-30 gamma di estrone.

Seguendo tali accorgimenti abbiamo tracciato una prima curva (figura 1), linea tratteggiata) ricavando i dati da quantità variabili di una soluzione alcolica di estrone puro a 20 gamma per cm^3 .

Tre punti essenziali piuttosto delicati sono stati osservati durante lo svolgimento delle operazioni, e precisamente: l'importanza di lavorare

in assenza di tracce di umidità, specialmente durante l'immersione dei tubi nel b. m.; la necessità di effettuare l'agitazione dei tubi seguendo sempre le stesse modalità; infine l'azione della luce sulla formazione della fluorescenza. Per quanto riguarda questo ultimo punto, contrariamente a quanto hanno rilevato Finkelstein e Coll. abbiamo potuto stabilire che l'effetto della luce è limitato soltanto ai primi minuti del riscaldamento e consiste nell'impedire notevolmente lo sviluppo della fluorescenza mentre non ha più effetto allorchè questa si è completamente sviluppata; infatti i valori di fluorescenza, al termine del riscaldamento, non subiscono variazioni esponendo i tubi, anche alla temperatura del b. m. bollente, alla luce diretta del sole, mentre esponendoli anche alla luce diffusa durante i primi minuti di riscaldamento, si avevano, al termine, valori bassissimi di fluorescenza.

Per avere riproducibilità ed esattezza di dati si è quindi proceduto con la seguente tecnica:

La soluzione alcolica di estrone è stata posta in un robusto tubo a tappo smerigliato che è stato immerso in b. m. bollente fino a completa evaporazione del solvente. I tubi sono stati quindi posti in stufa per un'ora a 105° per completare l'essiccazione. Estratti dalla stufa i tubi si sono lasciati raffreddare all'aria ed al prodotto completamente freddo, sono stati aggiunti 3 cm^3 di acido fosforico di densità 1,75. Dopo una prima energica agitazione i tubi, ben chiusi, sono stati immersi di nuovo, al buio, in b. m. bollente; dopo 1 e 2 minuti il liquido è stato agitato per 2 volte, di nuovo immerso nell'acqua bollente ed ivi mantenuto per 30'. Dopo questo tempo i tubi sono stati raffreddati sotto l'acqua corrente e la fluorescenza è stata misurata in vaschette da 0,5 cm di spessore.

Seguendo rigorosamente questa tecnica, i valori di fluorescenza ricavati si sono trovati in progressione lineare entro un campo da 6 a 30 gamma di estrone.

Una seconda serie di esperimenti è stata eseguita impiegando acido fosforico Merck della densità dichiarata di 1,75 e la medesima soluzione di estrone adoperata nelle prove precedenti. Anche in questo caso la densità dell'acido fu controllata picnometricamente e trovata corrispondente al dichiarato e le prove sono state eseguite attenendosi scrupolosamente alla stessa tecnica. E' da notare che l'acido Merck presentava soltanto una lievissima fluorescenza propria.

I risultati ottenuti sono rappresentati nella fig. 1 (linea retta); i valori della fluorescenza anche in questo caso variano linearmente nello stesso campo di misura e più prove, eseguite a distanza di tempo hanno dato una perfetta riproducibilità dei valori ottenuti.

I dati di fluorescenza ricavati in questa seconda serie di prove non corrispondono a quelli già riportati ed ottenuti con acido fosforico di altra provenienza, per cui, nello stesso campo di misura le curve si trovano leggermente spostate.

Da quanto suesposto si può concludere:

A) Il metodo fluorimetrico proposto da Finkelstein, Hestrin e Koch per la determinazione delle sostanze estrogene, può essere eseguito anche con l'attrezzatura fluorimetrica del fotometro di Pulfrich per un campo da 6 a 30 gamma di estrone puro, qualora vengano seguiti particolari accorgimenti.

B) Le difficoltà del metodo possono essere superate ed è possibile ottenere risultati costanti adoperando sempre un acido fosforico della stessa provenienza.

C) Poichè per una stessa quantità di sostanza estrogena acidi fosforici di diversa provenienza forniscono valori differenti di fluorescenza, non è possibile riportare una curva unica a cui attenersi per le determinazioni quantitative, bensì è necessario ricavare questa in precedenza, impiegando lo stesso acido con cui si farà poi la misura sulla sostanza da determinare.

Mentre ci riserviamo di applicare in seguito il metodo già provato sulle varie frazioni estrogene insolate dalla follicolina fisiologica, abbiamo ugualmente in programma di studiare singolarmente il comportamento delle tre sostanze estrogene servendoci di misure assolute fornite da un fluorimetro a cellula fotoelettrica il quale ci permetterà di estendere le misure anche in un campo inferiore a quello nel quale abbiamo effettuato le nostre esperienze.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità + Laboratorio di Biologia. 7 luglio 1948.
