

## AMÉLIORATION DU DOSAGE DE LA PROGESTÉRONE SOUS FORME DE DINITROPHÉNYLHYDRAZONE

P. ROMBAUTS et Colette PITON

*Laboratoire des Métabolismes,  
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

### SOMMAIRE

La méthode que nous proposons consiste, après extraction et isolement chromatographique selon la technique de SHORT, à former sur le papier la progestérone-dinitrophénylhydrazone et à éliminer le fond coloré par le réactif de STUPNICKI. Après extraction, la coloration est intensifiée par HONa.

Le coefficient d'extinction molaire,  $\epsilon$  max. à 445 m $\mu$ , est de 31 000. Après correction d'Allen la densité optique pour 1  $\mu$ g de progestérone par ml, qui est de 0,035 pour l'absorption U V, de 0,040 pour DNPH avec un simple lavage acide, est ici de 0,060.

### INTRODUCTION

SHORT (1961) a bien montré tout l'intérêt du dosage de la progestérone elle-même plutôt que celui de ses métabolites urinaires. Bien que les quantités de progestérone sécrétées pendant la phase lutéale du cycle œstrien et la gestation soient bien supérieures à celles des œstrogènes, son dosage dans le sang nécessite une méthode très sensible. Si pendant la deuxième partie de la gestation, la concentration de progestérone dans le sang périphérique chez la femme est en moyenne de 14,2  $\mu$ g par 100 ml de plasma (SHORT et ETON 1959, ZANDER 1962), pendant la phase lutéale du cycle, elle n'est que de 0,9 à 3,9  $\mu$ g (SOMMERVILLE et al 1963). Chez les animaux domestiques, ces concentrations sont encore plus faibles : 0,8  $\mu$ g par 100 ml de plasma en fin de gestation chez la vache et 0,4  $\mu$ g chez la brebis (SHORT 1961).

La meilleure méthode d'évaluation de la sécrétion serait, en principe, de doser cette hormone dans le sang veineux ovarien. Mais, outre qu'elle exige une intervention chirurgicale et présente le risque d'une modification du débit sanguin par le cathéter, il est très difficile de suivre l'évolution de la libération d'hormones sur un même individu pendant plus de quelques heures.

L'intérêt d'une méthode de dosage, en plus de sa spécificité, dépendra donc beaucoup de la sensibilité de la technique finale de détermination. Les différentes méthodes utilisées ont été récemment passées en revue par SHORT (1961) et ZANDER

(1962). Nos essais ne concernent ici que l'amélioration de la détermination finale.

L'absorption en ultra violet à 240 m $\mu$  caractéristique des  $\Delta_4$ -3 cétostéroïdes, utilisée par de nombreux auteurs, est d'une sensibilité acceptable ( $\epsilon$  max = 16 000) mais de nombreuses impuretés des extraits, des solvants et du papier chromatographique absorbent dans la même région du spectre. Après plus d'un an d'expérience, devant la difficulté d'obtenir des blancs comparables au même niveau du papier chromatographique et malgré le lavage préalable de ces papiers, nous avons dû abandonner cette absorption UV.

Nous avons essayé la méthode colorimétrique de SOMMERVILLE et DESHPANDE (1958) utilisant l'hydrazone isonicotinique de la progestérone mais elle s'est révélée trop peu sensible pour obtenir un dosage précis si on lui applique la correction d'ALLEN (Fig. 1). SOMMERVILLE l'a d'ailleurs abandonnée et utilise maintenant un autre dérivé de la progestérone, la bîsthiosemicarbazone (SOMMERVILLE et al 1963), utilisée également par PEARLMAN et CERCEO (1963) et SIMMER (1959). Mais cette méthode très sensible ( $\epsilon$  301 m $\mu$  = 39 000) exige, d'après l'expérience de SOMMERVILLE deux chromatographies successives, sur gel de silice et sur papier.

Une autre méthode colorimétrique préconisée par plusieurs auteurs utilise la 2-4 dinitrophényl hydrazine (DNPH). REICH et al (1952, 1953) et GORNALL et Mac DONALD (1953) avaient déjà montré qu'en 5 minutes à 20°, le groupement  $\Delta_4$ -3 céto réagit quantitativement. HINSBERG et al (1956), TELEGDY (1961) et HILLIARD (1961) ont utilisé cette réaction pour la détermination de la progestérone dans le plasma sanguin. Mais le réactif en excès et certaines impuretés des extraits sanguins absorbent fortement dans la zone de la DNPH-hydrazone formée. Le simple lavage acide ne permet pas une sensibilité suffisante (TELEGDY) et HINSBERG et al effectuent une deuxième chromatographie après formation du dérivé. L'oxydation au  $KMnO_4$  préconisée par STUPNICKI et STUPNICKA (1962) pour la détection des cétostéroïdes permet d'éliminer complètement le fond coloré. Nous avons vérifié que ce traitement n'entraînait aucune destruction de la progestérone dinitrophénylhydrazone. Nous avons ainsi, pu mettre au point, en étudiant les conditions d'éluion et en ajoutant un traitement final à HONa une méthode de dosage précise et sensible et qui ne nécessite qu'une seule chromatographie.

## MÉTHODE

Nous avons adopté pour l'extraction, la purification et l'isolement de la progestérone, la technique de SHORT (1958), intéressante pour l'efficacité de l'extraction en milieu sodique ainsi que pour sa simplicité et sa rapidité d'exécution. Sa valeur a été démontrée, comparativement aux méthodes de ZANDER et d'ERTEL et EIK-NES (ZANDER 1962). Dans les cas d'extraits trop chargés en lipides, on ajoute simplement une étape de précipitation des lipides à — 20° dans le méthanol 70 p. 100, suivie d'une centrifugation.

Nous résumons simplement dans un schéma le début de la méthode appliquée à des corps jaunes de Truie (SHORT 1958, ROWLANDS et SHORT 1959). Pour le sang, la technique est identique mais on porte la concentration de soude à 0,5 g par 100 ml de plasma et il faut effectuer quatre extractions avec 1,5 volume d'éther éthylique pour avoir une récupération maximum.

Corps jaunes (0,5 à 1 g) stockés dans l'éthanol absolu à — 20°.

Évaporer à sec (évaporateur rotatif sous vide et azote).

Extraction :

Broyage dans 5 à 10 ml de HONa 2,5 p. 100.

Extraction avec 4  $\times$  30 ml d'éther éthylique.

Évaporer à sec.

Purification :

Reprendre par 30 ml d'éther de pétrole.

Extraction par  $6 \times 10$  ml de méthanol 70 p. 100.

Précipitation des lipides à  $-20^{\circ}$  et centrifugation.

Chromatographie :

Papier Whatman n<sup>o</sup> 20.

Ligroïne — Méthanol 80 p. 100, 5 heures environ à  $37^{\circ}$ .

#### *Réaction avec DNPH et purification*

La formation du dérivé et l'élimination des impuretés et de l'excès de réactif se fait directement sur le papier, sans élution préalable. Les chromatogrammes sont trempés dans une solution à 0,1 p. 100 de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans HCl 2N. L'hydrazone de la progestérone apparaît sous forme de taches oranges sur fond jaune. La 17  $\alpha$  hydroxy-progestérone donne également une coloration orange tandis que la 4 androstène 3-17 dione donne une tache rose foncé.

On laisse égoutter les papiers 10 minutes puis on les lave plusieurs fois dans un plateau avec une solution à 1 p. 100 de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $10\text{H}_2\text{O}$ , jusqu'à ce que le liquide de lavage ne soit plus que légèrement coloré en jaune.

On fait ensuite tremper les papiers pendant 10 minutes dans une solution oxydante préparée extemporanément avec 2ml de  $\text{KMnO}_4$  à 1 p. 100 et 1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $10\text{H}_2\text{O}$  à 10 p. 100, le tout dilué à 100 ml. Le DNPH en excès et les colorations parasites sont alors détruites. Les bandes de papier sont égouttées et mises 5 minutes à tremper dans une solution réductrice extemporanée d'acide ascorbique à 0,2 p. 100, contenant 1 goutte d'acide chlorhydrique par 100 ml de solution, dans le but d'éliminer le  $\text{MnO}_2$  formé et le  $\text{KMnO}_4$  restant.

On termine enfin par un rinçage à l'eau et on essore entre deux papiers-filtres. On obtient ainsi un fond incolore sans altérer l'hydrazone de la progestérone.

#### *Dosage spectrophotométrique*

On découpe le papier en carré autour des taches et on prélève, comme blanc ; un morceau de même surface et à la même distance du front. Pour extraire la coloration, on entaille le papier aux ciseaux et on laisse la dissolution s'opérer dans des tubes à essai bouchés émeri avec 0,9 ml d'éthanol à 95<sup>o</sup> pendant une heure. On ajoute alors 0,1 ml de HONa 20 p. 100 et la coloration orangée vire au pourpre, augmentant ainsi de beaucoup la sensibilité du dosage. L'alcalinisation permet d'ailleurs une élution tout à fait quantitative, difficile à obtenir sans cette addition de HONa. On laisse la coloration se développer pendant une heure. Quand la solution est transvasée dans les cuves de dosage la lecture doit être faite en quelques minutes, sinon un trouble apparaît au contact de l'air. Les lectures sont faites en microcuves de 1 ml à 370,445 et 520  $\text{m}\mu$ , et on applique la correction d'Allen :

$$D. O. \text{ corrigée à } 445 \text{ m}\mu = D. O. 445 - \frac{D. O. 370 + D. O. 520}{2}$$

On ne peut établir les courbes-étalons qu'avec des quantités de progestérone de 0 à 5  $\mu\text{g}$  par ml et chromatographiées dans les mêmes conditions que les extraits, car la réaction et l'élution ne sont complètes que jusqu'à 5  $\mu\text{g}$  par ml. Nous avons obtenu avec des échantillons de progestérone de source différente (ROUSSEL, LIGHT) des droites superposables (fig. 2). Toutefois, une quantité connue de progestérone pure est déposée sur chaque chromatogramme pour contrôler le dosage, et si le résultat s'éloigne des valeurs normales, le calcul est fait d'après ce témoin.

### VALIDITÉ DE LA MÉTHODE

#### *Spécificité*

DNPH étant un réactif général des cétones, la spécificité de la méthode dépend de l'efficacité de la séparation chromatographique. Dans le système Bush utilisé, la progestérone est nettement isolée des cétostéroïdes de polarité voisine présents en quantité importante dans les ovaires et dans le sang : 17- $\alpha$ -hydroxyprogestérone,

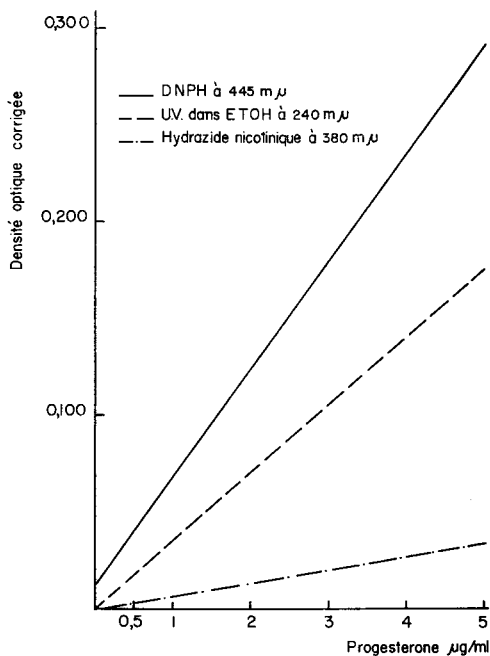


FIG. 1. — Courbes-étalons comparées de trois méthodes de dosage de la Progesterone

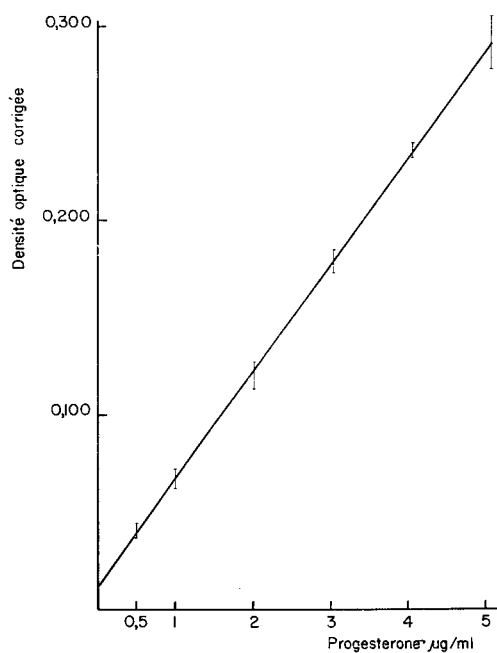


FIG. 2. — Courbe-étalon moyenne de dosage de la Progesterone, après correction d'ALLEN. I indique les écarts extrêmes des courbes individuelles

4-androstène-3-17 dione, 4 pregnène-20 $\alpha$ 1-3 one et 4 pregnène 20 $\beta$ 1-3 one. D'ailleurs en 10 minutes et à froid, la réaction n'est complète qu'avec les  $\Delta$ 4-3 céto et les 3 céto-stéroïdes. Les 20 et les 17 céto-stéroïdes réagissent plus lentement. Sur la figure 3, les spectres de la DNP hydrazone de la progestérone et d'un extrait de corps jaunes sont bien identiques.

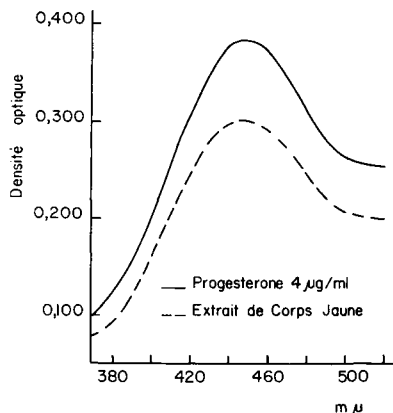


FIG. 3. — Spectres comparés des dinitrophényl-hydrazones, traités à HO.Na, de progestérone pure et d'extraits de corps jaunes de Truie

#### Fidélité

Huit chromatographies ont été effectuées à partir d'un même extrait de corps jaunes de Truie. Les chiffres montrent que, malgré la purification poussée, la correction d'Allen reste nécessaire.

N° du dosage	D. O. à 370 mμ	D. O. à 445 mμ	D. O. à 520 mμ	D. O. corrigée
1 .....	0,093	0,503	0,335	0,289
2 .....	0,101	0,505	0,331	0,2895
3 .....	0,120	0,525	0,350	0,290
4 .....	0,118	0,525	0,349	0,291
5 .....	0,110	0,515	0,345	0,2875
6 .....	0,114	0,520	0,345	0,290
7 .....	0,119	0,539	0,364	0,287
8 .....	0,072	0,484	0,321	0,2875

#### Sensibilité

La nécessité de détection visuelle du spot sur le papier limite la sensibilité à 0,5 μg de progestérone par cm<sup>2</sup>. En adoptant une méthode de repérage plus sensible, par exemple avec addition de <sup>14</sup>C progestérone, le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$  à 445 mμ = 31 100) permettrait de doser de plus faibles quantités. Le coefficient d'extinction est équivalent à celui d'HINSBERG (1956) après élimination du réactif excédentaire. La figure 1 montre la sensibilité de cette méthode par rapport à l'hydrazide nicotinique et l'absorption UV à 240 mμ.

*Récupération*

Avec les corps jaunes de Truies, les pourcentages de récupération sont assez constants et en moyenne s'élèvent à 90,2 p. 100. Les résultats expérimentaux sont donc corrigés par un facteur de 1,1.

Progestérone du tissu µg	Progestérone ajoutée µg	Progestérone retrouvée µg	Pourcentage de récupération p. 100
5,4	3,0	8,15	91
3,33	2,5	5,47	86
2,4	2,5	4,70	91
1,72	2,5	4,07	93
2,22	2,5	4,49	90
Moyenne			90,2

Sur le sang, huit essais de récupération de 4 ou 5 µg de progestérone ajoutés à 10 ou 20 ml de plasma de porc ont donné une récupération moyenne de 88 p. 100, avec des écarts extrêmes de 81 et 94 p. 100.

## APPLICATION DE LA MÉTHODE

*Teneur en Progestérone de corps jaunes de Truies gestantes*

N°	Age de la gestation jours	Nombre de corps jaunes	Poids moyen d'un C. J. (mg)	Progestérone (*) totale (µg)	Progestérone par C. J. (µg)	Progestérone par g de tissu (µg)
1	41	10	425	179	17,9	42,1
2	41	11	581	265	24,1	41,5
3	52	12	380	306	25,5	67
4	69	12	363	256	21,3	58,7
5	70	23	335	411	19,2	57,3

(\*) Valeurs corrigées pour les pertes de dosage ( $\times 1,1$ )

Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par LOY et *al* (1957, 1958) et par DUNCAN et *al* (1960).

Cette technique a été utilisée avec succès sur l'ovaire de rat et semble applicable au plasma sanguin comme le laissent prévoir les récupérations obtenues jusqu'à présent.

*Reçu pour publication en novembre 1963.*

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. le Docteur BOUFFAULT et la Société ROUSSEL-UCLAF qui nous ont obligeamment fourni la progestérone utilisée pour cette étude.

## SUMMARY

## ESTIMATION OF PROGESTERONE AS DINITROPHENYLHYDRAZONE

After extraction and chromatography according to SHORT, the method reported here consists of making directly on the paper the progesterone-dinitrophenylhydrazone and removing the colored back ground by the STUPNICKI's reagent. After extraction, the colour is enhanced by OHNa.

The molar extinction coefficient,  $\epsilon$  max. à 445 m $\mu$ , is 31 000. After Allens's correction equation, the optical density for 1  $\mu$ g progesterone per ml, is 0,035 for UV absorption at 240 m $\mu$ , 0,040 for DNP method with a single acid purification and with the method described 0,060.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DUNCAN G. W., BOWERMAN A. M., HEARN W. R. et MELAMPY R. M., 1960. *In vitro* synthesis of Progesterone by Swine Corpora Lutea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 17-19.
- GORNALL A. G., Mac DONALD M. P., 1953. Quantitative determination of the steroid hormones with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Biol. Chem.*, **201**, 279-297.
- HILLIARD J., ENDROCZI E. et SAWYER C. H., 1961. Stimulation of Progesterin release from Rabbit ovary *in vivo*. *Proc. Soc. Biol. Med.*, **103**, 154-156.
- HINSBERG K., PELZER H. et SEUKEN A., 1956. Bestimmung sehr kleiner Mengen Progesteron in menschlichen Plasma. *Biochem. Z.*, **328**, 117-125.
- LOY R. G., Mac SHAN W. H. et CASIDA L. E., 1957. A rapid method for purification and quantitative estimation of Progesterone from luteal tissue. *J. Biol. Chem.*, **229**, 583-588.
- LOY R. G., Mac SHAN W. H., SELF H. L., et CASIDA L. E., 1958. Interrelations of number, average weight and Progesterone content of Corpora Lutea in Swine. *J. Anim. Sci.*, **17**, 405-409.
- PEARLMAN W. H. et CERCEO E., 1953. The estimation of saturated and  $\alpha$ ,  $\beta$  — unsaturated Ketonic compounds in Placental extracts. *J. Biol. Chem.*, **203**, 127-134.
- REICH H., SANFILIPPO S. J. et CRANE K. F., 1952. *Biol. Chem.*, **198**, 713-719.
- REICH H., CRANE K. F., SANFILIPPO S. J., 1953. The reaction of steroid ketones with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *J. Org. Chem.*, **18**, 822-832.
- ROWLANDS I. W. et SHORT R. V., 1959. The Progesterone content of the Guinea pig Corpus Luteum during the reproductive cycle and after hysterectomy. *J. Endocrin.*, **19**, 81-86.
- SIMMER H. et SIMMER I., 1959. Progesteron im peripheren Venenblut von Schwangeren mit Spätgestosen. *Klin. Wochschr.*, **37**, 971-975.
- SOMMERVILLE I. F. et DESHPANDE G. N., 1958. The quantitative determination of Progesterone and Pregnanediol in human plasma. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **38**, 1223-1236.
- SOMMERVILLE I. F., PICKETT M. T., COLLINS W. P. et DENYER D. C., 1963. A modified method for the quantitative determination of Progesterone in human plasma. *Acta Endocrin.*, **43**, 101-109.
- SHORT R. V., 1958. Progesterones in blood. I. The chemical determination of Progesterone in peripheral blood. *J. Endocrin.*, **16**, 415-425.
- SHORT R. V., 1961. In GRAY C. H. et BACHARACH A. L. *Hormones in blood*, 379-437. Academic Press, London et N. Y.
- SHORT R. V. et ETON B., 1959. *J. Endocrin.*, **18**, 418.
- STUPNICKI R. et STUPNICKA E., 1962. Detection of ketosteroids on chromatograms. *J. Chromato.*, **9**, 235-237.
- TELEGDY G. et ENDROCZI E., 1961. Progesterone content of the dog's ovarian venous blood and ovarian tissue. *Acta Physiol. Hungar.*, **20**, 277-283.
- TOUCHSTONE J. C. et MURAVEC T., 1960. Enhancement of the fluorescence of progesterone (and other (steroids) in sulfuric acid. *Anal. Chem.*, **32**, 822-824.
- ZANDER J., 1962. In DORFMAN R. I., *Methods in Hormone Research. Vol. I. Chemical determinations*, 91-137. Academic Press. N. Y. et London.