

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 283–284

Méthode Simplifiée pour le Dosage Fluorométrique de l'Acide 5-Hydroxy-Indoleacétique dans le Liquide Céphalo-Rachidien Humain

Par F. Geissbühler

Clinique Psychiatrique Universitaire (Directeur: Professeur J. de Ajuriaguerra) de Bel-Air, Chêne-Bourg, Suisse

(Eingegangen am 6. März/28. November 1974)

Resumé: La méthode de dosage fluorométrique de l'acide 5-hydroxy-indoleacétique par condensation avec l'*o*-phthalaldéhyde a été modifiée en remplaçant HCl concentré à 100°C par un mélange HCl-H₂SO₄ à température ordinaire; la sensibilité de la méthode a ainsi été multipliée par un facteur de 2,7.

A simplified method for the fluorometric determination of 5-hydroxy-indoleacetic acid in the human liquor cerebrospinalis

Summary: The fluorometric analysis of 5-hydroxy-indoleacetic acid by condensation with *o*-phthalaldehyde has been modified by substituting a HCl-H₂SO₄ mixture at room temperature for hot concentrated HCl. The sensitivity of the method was increased by a factor of 2.7.

Vereinfachte Methode für die fluorometrische Bestimmung von 5-Hydroxyindolessigsäure in Liquor cerebrospinalis vom Menschen

Zusammenfassung: Die fluorometrische Analyse von 5-Hydroxyindolessigsäure durch Kondensation mit *o*-Phthalaldéhyd wurde modifiziert, indem statt heißer konzentrierter Salzsäure ein Gemisch von HCl/H₂SO₄ bei Raumtemperatur verwandt wurde. Die Empfindlichkeit der Methode wurde um den Faktor 2,7 gesteigert.

Introduction

Il est admis que l'étude de l'acide 5-hydroxy-indoleacétique dans le liquide céphalo-rachidien peut fournir des indications sur le métabolisme de la sérotonine du parenchyme cérébral chez l'homme (1). De plus, ces indications sont utilisées pour orienter l'emploi des médicaments psychotropes, dans les syndromes dépressifs (2).

La condensation de l'acide 5-hydroxy-indoleacétique avec l'*o*-phthalaldéhyde, telle que l'a proposée Maickel (3), sert de fondement à une technique analytique de l'acide 5-hydroxy-indoleacétique qui se distingue par sa sensibilité élevée et sa bonne reproductibilité. Cependant, sous sa forme habituelle, ce procédé présente l'inconvénient d'imposer l'utilisation d'HCl concentré chauffé à près de 100°C pendant plusieurs minutes.

Cette difficulté a été tournée en remplaçant, volume pour volume, l'HCl concentré par un mélange H₂SO₄-H₂O-HCl qui s'emploie à température ordinaire et qui, de surcroît, augmente la sensibilité de l'analyse.

Méthode

Réactifs particuliers

a) Ether éthylique traité avec un demi volume d'une solution aqueuse de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 H₂O 5 mmol/l et lavé deux fois à l'eau bidistillée

b) Mélange H₂SO₄-H₂O-HCl: mélanger précautionneusement 6 volumes de H₂SO₄-24 mol/l à 1 volume de HCl 12 mol/l; laisser reposer quatre heures. Se garde une semaine à température ordinaire.

N.B.: tous les réactifs sont de qualité « pour analyse »; l'eau est désionisée et bidistillée dans du quartz.

Extraction de l'acide 5-hydroxy-indoleacétique et fluorométrie

8 ml de liquide céphalo-rachidien sont acidifiés avec 0,1 ml HCl 5 mol/l (l'adjonction de NaCl solide s'est

	Blanc	Analyse	Etalon externe
Extrait final (tampon tris)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Acide 5-hydroxy-indoleacétique 1,31 nmol/l	—	—	0,02 ml (= 50 ng de 5-HIAA)
NaIO ₄ 93,5 μmol/l dans H ₂ O	0,05 ml	—	—
Cystéine 8,25 μmol/l dans H ₂ O	—	0,05 ml	0,05 ml
HCl-H ₂ SO ₄ (b)	1 ml	1 ml	1 ml
NaIO 93,5 μmol/l	—	0,05 ml	0,05 ml
Cystéine 8,25 μmol/l dans H ₂ O	0,05 ml	—	—
<i>o</i> -Phthalaldéhyde 74,5 μmol/l dans H ₂ O	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

Tab. 1. Comparaison des blancs et des étalons externes (fixés à 30,3 ng par ml de mélange où se forme le fluorophore) obtenus selon la méthode classique et la modification proposée ici. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence: UF, la moyenne arithmétique: \bar{x} , et la déviation standard: SD ont été calculées; N = nombre d'analyses; P a été calculé selon la méthode de *Student*.

	Méthode classique			Méthode modifiée			P
	\bar{x} [UF]	SD	N	\bar{x} [UF]	SD	N	
Blanc mesuré sur des solutions aqueuses	—	—	—	1,8 ± 0,2	—	(7)	(c)
Blanc mesuré sur des liquides céphalo-rachidien	2,6 ± 0,3	—	(16)	2,2 ± 0,3	—	(16)	(d) < 0,02
Etalon externe dans des solutions aqueuses	—	—	—	73,1 ± 2,2	—	(8)	(e)
Etalon externe dans des liquides céphalo-rachidien	32,6 ± 2,6	—	(16)	75,6 ± 0,9	—	(8)	(f) < 0,001

révélée inutile) et extraits avec deux fois 10 ml d'éther (a); la phase organique est reprise par 4 ml de tampon tris 0,05 mol/l pH 8,5. Le développement de la fluorescence se fait selon le schéma suivant.

Laisser 15 minutes à température ordinaire. Les longueurs optimales d'activation et de fluorescence sont respectivement 375 et 480 nm (valeurs non corrigées de l'appareil utilisé, à savoir un Aminco-Bowman).

Commentaire

La saturation du liquide céphalo-rachidien par du NaCl (2 g pour 8 ml de liquide céphalo-rachidien) a un effet défavorable sur le rendement global de l'extraction; en effet, l'étude d'un étalon interne de 400 ng a montré que le rendement avec NaCl n'atteint que 95,5 ± 2,5 % (N = 8) contre 98,2 ± 2,7 % (N = 11) sans NaCl (P < 0,05). De plus, ce rendement s'abaisse au-dessous de 90 % si la concentration de HCl dépasse 0,3 mol/l.

La mesure du blanc et de l'étalon externe (fixé à 30,3 ng d'acide 5-hydroxy-indoleacétique par ml de mélange où se forme le fluorophore) a donné les résultats exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UF) qui sont consignés dans le tableau No 1.

Les chiffres du tableau No 1 (lettre e) permettent d'attribuer à la technique décrite ici une sensibilité (définie comme la concentration d'acide 5-hydroxy-indoleacétique qui détermine une valeur fluorométrique au moins égale à celle du blanc) de 1,5 ng/ml de liquide céphalo-rachidien — pour une prise de 8 ml de liquide céphalo-rachidien — contre 4 ng/ml pour la technique classique; il en résulte donc un gain en sensibilité de 2,7.

L'exactitude de la méthode a été estimée par comparaison avec la méthode classique, en dosant 6 échantillons de liquide céphalo-rachidien par chacune de ces deux techniques; les résultats suivants ont été obtenus: $r = 0,999$, $P < 0,001$, $y = 0,75 \text{ ng/ml} + 0,983 x$ (valeurs extrêmes des échantillons: 10 et 75 ng/ml).

La précision de la méthode peut être calculée grâce aux chiffres du tableau No 1, lettre f. En posant que la précision est représentée par

$$\frac{\bar{x} \cdot 100}{SD}$$

on obtient 1,2 % pour la série considérée.

Quant à la reproductibilité de la méthode, elle a été étudiée en calculant la moyenne arithmétique de la précision de 6 séries de 6 analyses complètes réalisées par trois exécutants différents et en intercalant trois jours entre chaque série. On a ainsi obtenu la valeur de 3,32 ± 0,91 % (valeurs extrêmes: 2,19 et 4,46%).

La méthode est linéaire jusqu'à une concentration d'au moins 150 ng dé acide 5-hydroxy-indoleacétique par ml de mélange où se forme le fluorophore. Le fluorophore est stable au moins une heure.

En conclusion, les simplifications méthodologiques proposées ici (suppression du NaCl lors de l'extraction et remplacement de l'HCl concentré chaud par un mélange acide utilisable à température ordinaire) aboutissent à une technique qui, tout en étant aussi sûre que la méthode habituelle, présente l'intérêt d'être plus sensible et de dégager beaucoup moins de vapeurs toxiques et corrosives.

Remerciements

L'auteur exprime ses remerciements à Melle D. Machard et à Mme Y. Raffin pour leur excellente assistance technique.

Bibliographie

1. Bowers, M. B. (1972), *Neuropharmacol.* 11, 101–111.
 2. Sjöqvist, F. (1971), *Int. Pharmacopsychiat.* (Basel), 6, 147–169.
 3. Maickel, R. P. (1972), *Methods Neurochem.* 2, 101–129.
- Priv.-Doz. Dr. F. Geissbühler
CH-1225 Chêne-Bourg