

224. Dosage rapide de l'acide ascorbique des surrénales du Rat

par Kurt H. Meyer†, C. H. Haselbach et R. A. Boissonnas.

(30 VI 52)

Le dosage de l'acide ascorbique dans les surrénales du Rat a pris une importance accrue par suite du développement du dosage de l'A.C.T.H. selon le test de *Sayers*¹.

Sayers dose l'acide ascorbique des surrénales du Rat à la dinitrophénylhydrazine selon *Roe & Kuether*²). Cette méthode est longue et incommode pour des dosages en série. Le dosage de l'acide ascorbique au dichlorophénolindophénol³) est plus rapide et plus adapté au travail en série, mais il a le désavantage d'être moins spécifique et moins précis.

Nous nous sommes donc efforcés de modifier la méthode classique à la dinitrophénylhydrazine, de façon à obtenir une méthode précise et spécifique, rapide et facile à utiliser dans les dosages en série.

*Roe & Kuether*²) emploient une quantité précise d'un noir animal spécialement traité pour effectuer l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydro-ascorbique, et pour filtrer l'extrait glandulaire. Des essais nous ont montré que certains noirs animals absorbent une quantité appréciable d'acide ascorbique ou déhydro-ascorbique. Nous avons remplacé pour la filtration le *noir animal* par la *Celite 535*⁴) qui facilite la filtration de l'extrait sans retenir l'acide ascorbique ni l'acide déhydro-ascorbique⁵). Nous employons *l'eau de brome* pour transformer *l'acide ascorbique en acide déhydro-ascorbique*. L'oxydation est instantanée. *L'excès d'oxydant* est détruit par *l'aniline* qui se transforme en bromoaniline⁶).

Au lieu de chauffer avec la dinitrophénylhydrazine pendant 3 h. à 37° comme *Roe & Kuether* (loc. cit.), nous chauffons à 100° pendant 5 min. seulement.

Le noir animal retient toujours une quantité appréciable de liquide et nécessite un volume initial de solution suffisamment grand. Afin de maintenir le volume final dans des limites raisonnables, *Roe & Kuether* sont obligés d'ajouter un faible volume d'acide sulfurique concentré lors de la dilution du produit de réaction, ce qui provoque

¹⁾ M. A. Sayers, G. Sayers & L. A. Woodbury, Endocrinology **42**, 379 (1948).

²⁾ J. H. Roe & C. A. Kuether, J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943).

³⁾ P. L. Munson, A. C. Barry & F. C. Koch, J. Clin. Endocrinol. **8**, 586 (1948).

⁴⁾ Celite 535 de Johns Manville (U.S.A.), livrée par Schneider & Cie., Winterthur.

⁵⁾ Ce n'est pas le cas de l'Hyflosupercel qui retient partiellement les acides ascorbique et déhydro-ascorbique.

⁶⁾ Ce principe de destruction de l'excès de brome par une réaction de substitution aromatique a été employé par K. H. Meyer & P. Kappelmeier, B. **44**, 2718 (1911).

un très fort échauffement et exige une adjonction lente de l'acide sous refroidissement. Au contraire, l'abandon du noir animal permet d'utiliser une prise initiale concentrée, de volume réduit, et l'on peut ainsi diluer le produit de réaction par un volume plus grand d'acide sulfurique dilué, ce qui permet d'obtenir un même volume final de même concentration en acide que selon *Roe & Kuether* et, en évitant l'échauffement, de simplifier et d'accélérer les manipulations.

Grâce à ces perfectionnements, *une seule personne peut faire une cinquantaine de dosages en 40 min., alors qu'il faut env. 5 h. par la méthode de Roe & Kuether*. Il est ainsi possible, en une même journée, d'effectuer plusieurs dosages d'A.C.T.H. selon *Sayers* en se basant chaque fois sur les résultats du test précédent.

Notre méthode permet de doser avec une précision de $\pm 1\%$ de 10 à 50 γ d'acide ascorbique par prise de 2 cm^3 , c'est-à-dire de 25 à 125 γ d'ac. ascorbique par glande.

Entre ces limites, il y a proportionnalité directe entre le log. de l'extinction et la concentration. En portant en abscisse les concentrations et en ordonnée les log. des extinctions (blancs défaillés), on obtient donc une droite passant par zéro.

Entre 4 et 8 min. de chauffage, l'extinction augmente de 5 % par min. de chauffage. Il faut donc contrôler le temps de chauffage à ± 5 sec. Afin d'éliminer toute variation pouvant provenir du temps de chauffage, ou de la température de chauffage (variation de la pression barométrique), nous dosons un standard d'acide ascorbique en même temps que chaque lot. Le cas échéant, il suffira de diviser toutes les valeurs obtenues par un facteur proportionnel à la valeur donnée par le standard. Autrement dit, la variation du temps de chauffage ne fait que changer la pente de la droite. Il n'est donc pas nécessaire, comme avec la méthode de *Roe & Kuether* (qui emploient aussi un standard), de se rapporter à une courbe étalon, et tous les calculs peuvent ainsi être faits à la règle.

Des essais effectués en double (2 prélèvements de 2 cm^3 sur le même filtrat) ont donné exactement les mêmes valeurs, ce qui prouve l'excellente reproductibilité de la méthode.

Nous remercions vivement le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* et la *Rockefeller Foundation* de l'aide qu'ils nous ont accordée, ainsi que Mlle *M. Vidoudez* de sa collaboration.

Partie expérimentale.

Réactifs: Acide trichloracétique 4%.

Dinitrophénylhydrazine en solution 2% dans l'acide sulfurique 9-n. (1 vol. acide sulfurique concentré + 3 vol. eau).

Acide sulfurique 70% en poids (130 vol. ac. sulfurique conc. + 100 vol. eau).

Eau de brome: de l'eau distillée est secouée avec quelques gouttes de brome et décantée. Ce réactif doit être fraîchement préparé.

Aniline: 3 cm^3 d'aniline dissous dans 100 cm^3 SO_4H_2 9-n.

Celite 535 de Johns Manville.

Appareillage: Eprouvettes Pyrex de 150×15 mm, en verre épais, sans rebord, et un support en aluminium pouvant contenir 50 éprouvettes.

Verres à centrifuger de 10×15 cm³ avec pistil pour homogénéiser.

Gooch en verre fritté G 3 de 1 à 1,5 cm Ø.

Le gooch est fixé sur un bouchon caoutchouc 2 trous s'adaptant sur les éprouvettes. Le second trou est garni d'un tube de verre relié au vide. On peut employer le même gooch et éventuellement les mêmes verres à centrifuger et pistils pour toutes les déterminations, en les lavant à l'eau, puis en les rinçant à l'alcool méthylique et les séchant par un courant d'air.

Spectrophotomètre Unicam S. P. 350 (à réseau de diffraction) ou tout autre colorimètre à réseau ou à filtre.

Bain-marie pouvant contenir le support à éprouvette.

Bac de refroidissement.

Pipettes jaugées de 0,1 cm³, 0,5 cm³, 2 cm³ et 5 cm³.

Méthode. Dans un verre à centrifuger sec, placer une surrénale plus 5 cm³ d'acide trichloracétique. Triturer par un pilon sec. Ajouter env. 50 mg (par une cuillère jaugée) de Celite 535. La quantité de celite n'a pas d'influence sur le dosage. Triturer avec la celite.

Filtrer sur gooch G 3 au vide dans une éprouvette sèche. Une fois que toute la série de glandes a été triturée et filtrée:

De chaque éprouvette: Prélever 2 cm³ par une pipette et les placer dans une éprouvette sèche (on peut utiliser la même pipette non rincée pour tous les prélèvements, les concentrations étant toujours du même ordre de grandeur).

Ajouter 0,1 cm³ d'eau de brome¹⁾. Agiter. Moins d'une min. après, ajouter 0,1 cm³ d'aniline¹⁾. Agiter. Ajouter 0,5 cm³ de dinitrophénolhydrazine. Agiter.

Plonger exactement 5 min., dans le bain-marie bouillant, le support garni des éprouvettes et, aussitôt ce dernier retiré, le placer dans un bain d'eau froide. Dans les 5 min. qui suivent, ajouter à chaque tube 5 cm³ d'acide sulfurique. Agiter. Après 5 min. sortir du bain et lire contre l'eau au spectrophotomètre Unicam à 540 mμ.

On fait simultanément à chaque série deux blancs contenant tous les réactifs mais pas de glandes, ainsi que deux standards contenant une quantité connue d'acide ascorbique.

SUMMARY.

Ascorbic acid determination according to *Roe & Kuether* which is extensively used in *Sayers A.C.T.H.* test, has been transformed and simplified so as to allow rapid serial work:

Norit is replaced by Celite and oxydation is effected by bromine, the excess of which being destroyed by aniline.—Heating time is reduced from 3 hours to 5 minutes, temperature being raised to 100°.—Exothermic dilution by strong sulfuric acid is avoided.

Linear relation between ascorbic acid concentration and log. of extinction is obtained in the range of 10 to 50 γ. Precision and reproducibility are excellent.

The present method allows 50 determinations to be carried out in about 40 minutes, as compared with more than five hours by the original method of *Roe & Kuether*.

Precision and selectivity are better than those obtained by the dichlorophenolindophenol dye method.

Laboratoires de Chimie Organique et Inorganique
de l'Université de Genève.

¹⁾ On peut accélérer encore ces opérations en remplaçant les pipettes de 0,1 cm³ par des entonnoirs remplis de réactif et se terminant par un capillaire donnant toutes les 2 sec. une goutte de 0,1 cm³.