

CP 202406



**DOSAGEM DO CORTISOL LIVRE DO PLASMA PELO
MÉTODO DA DILUIÇÃO ISOTÓPICA**

Takeko Shimizu

DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 053

MAIO/1978

**DOSAGEM DO CORTISOL LIVRE DO PLASMA PELO
MÉTODO DA DILUIÇÃO ISOTÓPICA**

Takeko Shimizu

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em
Ciências" – Orientador Prof. Dr. Bernardo L. Wajchenberg.
Apresentada e avaliada em 25 de junho de 1971,
na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo.**

APROVADA PARA PUBLICAÇÃO EM JUNHO/1977.

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach - Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto de Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabeth Azavedo Beretta
Fábio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo R. P. P. P.

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11.049 (Pinheiros)
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
SÃO PAULO - BRASIL

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	
MATERIAL E MÉTODOS	5
1 – Material Biológico	5
2 – Reagentes	5
3 – Purificações dos Reagentes	6
4 – Extração do Cortisol	6
5 – Cromatografia em Camada Delgada	6
6 – Colorimetria	7
7 – Medida da Radioatividade	9
CAPÍTULO III	
RESULTADOS	13
1 – Valor de Rf	13
2 – Concentração Plasmática do Cortisol em Indivíduos Normais	13
3 – Comparação do Nível de Cortisol Plasmático, Determinado pelo Método da Diluição Isotópica e pelo de Peterson e col. ⁽³⁴⁾	14
CAPÍTULO IV	
DISCUSSÃO	16
CAPÍTULO V	
CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

DOSAGEM DO CORTISOL LIVRE DO PLASMA PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO ISOTÓPICA

Takeko Shimizu

RESUMO

Padronizou-se um método para a dosagem de cortisol plasmático empregando-se a técnica da diluição isotópica para a correção das perdas ocorridas durante o processo analítico. A técnica consistiu em adicionar-se uma quantidade "traço" do cortisol- $1,2\text{-}^3\text{H}$ no início da extração e medir-se a radioatividade da fração final obtida. Para a extração e determinação do cortisol foi empregada a técnica de Peterson e col. (34). Para a separação e identificação do cortisol foi utilizada a cromatografia em camada delgada unidimensional, separando-se com nitidez o cortisol dos demais esteróides e impurezas presentes no plasma.

O valor encontrado para o cortisol plasmático foi de $14,02 \pm 5,79 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ e para a porcentagem de perda de $53,62 \pm 15,57\%$.

A comparação da técnica de diluição isotópica com o método de Peterson e col. mostrou que ambos se equivalem, exceto quando existem substâncias interferentes não esteróides. No método proposto, as mesmas são eliminadas pelo emprego da cromatografia em camada delgada.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A dosagem de hormônios corticais no sangue periférico proporciona informações muito úteis para estudos de ordem cíclica e experimental⁽³²⁾.

Dos hormônios adrenocorticais, o cortisol (17-hidroxicorticosteróide) é predominante no sangue periférico: sua concentração no plasma é de cerca de $13 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ e a da corticosterona de cerca de $1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ⁽³²⁾.

Os esteróides produzidos pela córtex da suprarenal são lançados na veia adrenal, onde a sua concentração é da ordem de $100 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ⁽¹¹⁾. A veia adrenal seria por certo o ponto de escolha para a obtenção de sangue utilizado no isolamento e na identificação desses hormônios. Nos demais vasos, a concentração dos hormônios corticais é naturalmente muito menor.

Os hormônios corticais são metabolizados nos diversos tecidos, mas as etapas do seu metabolismo são pouco conhecidas. Sabe-se entretanto, que o fígado é a principal sede de degradação de esteróides.

Para estabelecer uma relação entre o nível de esteróides plasmáticos e a sua atividade biológica,

(*) Trabalho realizado na Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

Abreviaturas: BG - background (contagem de fundo); cm - contagem por minuto; dpm - desintegração por minuto; F - cortisol; nm - nanometro; PPO - 2,5 - difeniloxazol; POPOP - p - bis [2 - (5 - feniloxazolil) benzeno

deve-se levar em consideração vários fatores. No sangue periférico, pequena fração do cortisol está na forma livre, mas grande parte (aproximadamente 95%) está ligada às proteínas, particularmente à transcortina^(32,28). A fração ligada à proteína, apesar de não estar quimicamente alterada é farmacologicamente inativa. A fração livre é a correspondente ao cortisol metabolicamente ativo. A maioria dos métodos conhecidos para determinar o cortisol que corresponde à fração livre, na realidade mede duas frações, a ligada à proteína e a livre propriamente dita⁽³³⁾.

No sangue periférico, existe outra porção do cortisol e seus metabólitos que estão conjugados com o ácido glicurônico.

Na determinação do cortisol do plasma, a extração é realizada por meio de solventes orgânicos. Ambas as frações – a livre propriamente dita e a ligada à proteína – são extraídas como tal, de sorte que a concentração determinada indica a quantidade total do cortisol quimicamente não alterado. Infere-se que a determinação do esteróide plasmático não representa a concentração do cortisol farmacologicamente ativo, que é dada pela fração livre propriamente dita⁽³³⁾.

Após a degradação do esteróide, particularmente pelo fígado, os metabólitos do cortisol, os dehidro e principalmente os tetrahidroderivados, que estão conjugados, especialmente com o ácido glicurônico, entram na circulação periférica. Não sendo extraídos diretamente do plasma pelos solventes orgânicos usualmente empregados, não podem ser medidos, a menos que se proceda a hidrólise prévia com a glicuronidase. Correspondem aos hormônios ditos conjugados, existentes no plasma. Em relação ao cortisol, suas quantidades são aproximadamente iguais aos do assim chamado cortisol livre ou não-conjugado (livre = $11,3 \pm 6,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$; conjugado = $13,7 \pm 1,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$)⁽⁴⁶⁾.

Por ocorrer variação nictemeral dos níveis de cortisol⁽³³⁾, durante o período de 24 horas, em indivíduos normais, as concentrações mais baixas são encontradas entre meia noite e quatro horas da madrugada, seguida por uma elevação rápida, atingindo o acme entre seis e oito horas da manhã. A seguir, até meia noite os níveis plasmáticos seguem valor descendente, havendo queda mais rápida nas primeiras horas após o pico^(5,27,30). Nessas condições, torna-se necessária a indicação do horário da coleta do sangue.

Sabe-se que os hormônios esteróides permanecem na circulação durante tempo relativamente curto. Segundo Peterson⁽³²⁾, a meia vida do cortisol circulante situa-se em torno de 85 minutos.

A concentração dos esteróides no plasma representa, portanto, um balanço entre a produção e a sua degradação, tornando-se assim importante o conhecimento de que, a medida do nível plasmático de um hormônio esteróide reflete a situação em determinado momento e não representa necessariamente os níveis existentes algumas horas depois. Por outro lado, a estimativa dos metabólitos urinários, indica geralmente a situação presente em longo período que é, o que o clínico deseja com freqüência⁽¹¹⁾.

Em determinadas condições patológicas, os níveis urinários dos metabólitos são mais elevados ou reduzidos, independentemente do paciente apresentar sinais clínicos de hiper ou hipofunção da córtex para o hormônio correspondente, já que o nível circulante é normal. São condições em que a degradação do hormônio está aumentada ou diminuída e, a hiper ou hipofunção é apenas homeostática, para a manutenção de níveis normais dos hormônios circulantes.

Essas discrepâncias ocorrem em algumas condições patológicas ou após o uso de certas drogas que podem afetar ou não a função pituitário-adrenal e mesmo assim de maneira indireta. O conhecimento de tais situações é muito importante para se evitar interpretação errônea das dosagens laboratoriais⁽⁴⁵⁾.

O cortisol (Figura 1) é um composto de 21 átomos de carbono, com a estrutura do ciclopentanoperidrofenantreno, apresentando algumas características comuns a todos os esteróides ativos da córtex: grupo cetônico na posição 3 e uma dupla ligação entre C-4 e C-5 (grupo 3-ceto- Δ^4 -3) e uma cadeia lateral ligada ao C-17 do anel D, que é a 17,21-dihidroxi-20-cetona (-COH CO CH₂ OH) – acionamento "Porter Silber". Essas características são essenciais para atividade normal⁽¹¹⁾.

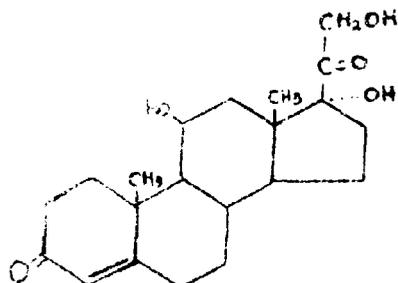


Figura 1 — Estrutura química do cortisol (hidrocortisona, ou composto F) — 4-pregнено-17 α , 11 β , 21-triol-3,20-diona.

A determinação do cortisol no plasma requer método de identificação muito sensível, devido à sua pequena concentração e também à limitada disponibilidade do volume do plasma.

Existem métodos de determinação dos corticosteróides, extraídos dos diversos fluidos biológicos já foram desenvolvidos e podem ser agrupados como se indica a seguir.

- a) Medida da absorção na luz a 240 nm, típico para os esteróides que possuem sistemas cetônicos α, β insaturados.
- b) Medida da fluorescência, produzida em presença de álcali^(1,10) ou de ácido^(23,42). É característica dos esteróides que possuem sistemas α, β insaturados e hidroxila no C-11.

A ocorrência da fluorescência de certos esteróides em meio contendo ácido sulfúrico, foi observada em 1936 por Wintersteiner e Pfiffner⁽⁹⁾ e, também por Reichstein e Shoppe⁽²²⁾ em 1943. Baseados nessa propriedade, muitos autores como Sweat^(43,44), Lewis⁽³²⁾, Hale⁽¹⁷⁾, Braunsberg & James⁽⁹⁾ e Rongone⁽³⁷⁾, desenvolveram métodos para a determinação do cortisol e da corticosterona do plasma, empregando preliminarmente uma separação cuidadosa dos esteróides através da cromatografia em coluna⁽⁴⁴⁾ ou em papel^(17,24) ou de partição⁽⁹⁾, uma vez que a fluorescência, embora muito sensível, apresenta-se pouco específica.

c) Colorimetria

Em 1952, Mader e Buck⁽²⁵⁾, elaboraram um método colorimétrico de determinação do cortisol e da corticosterona, empregando o sal de tetrazólio. A redução deste sal se dá com os esteróides que apresentam na sua estrutura um grupo cetol (-CO-CH₂OH) ligado ao C-17 do anel D, formando uma substância colorida e insolúvel denominada formazona. É um método pouco aplicável, porque necessita sucessivas purificações dos esteróides, através da cromatografia.

Em 1950, Porter e Silber⁽³⁵⁾, desenvolveram métodos de determinação quantitativa dos 17-hidroxioorticosteróides, empregando a reação da fenilhidrazina em ácido sulfúrico concentrado (reagente de Porter-Silber) com a carbonila em um dos radicais ligados ao esteróide. É uma reação específica dos esteróides que apresentam na sua estrutura, radical 11, 17-dihidroxi-20-cetona ligado ao C-17 do anel D (Figura 1)⁽²²⁾ e estes compostos são conhecidos como "cromogênios" de Porter-Silber. O produto formado apresenta pico de absorção máxima a 410 nm. Este mesmo método foi modificado

pelos próprios autores em 1954⁽⁴¹⁾ e Peterson e col. em 1957⁽³⁴⁾, simplificando-o, e tornando-o adequado para uso em rotina clínica. O reagente de Porter-Silber apesar de ser sensível não é muito específico. Devemos ter sempre em mente que no extrato plasmático usado existem, além do cortisol livre, outras substâncias que interferem com a cor em presença desse reagente. Para se ter uma determinação específica deve-se purificar e separar o cortisol do extrato, empregando métodos cromatográficos. Muitos autores empregaram esse método para a determinação do cortisol no plasma^(5,8,13,14,22,26,29,34,39,44,47).

Em 1954, Morris e Williams⁽²⁸⁾ empregaram a cromatografia para a separação do cortisol do extrato plasmático e, aplicaram o método de polarografia aos derivados da hidrazona obtidos pelo reagente de Girard. Devido à sua complexidade técnica esse método não foi amplamente utilizado.

d) Oxidação da cadeia lateral ligada ao C-17 do anel D, empregando bismutato de sódio ou ácido periódico, transformando o cortisol em 17-cetoesteróide. Para a medida do produto formado pode-se empregar métodos de cromatografia a gás, desenvolvidos por Bailey⁽²⁾ ou as reações indicadas para os 17-cetoesteróides⁽¹⁹⁾.

e) Métodos radioisotópicos

São métodos precisos e sensíveis para a determinação dos esteróides do plasma. Podemos referir três, aplicáveis ao problema.

1) Adição de determinada quantidade do radioisótopo à amostra, fazendo-se a medida da atividade da fração final submetida à análise química. Por este método conseguem-se corrigir todas as perdas ocorridas durante a análise, não se necessitando de cuidados extremos durante a manipulação o que resulta em economia de tempo. Obtém-se grande precisão quando a quantidade do radioisótopo empregado for suficientemente pequena, de modo a não alterar a concentração do esteróide plasmático.

Foi aplicado por Bondy e col.^(6,7) e Peterson⁽³¹⁾.

2) Reação dos esteróides com o reagente marcado. É preciso utilizar uma reação quantitativa e específica e o produto formado ser quimicamente estável. Mede-se a radioatividade do produto após várias purificações. Esse método foi utilizado por Berliner⁽³⁾, Hollander e Vinecour⁽¹⁸⁾.

3) Dupla marcação isotópica. Adiciona-se uma quantidade traço do esteróide marcado ao extrato plasmático, este por sua vez, tratado com reagente radioativo. Foi aplicado por Avivi e col.⁽⁹⁾ empregando ^{14}C e ^3H e Bojensen⁽⁹⁾ empregando ^{131}I e ^{35}S .

Tendo em vista a importância de se conhecer a taxa de cortisol no plasma de indivíduos normais e a possibilidade de contar-se com métodos radioisotópicos, de grande precisão e sensibilidade, para a determinação do mesmo, procurou-se desenvolver, com base nos métodos referidos na literatura, uma técnica combinada de determinação de cortisol plasmático.

Para tanto, à amostra em análise, adicionou-se cortisol marcado com ^3H (trício) que, como traçador, deveria permitir a determinação da taxa de recuperação do cortisol.

A extração dos esteróides do plasma foi realizada por meio de diclorometano purificado e o extrato obtido, aplicado quantitativamente em cromatoplaça.

A partir da cromatografia, as frações foram eluídas e analisadas colorimetricamente, utilizando-se o reagente de Porter-Silber⁽³⁵⁾, bem como, determinada sua radioatividade, através da cintilação líquida.

De posse dos resultados encontrados, procurou-se discutí-los com base naqueles relatados pela literatura, para afirmar-se de sua validade.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODO

1 – Material Biológico

1.1 – Coleta de Material

O sargue foi coletado de indivíduos normais e em jejum às 8 horas da manhã. Os doadores foram pacientes da 1ª Clínica Médica (Serviço do Prof. A. B. Uihôa Cintra) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP; os médicos da Unidade de Diabetes e Suprarenal da 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP; os doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da FMUSP; os colegas e voluntários do Instituto de Energia Atômica.

Foram coletados volumes de mais ou menos 50 ml de sangue em tubos heparinizados. Esses tubos foram centrifugados logo após a coleta e o plasma obtido foi guardado em congelador a -20°C , até o momento do uso, a fim de evitar a destruição dos esteróides presentes.

2 – Reagentes

2.1 – Reagentes Empregados na Extração do Cortisol e na Purificação dos Solventes:

- Diclorometano p.a.
- Ácido sulfúrico concentrado p.a. (Merck)
- Cloridrato de fenilhidrazina p.a. (Merck)
- Sulfato de sódio anidro p.a.
- Etanol p.a.
- Cloridrato de m-fenilenodiamina p.a. (Merck)
- Hidróxido de sódio p.a. (Merck)

2.2 – Reagentes Empregados na Cromatografia em Camada Delgada:

- Sílica gel GF₂₅₄ (Merck)
- Clorofórmio p.a. (Merck)
- Etanol p.a.
- Metanol p.a.
- Padrão de cortisol (F) – Sigma Chemical Company – St. Louis, Mo., USA

2.3 – Reagentes Empregados na Colorimetria:

- Cloridrato de fenilhidrazina recristalizado em álcool e guardado em dessecador com CaCl_2 . PF = $240 - 243^{\circ}\text{C}$
- Reagente "Branco" – 2 partes de H_2SO_4 64% para 1 parte de etanol bidestilado
- Reagente de "Porter-Silber" – 1 mg de cloridrato de fenilhidrazina para 1 ml de reagente "Branco"
- Solução padrão de cortisol – 5 mg de F em 50 ml de etanol bidestilado (solução estoque)
- Solução padrão de trabalho – 0,4 ml da solução estoque diluída com água destilada para 200 ml. Esta solução corresponde a $0,2 \mu\text{g}$ por ml de cortisol

2.4 – Reagentes Empregados na Determinação da Radioatividade:

- Solução cintiladora⁽³⁶⁾: PPO = (2,5-difeniloxazol) 4 g
- POPOP = p-bis 2-(5-feniloxazolil) benzeno 50 mg
- tolueno q.s.p. 1000 ml
- Solução etanólica de cortisol-1,2-³H purificado

3 – Purificação dos Reagentes

3.1 – Purificação do Cortisol-1,2-³H

O cortisol-1,2-³H (Schwartz Biresearch Inc., New York), em virtude da degradação durante a sua estocagem, foi purificado previamente por cromatografia em camada delgada, usando sílica-gel GF₂₅₄ e desenvolvido no sistema de clorofórmio: etanol (87:13 v/v). A região correspondente à mancha do cortisol foi isolada e extraída com etanol bidestilado e o extrato concentrado a um volume cuja atividade final foi aproximadamente de 1 µCi/ml.

3.2 – Purificação dos Solventes

Os solventes p.a. foram purificados e testados com o cloridrato de fenilhidrazina (integrante do reagente de Porter-Silber), para remover as substâncias cromogênicas, Porter-Silber positivas, que existem nos solventes, a fim de não interferirem na posterior colorimetria (coloração amarela-hidrazona).

O diclorometano p.a. é tratado com ácido sulfúrico concentrado. Repete-se esta operação até que a camada sulfúrica não apresente coloração amarela com o cloridrato de fenilhidrazina. Lava-se com água destilada, trata-se com o sulfato de sódio anidro, filtra-se e destila-se. Utiliza-se o terço médio. (ponto de ebulição = 40,1°C).

O etanol p.a. é levado à refluxo com cloridrato de m-fenilenodiamina, durante 4 horas. Destila-se. Trata-se o destilado com sulfato de sódio anidro, filtra-se e redestila-se. Utiliza-se o terço médio que não deve desenvolver cor na presença do cloridrato de fenilhidrazina mais ácido sulfúrico.

4 – Extração do Cortisol

Um volume do plasma com adição de cortisol-1,2-³H purificado, de 250.000 a 300.000 dpm, foi extraído com 5 volumes de diclorometano purificado, com agitação constante durante 15 a 20 segundos. Os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 1500 a 2000 rpm, para quebrar a emulsão. Após a remoção total do plasma, por aspiração, juntou-se 1/2 volume de NaOH 0,1 N e agitou-se vigorosamente durante 15 a 20 segundos. Os tubos foram novamente centrifugados durante 15 minutos a 1500 a 2000 rpm para quebrar a nova emulsão que se desenvolveu. Removeu-se imediatamente a camada alcalina sobrenadante, por aspiração. O extrato foi evaporado à secura, sob corrente de ar e aquecimento a 45°C. O extrato seco, retomado com 1 volume de etanol bidestilado foi transferido quantitativamente para um tubo de ensaio de capacidade de 10 ml, e levado à secura sob corrente de ar e aquecimento, sendo novamente retomado com pequeno volume de etanol bidestilado. O extrato etanólico assim obtido foi aplicado quantitativamente na cromatoplaça.

5 – Cromatografia em Camada Delgada

Placas de vidro de 20 x 20 cm, de espessura uniforme, foram colocadas num suporte especial de

plástico. Uma pasta fina formada pela sílica gel GF₂₅₄ e água, na proporção 1:2 (p/v), foi preparada num recipiente de vidro com tampa, por meio de uma forte agitação. Essa pasta foi imediatamente transferida para o aplicador Desaga (Applicator Model S-II: Desaga/Brinckmann), de maneira que o filme de sílica gel apresente espessura uniforme. As placas foram deixadas em repouso a fim de se solidificarem ao ar livre e depois levadas à estufa a 110°C durante 1 hora para serem ativadas. Após a ativação ficaram estocadas no dessecador a vácuo, com CaCl₂, até o momento do uso. Os extratos etanólicos obtidos foram aplicados quantitativamente nas cromatoplas, a 1,5 cm da extremidade inferior, sendo colocado paralelamente padrão de cortisol (2 a 5 µg), servindo de guia para a localização das manchas. As cromatoplas assim preparadas foram levadas às cubas de desenvolvimento (8 1/2 x 4 1/2 x 8 1/2 polegadas), contendo a fase móvel constituída de clorofórmio:metanol (87:13 v/v). As cubas são providas de papel de filtro, colocado convenientemente a fim de proporcionar uma saturação uniforme do ambiente. O tempo de desenvolvimento foi de 45 a 50 minutos, sendo a distância percorrida pelo solvente (da origem ao frente) de 15 cm. Após o desenvolvimento, as placas foram retiradas da cuba e secadas sob fluxo de ar quente, sendo depois reveladas à luz ultravioleta (UV). As regiões correspondentes às manchas do cortisol foram demarcadas e coletadas através de um coletor a vácuo, provido de filtro de placa porosa. O material contendo o cortisol foi eluído com 5 ml de etanol, por 3 vezes, sendo posteriormente levado à secura sob corrente de ar e aquecimento a 40°C. O extrato seco foi dissolvido em 5 ml de diclorometano purificado e alíquotas foram utilizadas para a determinação da massa através da colorimetria e para a medida da radioatividade, por meio do cintilador líquido.

6 – Colorimetria

6.1 – Técnica

Alíquotas de 4 ml foram destinadas à colorimetria e divididas em duas partes iguais, sendo transferidas para tubos de ensaio de fundo cônico, com tampa de esmeril, de capacidade de 15 ml. Em um dos tubos, adicionou-se 0,2 ml do reagente de Porter-Silber⁽³⁵⁾ e, no outro, igual volume de reagente branco. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 a 20 segundos e a seguir deixados em repouso por 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a fim de permitir separação da fase de diclorometano, que fica no sobrenadante, sendo a seguir removida por aspiração. O remanescente nos tubos, contendo o cortisol, foi deixado em repouso à temperatura ambiente, por 18 horas, ao abrigo da luz, para desenvolvimento da cor.

6.2 – Curva Padrão

Paralelamente à extração pelo diclorometano é preparada uma série de diluições da solução-padrão de trabalho do cortisol (F), para se obter uma curva padrão. As diluições da solução-padrão foram transferidas para tubos de ensaio de capacidade de 50 ml, providos de tampa de esmeril. Os padrões foram extraídos com 25 ml de diclorometano purificado, sob agitação vigorosa, durante 15 a 20 segundos, sendo a camada aquosa removida por aspiração. Adicionou-se 2 ml de NaOH 0,1 N e agitou-se vigorosamente durante 15 a 20 segundos, sendo a camada alcalina removida por aspiração. O extrato de diclorometano contendo o padrão de cortisol foi dividido em duas alíquotas de igual volume, que foram transferidas para tubos de ensaio de fundo cônico de capacidade de 15 ml. Para um dos tubos, foi adicionado 0,2 ml do reagente branco e para o outro, o mesmo volume do reagente de Porter-Silber. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 a 20 segundos, deixados em repouso cerca de 30 minutos, sendo depois centrifugados durante 10 minutos a 1.500 a 2.000 rpm. A camada de diclorometano foi removida por aspiração. A solução que remanesce nos tubos, foi deixada em repouso à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, de 16 a 18 horas, para desenvolvimento da cor.

Foi corrido durante todo o processo um testemunho em que o padrão de cortisol foi substituído por 5 ml de água destilada.

A leitura da intensidade da cor foi feita no colorímetro "Spectronic 20" da Bausch e Lomb, em microcubetas de capacidade de 0,3 ml. O comprimento de onda foi de 410 nm, onde o cortisol apresenta pico de absorção máxima.

Para obter-se a curva padrão de cortisol (Figura 3), foram utilizadas as concentrações indicadas na Tabela I, onde estão mostradas também, as absorbâncias medidas a 410 nm.

A montagem da curva padrão, através da determinação colorimétrica do cortisol pela técnica de Porter-Silber é feita da seguinte maneira. As concentrações do cortisol padrão empregadas, variaram de 0,1 µg a 0,8 µg, e para cada concentração foram realizadas, paralelamente, reações com o reagente de Porter-Silber (cloridrato de fenilhidrazina + ácido sulfúrico 64% + álcool etílico) e com o reagente branco (ácido sulfúrico 64% + álcool etílico), de acordo com a técnica descrita anteriormente na pág. 7 e as respectivas absorbâncias foram determinadas. O tratamento realizado com o reagente branco, consistiu em verificar se estão presentes tanto na solução padrão de trabalho, como no extrato plasmático (apesar de purificado e cromatografado), substâncias que reagem com o ácido sulfúrico dando coloração.

Chamando de padrão A a uma das concentrações utilizadas, temos:

- 1) padrão A + reagente de Porter-Silber
- 2) padrão A + reagente branco

Determinaram-se as absorbâncias; tendo, portanto, para o primeiro, o valor de absorbância igual a a e para o segundo, o valor de b.

O testemunho (onde foi utilizada água destilada no lugar de cortisol) foi também tratado, paralelamente, com o reagente de Porter-Silber e com o reagente branco, e as respectivas absorbâncias determinadas.

Chamando de testemunho A, temos:

- 1) testemunho A + reagente de Porter-Silber = d (absorbância determinada)
 - 2) testemunho A + reagente branco = e (absorbância determinada)
- $$a - b = c$$
- $$d - e = f$$
- $$c - f = \underline{g} - \text{absorbância corrigida do padrão}$$

Empregando-se essa correção para as absorbâncias de todas as concentrações do cortisol padrão, construiu-se a curva padrão (Figura 3), utilizando-se o método dos mínimos quadrados.

Para obter-se a massa do cortisol plasmático, procedeu-se da seguinte maneira.

Chamando-se de Amostra A a um dos extratos plasmáticos temos:

- 1) Amostra A + reagente de Porter-Silber
- 2) Amostra A + reagente branco

Determinaram-se as respectivas absorbâncias; tendo para o primeiro, a absorbância igual a h e para o segundo, i.

$$h - i = j$$

$j = f + k$ = absorvância corrigida do cortisol plasmático.

Pelo valor da absorvância k obtida e através da curva padrão, tem-se a quantidade de cortisol plasmático (L), dado em microgramas.

7 Medida da Radioatividade

As alíquotas de cortisol- $1,2$ ^3H purificado e dos extratos plasmáticos, foram colocadas em frascos de vidro especial* de 20 ml de capacidade. Adicionou-se a seguir, a solução emulsificadora, até completar o volume a 15 ml, o qual fornece melhor eficiência no processo da determinação da radioatividade.

Esses frascos foram acondicionados à baixa temperatura (aproximadamente 0°C) e ao abrigo da luz, durante intervalo de uma hora, a fim de evitar as cintilações luminosas, provenientes da eventual quimiluminescência e fosforescência. A seguir, iniciou-se a determinação da radioatividade, utilizando-se a técnica de cintilador líquido (Liquid Scintillation System 725, Nuclear Chicago Corporation), adequada para a detecção de partículas β , de baixa energia.

Os raios cósmicos, o efeito termoiônico na fotomultiplicadora e outros fatores, dão origem a um nível constante de contagem (radiação de fundo - BG), que é independente da amostra radioativa. A determinação da radiação de fundo é feita, empregando-se amostras com as mesmas características físico-químicas, das que serão analisadas posteriormente. Assim, $0,1 \mu\text{g}$ de cortisol em solução de diclorometano ($0,1 \mu\text{g/ml}$) foi colocado no frasco de contagem completando-se o volume a 15 ml com a solução cintiladora.

Conhecendo-se o ritmo constante da radiação de fundo, utilizou-se a unidade Auto Subtract TM III (3 channel background subtract module - Nuclear Chicago Corporation, cat. nº 8 723), acoplada ao sistema de contagem a fim de subtrair automaticamente a contagem da radiação de fundo.

A eficiência das contagens das amostras foi determinada através do método de razão de canais⁽⁴⁹⁾ e as contagens foram acumuladas durante um intervalo de tempo, suficiente para garantir um erro estatístico menor que 1%.

Com os dados obtidos da radioatividade, calculou-se a taxa de recuperação do cortisol, através das seguintes relações:

$$\text{Atividade da amostra (dpm)} = \frac{\text{Contagem da amostra (cpm)}}{\text{Eficiência}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{\text{Atividade da amostra (dpm)}}{\text{Atividade do padrão (dpm)}} \times 100 \quad (2)$$

Com o valor do cortisol plasmático (" L ") obtido através da colorimetria, fez-se a correção das perdas pela seguinte relação:

$$\mu\text{g cortisol} = \frac{L'' (\mu\text{g})}{\text{Taxa de recuperação}} \times \text{volume do plasma empregado} \times 100 \quad (3)$$

* Frasco de vidro especial - Nuclear Chicago Corporation.

A Figura 2 representa, de modo esquemático as etapas seguidas para a execução do método.

O cortisol do plasma de alguns pacientes, foi também avaliado, através do método dos 17-hidroxicorticosteróides plasmáticos não conjugados, relatados por Peterson e col.⁽³⁴⁾.

Construiu-se a curva padrão, empregando-se as concentrações do cortisol e as correspondentes absorvâncias dadas na Tabela I. A curva foi traçada utilizando-se o métodos dos mínimos quadrados.

Tabela I
Concentrações do Cortisol Empregadas na Colorimetria
e as Respectivas Absorvâncias

Tubos nº	Cortisol (μ g)	Absorvância a 410 nm
1	0,1	0,028
2	0,2	0,058
3	0,4	0,107
4	0,5	0,132
5	0,6	0,162
6	0,8	0,218

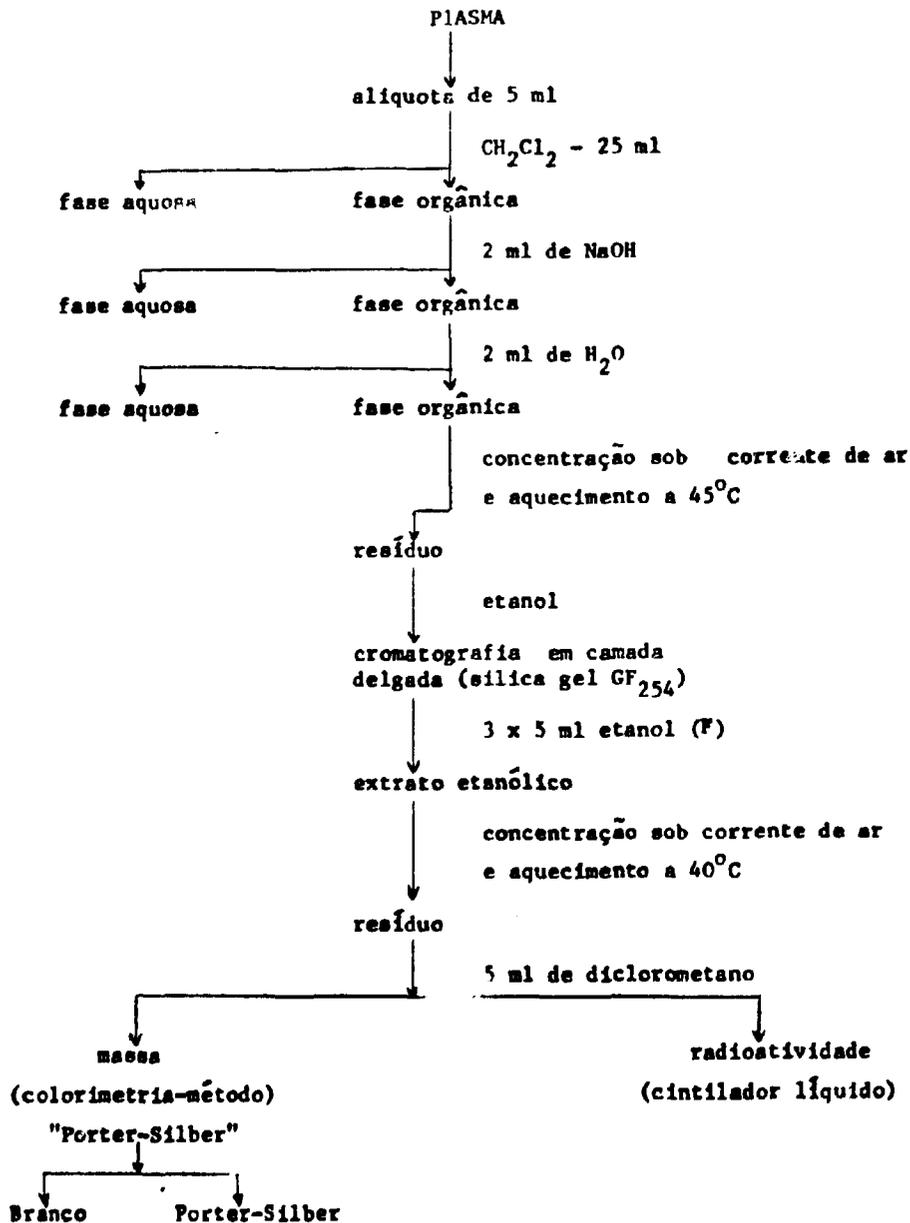


Figura 2 - Representação esquemática do processo de extração, purificação e doseamento do cortisol livre no plasma.

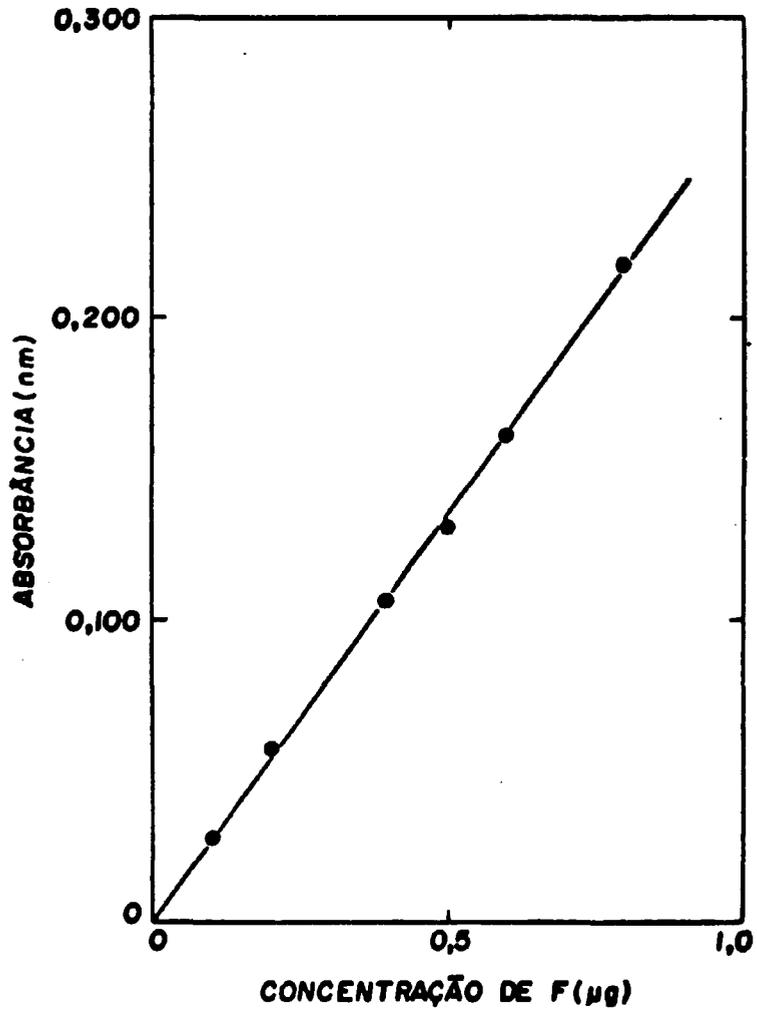


Figura 3 - Curva Padrão de Cortisol

CAPÍTULO III

RESULTADOS

1 – Valor de Rf

Os valores de Rf x 100, para o padrão de cortisol, obtidos através da cromatografia em camada delgada, nas condições já indicadas, estão na Tabela II. O valor médio encontrado foi de $55,33 \pm 8,46\%$.

Tabela II

Valores de Rf x 100 para o Padrão de Cortisol no Sistema de Desenvolvimento, Clorofórmio-Metanol (87:13 v/v)

Indivíduos normais	Rf x 100
E B	56,60
N Z K	46,60
E M	73,30
O U	56,60
A B S	56,60
G S	46,60
B S	70,00
A M N	53,50
A S	53,30
J G S	56,60
J S C	56,60
J B F	46,60
J P P	46,60
Média	53,33
s ²	8,46

2 – Concentração Plasmática do Cortisol em Indivíduos Normais

Os níveis de cortisol plasmático, obtidos através da cromatoplaça a partir da região correspondente à mancha do cortisol, não corrigidos pelas perdas, estão na Tabela III, coluna A. O valor médio encontrado de $6,87 \mu\text{g} \pm 3,75\%$.

Os valores da taxa de recuperação obtidos em cada análise acham-se na Tabela III, coluna B. O valor médio encontrado foi de $53,62\% \pm 15,67\%$.

Os valores de cortisol corrigidos pelas perdas, obtidas através da diluição isotópica, acham-se na Tabela III, coluna C. O valor médio encontrado foi de $14,02 \mu\text{g} \pm 5,79\%$.

(*) Todos os desvios mencionados referem-se ao desvio padrão⁽⁴⁾.

Tabela III
Valores de Cortisol Plasmático em Indivíduos Normais*

PACIENTES				A	B	C
Casos nº	Iniciais	Sexo	Idade	Cortisol (F) Plasmático não corrigido ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Taxa de Recuperação do cortisol radioativo (%)	Cortisol (F) plasmático corrigido ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
1	EB	F	25	2,25	45,56	4,70
2	NZK	M	31	7,66	50,08	15,30
3	EM	F	32	3,25	37,13	8,80
4	OU	M	—	8,72	62,25	14,01
5	ABS	M	36	14,20	70,37	20,08
6	GS	M	40	8,50	72,10	14,04
7	BS	M	—	4,40	57,73	14,81
8	AMM	M	49	4,38	38,04	20,03
9	AS	M	38	10,00	71,27	14,00
10	JGS	M	21	3,24	75,58	4,30
11	JSC	M	19	8,18	44,36	18,40
12	JBF	M	49	11,50	41,90	25,35
13	JPP	M	—	3,00	28,75	10,44
Média				6,87	53,62	14,02
Desvio-Padrão				$\pm 3,75$	$\pm 15,57$	$\pm 5,79$

* São mostrados os valores de cortisol plasmático obtidos pelo método de diluição isotópica. Na coluna A encontram os valores de cortisol não corrigidos pelas perdas durante a dosagem (μg por 100 ml do plasma); na coluna B, os valores da taxa de recuperação obtidos pelas relações 1 e 2 de pág. 16 (em %) e na coluna C, os valores do cortisol plasmático corrigido pelas perdas (μg por 100 ml do plasma).

3 — Comparação do Nível de Cortisol Plasmático, Determinado pelo Método de Diluição Isotópica e pelo de Peterson e col.⁽³⁴⁾

Na Tabela IV, acham-se os valores de cortisol plasmático, obtidos pelos métodos de Peterson e col. e de diluição isotópica.

O valor médio obtido pelo primeiro método foi de $18,55 \mu\text{g} \pm 5,11^{\circ}$ sendo que o segundo forneceu o valor médio de $14,42 \mu\text{g} \pm 3,26^{\circ}$. Aplicando-se o teste "t" de Student⁽⁴⁾, verificou-se que, para o nível de 1%, as médias não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

(*) Todos os desvios mencionados referem-se ao desvio padrão⁽⁴⁾.

Tabela IV

Taxa de Cortisol Plasmático de Indivíduos Normais Obtidos Simultaneamente, Através dos Métodos de Peterson e col.⁽¹³⁴⁾ e por Diluição Isotópica

Indivíduos normais	CORTISOL – $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	
	Peterson e col. ⁽¹¹⁷⁾	Diluição isotópica
BS	13,50	14,85
AS	16,40	14,00
JSC	18,80	18,40
JPP	18,80	10,44
Médias	18,55	14,42
s [°]	$\pm 5,11$	$\pm 3,26$

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

A finalidade do presente trabalho foi padronizar um método de determinação do cortisol no plasma, empregando a técnica de diluição isotópica: a extração do cortisol livre de determinado volume de plasma já adicionado de um "traçador" (cortisol-1,2-³H).

O sangue foi coletado de indivíduos normais, em jejum, sempre às horas da manhã, devido às variações nictemerais, sendo o sangue centrifugado logo após a coleta e o plasma imediatamente separado e mantido a -20°C. Essa providência, segundo Jayle⁽²⁰⁾, tem por objetivo evitar tanto quanto possível, adsorção de esteróides às hemácias.

O diclorometano foi escolhido como solvente de extração, por apresentar inúmeras vantagens^(12,20). É bastante estável, não necessitando de purificações frequentes⁽¹²⁾; sendo mais denso do que a água, a eliminação da camada aquosa após a extração, pode ser feita por simples aspiração, evitando assim o uso de funis de separação; não é miscível com o reagente de Porter-Silber; apresenta coeficiente de distribuição $K = 0,14$, no sistema água/diclorometano, sendo que a taxa de extração do cortisol, empregando 5 volumes do solvente, é de cerca de 98%⁽³⁴⁾.

A solução de diclorometano, contendo o cortisol, foi lavada com solução alcalina a fim de remover os estrógenos, as substâncias fenólicas e as ácidas presentes. Essa lavagem deve ser feita rapidamente, porque os esteróides são susceptíveis de degradação em meio alcalino⁽¹²⁾.

Alguns autores determinaram os 17-hidroxicorticosteróides do plasma sem prévia separação dos esteróides presentes^(5,14,29,34,35,40,44,47,48), ao passo que os outros fizeram a separação, empregando ou cromatografia em coluna de adsorção^(17,44), ou de partição^(9,28), ou em papel^(3,9,18,22,24,31) ou, ainda em camada delgada⁽²⁾. Foi empregada cromatografia em camada delgada, por apresentar tempo de desenvolvimento mais rápido e pela facilidade de remoção da área, da cromatoplaça, correspondente à do cortisol.

Pela Tabela II, verifica-se variação nos valores de $R_f \times 100$ do cortisol-padrão. Entretanto, esse fato não impede a detecção do esteróide, tendo em vista que, juntamente com o plasma, desenvolvem-se um ou mais padrões de cortisol, como referência.

Para a determinação do cortisol foi utilizado o método colorimétrico de Porter-Silber⁽³⁵⁾, modificado por Peterson e col.⁽³⁴⁾, cuja eficiência para a extração do cortisol do extrato de diclorometano, é da ordem de 90 a 98%.

Pela figura 4, obtida de cromatoplaça empregada para a purificação do cortisol-1,2-³H, verifica-se que ocorre perda do isótopo na cromatoplaça fato que, segundo Gold e col.⁽¹⁶⁾, ocorre com a maioria dos esteróides marcados com o trício. Esse efeito pode ser significativo sem se levar em consideração as perdas ocorridas ao longo da cromatoplaça. Devido a isso, após a remoção da região da mancha correspondente ao cortisol da cromatoplaça, devem-se remover as outras regiões remanescentes, também percorridas pelo extrato medindo-se a sua atividade. Esta representa as perdas ocorridas na cromatoplaça e devem ser somadas àquelas correspondentes às atividades obtidas com a recuperação.

Com a finalidade de comparação, realizou-se a determinação do cortisol no plasma de alguns indivíduos normais, empregando-se o método desenvolvido neste trabalho em comparações com o de Peterson e col.⁽³⁴⁾. Os valores obtidos pelo método de Peterson e col., embora mais elevados que os obtidos nesse trabalho, não foram significativamente diferentes ao nível de 1%, mostrando, portanto, que esses dois métodos se equivalem, como aliás já observavam Peterson e col. em 1957⁽³⁴⁾. Entretanto, os dois métodos não são sempre comparáveis. Com efeito, como se poderá observar na Tabela V, variando-se o volume da amostra de plasma, no mesmo indivíduo, nota-se que com maior volume (5 ml),

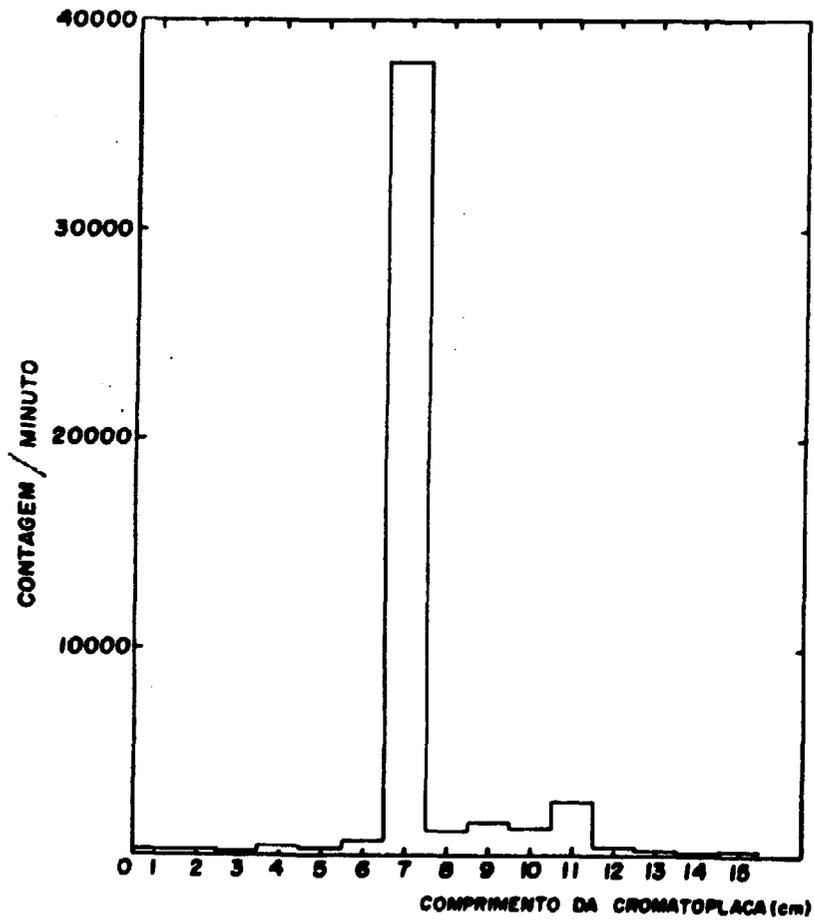


Figura 4 - Cromatoplate de Cortisol - 1, 2-³H.

Empregando a sílica gel GF₂₅₄ e a fase móvel: Clorofórmio: metanol (87:13 v/v); e as frações foram contadas no cintilador líquido.

obtiveram-se resultados discrepantes entre as duas técnicas. Já com o método da diluição isotópica, os resultados obtidos foram praticamente iguais com a redução de volume até 3 ml. Entretanto, com 2 ml, o valor se aproxima do obtido com a técnica de Peterson e col. Nas primeiras determinações (5,4 e 3 ml de plasma) pela diluição isotópica, foram localizadas na cromatoplaça, à luz ultravioleta, outras manchas que não às correspondentes a do cortisol, facilitando desta maneira a remoção do esteróide, auxiliado, ainda, pelo Rf do cortisol padrão. Com a redução do volume de plasma (2 ml), as manchas dificilmente podem ser vistas à luz ultravioleta, o que dificulta a demarcação do cortisol; a remoção deste é feita, então, por comparação com o padrão, exclusivamente, o que acarreta a determinação de valores mais elevados, dada a existência de possíveis substâncias cromogênicas, removidas com o esteróide.

Devido a esse fato o método de Peterson e col., bastante sensível e prático, é válido e comparável à técnica desenvolvida nesse trabalho, apenas quando não existem substâncias interferentes, Porter e Silber positivas, na dosagem do cortisol. Portanto, a separação do cortisol do extrato plasmático, através da cromatografia em camada delgada, constitui um eficiente processo para a especificidade da medida do cortisol.

A grande vantagem da diluição isotópica é a possibilidade de correção das perdas ocorridas durante todo o processo analítico, não havendo, pois, necessidade de cuidados especiais em relação às perdas durante o processo.

A média dos valores de cortisol obtido através do presente método foi de $14,02 \mu\text{g} \pm 5,79$ (Tabela III). É interessante comparar esses resultados com aqueles da literatura, cujos autores utilizaram a separação cromatográfica do cortisol (Tabela VI). Observa-se que pelos trabalhos em que houve o emprego do traçador radioativo para a correção das perdas^(3,6,7,9), similar ao nosso, a média que obtivemos foi mais alta que a dos autores citados, embora absolutamente comparável àquela apresentada por Peterson e col.⁽³⁴⁾, revelando pois, que o cortisol plasmático determinado pela fenilhidrazina e pela diluição isotópica dão resultados bastante comparáveis, à semelhança dos que também obtivemos.

Em relação aos métodos não radioativos, colorimétricos e fluorimétricos, os resultados por nós encontrados são, ainda, mais altos, embora comparáveis. (Tabela VI)

Finalmente na Tabela VII, podem ser apreciadas a média dos valores por nós obtidos, de 13 doentes normais, através da técnica de diluição isotópica e a média dos valores obtidos por Peterson e col.⁽³⁴⁾. Como se vê, os resultados são perfeitamente comparáveis.

Tabela V

Comparação dos Valores Obtidos com Volumes
Decrescentes de plasma

plasma (ml)	cortisol plasmático ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)
5	10,44* 18,80**
4	9,92*
3	9,63*
2	18,40*

- * - Técnica de diluição isotópica.
- ** - Método de Peterson e col.⁽³⁴⁾.
- Reação de Porter-Silber.

Tabela VI

Métodos para a Determinação do Cortisol, no Plasma Humano de Indivíduos Normais

Autores	Solventes empregados na extração	Separação	Deteccção	Cortisol plasmático ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
Morris e Williams ⁽²⁸⁾ (1953)	Etanol	cromatografia de partição em celite	Polarografia	8,4 \pm 1,5
Sweat ⁽⁴⁴⁾ (1955)	Clorofórmio	cromatografia em sílica gel	Fluorescência	10,8 \pm 2,6
Lewis ⁽²⁴⁾ (1957)	Acetato de Etila	cromatografia em papel	Fluorescência	9,2 \pm 1,5
Hale e col ⁽¹⁷⁾ (1958)	Clorofórmio	cromatografia em papel	Fluorescência	11,3 \pm 0,45
Jenkin ⁽²²⁾ (1960)	Tetracloroeto de carbono	cromatografia em papel	Porter-Silber	13,0 \pm 6,0
Bojesen ⁽⁹⁾ (1956)	Clorofórmio	cromatografia em papel	Radioatividade	13,3
Bondy e Upton ⁽⁷⁾ (1957)	Clorofórmio	cromatografia em papel	Radioatividade e fluorescência	10,2 \pm 3,6
Bondy e col ⁽⁶⁾ (1957)	Clorofórmio	cromatografia em papel	Radioatividade e fluorescência	8,1 \pm 3,6
Berliner ⁽³⁾ (1957)	Clorofórmio	cromatografia em papel	Radioatividade	8,8 \pm 0,4
Braunberg e James ⁽⁹⁾ (1960)	Acetato de Etila	cromatografia de partição em celite	Fluorescência	7,8 \pm 2,4
Presente trabalho	Diclorometano	cromatografia em camada delgada	Radioatividade e fluorescência	14,02 \pm 5,79

Tabela VII
Comparação dos Valores Obtidos por Peterson e col⁽³⁴⁾
e pela Técnica da Diluição Isotópica

		Cortisol Plasmático ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
Peterson e	Reação de Porter-Silber	15,0 \pm 4,5
col.	Diluição isotópica	13,7
Presente	Diluição isotópica	14,02 \pm 5,79
Trabalho		

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

- 1 – A técnica de diluição isotópica permite corrigir as perdas ocorridas durante a manipulação.
- 2 – O método de diluição isotópica é superior àquelas técnicas em que, para a dosagem de cortisol, sem separação prévia do esteroide, existem interferentes na reação de colorimetria.
- 3 – O método de diluição isotópica conduz a resultados similares aos obtidos com o método de Peterson e col., exceto na condição acima.
- 4 – A cromatografia em camada delgada mostrou-se eficiente na separação do cortisol livre do plasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ABELSON, D., and BONDY, P. K.: Fluorometric determination of Δ^4 -3-ketosteroids. *Arch. Biochem. & Biophys.*, 57, 208 (1955)
- (2) BAILEY, E.: The estimation of cortisol prednisolone and some of their metabolites in biological fluids using gas-liquid chromatography. In "Gas chromatography of steroids". Memoir of the Society for Endocrinology 1967 [18, 183 (1967)]. J. K. Grant, Eds.
- (3) BERLINER, D. L.: Microdetermination of acetylatable steroids in plasma. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 94, 126 (1957)
- (4) BERNSTEIN, L., and WEATHERALL, M.: *Statistic for Medical and other Biological students*. E. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London (1952)
- (5) BLISS, E. L., SANDBERG, A. A., NELSON, D. H. and EIK-NES, K.: The normal level of 17-hydroxycorticosteroids in the peripheral blood of man. *J. Clin. Invest.*, 32, 818 (1953)
- (6) BONDY, P. K., ABELSON, D., SCHEUER, J., TSEN, T. K. L., and UPTON, V.: Determination of cortisol in human plasma by quantitative paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, 224, 47 (1957)
- (7) BONDY, P. K., and UPTON, G. V.: Simultaneous determination of cortisol and corticosterone in human plasma by quantitative paper chromatography. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 94, 585 (1957)
- (8) BOWMAN, R. E.: Micromethod for determination of free 17-hydroxy-corticosteroids in plasma. *Fed. Proc.*, 21, 185 (1962)
- (9) BRAUNSBURG, H., and JAMES, V. H. T.: The determination of cortisol and corticosterone in blood: A review. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 21, 146 (1961)
- (10) BUSH, I. E.: Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues. *Biochem. J.*, 50, 370 (1952)
- (11) COPE, C. L.: Chemistry and pharmacology of the adrenocortical hormones - in "The adrenal cortex". The proceedings of a symposium organized by the Association of Clinical Pathologists held in London at the Royal Society of Medicine. October 14th - 15th, 1960. G. K. McGOWAN & M. SANDLER.
- (12) DORFMAN, R. I.: *Methods in Hormone Research*. 2nd edition, 1, 271 (1968). Academic Press, Inc., New York.
- (13) EIK-NES, K.: Determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in blood plasma. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 17, 502 (1957)
- (14) EIK-NES, K., NELSON, D. H., and SAMUELS, L. T.: Determination of 17,21-hydroxycorticosteroids in plasma. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 13, 1280 (1953)
- (15) GOLD, J. J.: Blood corticoids: their measurement and significance - A review. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 17, 296 (1957)

- (16) GOLD, N. I., and CRIGLER, J. F. JR.: Effect of tritium labeling of cortisol on its physical-chemical properties and on its metabolism in man.
J. Clin. Endocrinol. & Metab., 26, 133 (1966)
- (17) HALE, H. B.: Plasma corticosteroids levels in air crewmen after long flight.
J. Clin. Endocrinol. & Metab., 18, 1440 (1958)
- (18) HOLLANDER, V. P., and VINECOUR, J.: Determination of steroid alcohols with acetic anhydride-¹⁴C.
Analyt. Chem., 30, 1429 (1958)
- (19) JAYLE, M. F.: Analyse des Stéroïdes Hormonaux. Tome II, 1 (1962), Masson et Cie. Éditeurs.
- (20) JAYLE, M. F.: Analyse des stéroïdes hormonaux. Tome II, 113 (1962). Masson et Cie. Éditeurs.
- (21) JAYLE, M. F.: Analyse des Stéroïdes Hormonaux. Tome II, 465 (1962), Masson et Cie. Éditeurs.
- (22) JENKIN, J. S.: Adrenocortical hormones in the blood – in "The adrenal cortex". The proceedings of a symposium organized by the Association of Clinical Pathologists held in London at the Royal Society of Medicine. October 14th – 15th, 1960. G. K. McGOWAN & M. SANDLER.
- (23) KALANT, H.: Chromogenic and fluorogenic reactions of adrenocortical and other steroids in concentrated acids.
Biochem. J., 69, 79 (1958)
- (24) LEWIS, B.: A paper-chromatographic technique for the determination of plasma corticosteroids.
J. Clin. Path., 10, 148 (1957)
- (25) MADER, W. J., and BUCK, R. R.: Colorimetric determination of cortisone and related ketosteroids.
Analyt. Chem., 24, 636 (1952)
- (26) MARKS, L. J., and LEFTIN, J. H.: A note of caution on the lack of specificity of the Porter-Silber reaction for 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids.
J. Clin. Endocrinol. & Metab., 14, 1263 (1954)
- (27) MIGEON, C. J., TYLER, F. H., MAHONEY, J. P., FLORENTIN, A. A., CASTLE, H., BLISS, E. L., and SAMUELS, L. T.: The diurnal variation of plasma levels and urinary excretion of 17-hydroxycorticosteroids in normal subjects, night workers and blind subjects.
J. Clin. Endocrinol. & Metab., 16, 622 (1967)
- (28) MORRIS, C. J. O. R., and WILLIAMS, D. C.: The polarographic estimation of steroid hormones. 6. The determination of individual adrenocortical hormones in human peripheral blood.
Biochem. J., 54, 470 (1953)
- (29) NELSON, D. H., and SAMUELS, L. T.: A method for the determination of 17-hydroxycorticosteroids in blood: 17-hydroxycorticosterone in the peripheral circulation.
J. Clin. Endocrinol. & Metab., 12, 519 (1952)
- (30) PERKOFF, L. T., EIK-NES, K., NUGENT, C. A., FRED, H. L., NIMER, R. A., SAMUELS, L. T., and TYLER, F. H.: Studies of the diurnal variation of plasma 17-hydroxycorticosteroids in man.
J. Clin. Endocrinol. & Metab., 19, 432 (1959)
- (31) PETERSON, R. E.: The identification of corticosterone in human plasma and its assay by isotope dilution.
J. Biol. Chem., 225, 25 (1957)

- (32) PETERSON, R. E.: Metabolism of adrenocorticosteroids in man. *Ann. New York Acad. Sc.*, **82**, 846 (1959)
- (33) PETERSON, R. E.: Miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man. *Recent Prog. Hormone Res.*, **15**, 231 (1959)
- (34) PETERSON, R. E., KARRER, A., and GUERRA, S. L.: Evaluation of Silber-Porter procedure for determination of plasma cortisol. *Anal. Chem.*, **29**, 144 (1957)
- (35) PORTER, C. C., and SILBER, R. H.: Quantitative color reaction for, cortisone and related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids. *J. Biol. Chem.*, **185**, 201 (1950)
- (36) PROCKOP, D. J., and EBERT, P. S.: A simple method for differential assay of tritium and carbon-14 in water soluble biological materials. *Anal. Biochem.*, **6**, 263 (1963)
- (37) RONGONE, E. L.: Method for determination of 17,21-dihydroxy 20-ketosteroids in urine and plasma. *Proc. Socv Exper. Biol. Med.*, **101**, 709 (1959)
- (38) SANDBERG, A. A., and SLAUNWHITE, W. R.: Transcortin: a corticosteroid-binding plasma protein. *J. Clin. Invest.*, **37**, 948 (1958)
- (39) SILBER, R. H., and BUSCH, R. D.: The specificity of the reaction of phenylhydrazine with 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **15**, 505 (1955)
- (40) SILBER, R. H., BUSCH, R. D., and OSLAPAS, R.: Practical procedure for estimation of corticosterone and hydrocortisone. *Clin. Chem.*, **4**, 278 (1958)
- (41) SILBER, R. H., and PORTER, C. C.: The determination of 17,31-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma. *J. Biol. Chem.* **210**, 923 (1954)
- (42) SWEAT, M. L.: Sulfuric acid-induced fluorescence of corticosteroids. *Analyt. Chem.*, **26**, 773 (1954)
- (43) SWEAT, M. L.: Silica-gel microcolumn for chromatographic resolution of cortical steroids. *Analyt. Chem.*, **26**, 1964 (1954)
- (44) SWEAT, M. L.: Adrenocorticosteroids in peripheral and adrenal venous blood of man. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **15**, 1043 (1955)
- (45) WAJCHENBERG, B. L.: Correlação hipófise-suprarrenal (1). *Arq. Bras. Endocrin. Metab.*, **15**, 185 (1966)
- (46) WAJCHENBERG, B. L., LIBERMAN, B., QUINTÃO, E. R.: Diurnal variation of plasma 17-hydroxycorticosteroids in normal and anxious human subjects. *Arq. Bras. Endocrin. Metab.*, **13**, 21 (1964)
- (47) WEICHSELBAUM, T. E., and MARGRAF, H. W.: Determination in plasma of free 17-hydroxy and 17-desoxycorticosteroids and their glucuronic-acid conjugates. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **15**, 970 (1955)

- (48) ZENKER, N., and BERNSTEIN, D. E.: The estimation of small amounts of corticosteroids in rat plasma.
J. Biol. Chem., 231, 695 (1958)
- (49) "Procedure for channels ratio counting of tritium samples only", in Operating Instructions for Liquid Scintillation Systems 724 and 725, 84-86, Nuclear Chicago Corporation, Des Plaines, Illinois (1964)

