



Bepaling van vrij cortisol in urine

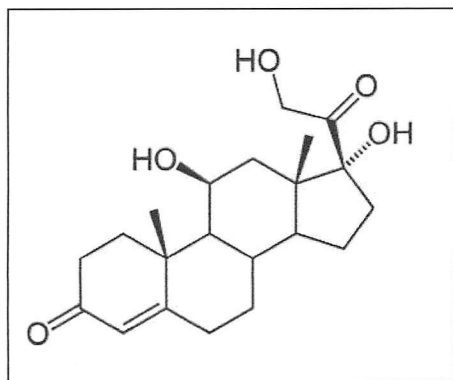
Hai Holthuysen

Laboratorium apotheek Viecuri Medisch Centrum
voor Noord-Limburg
Tegelseweg 210, 5912 BL Venlo
hholthuysen@viecuri.nl

Inleiding

In Extract nummer 2, jaargang 18 heeft een artikel gestaan over een eerste aanzet tot samenwerking met het Klinisch Chemisch Laboratorium (KCHL). Het betrof een bepaling van vrij cortisol (en indien gewenst vrij cortison) in 24 uren urine, een bepaling die normaliter bij het KCHL wordt aangevraagd. De methode vindt zijn toepassing bij patiënten die verdacht zijn op het syndroom van Cushing. In het verleden werd deze bepaling door het KCHL uitbesteed aan een extern laboratorium die de cortisol in urine lieten bepalen via een immunochemische techniek, die nogal wat interferenties vertoonde met andere corticosteroïden, waardoor verhoogde waarden niet volledig konden worden toegeschreven aan uitsluitend vrij cortisol. Een intensieve samenwerking tussen beide laboratoria leverde een HPLC-methode op, die de cortisol kon scheiden van andere componenten in urine. In het vorige Extract hebben jullie uitgebreid kunnen lezen hoe deze samenwerking tot stand is gekomen. Nu is het tijd voor het daadwerkelijke analysevoorschrift.

Structuurformule cortisol



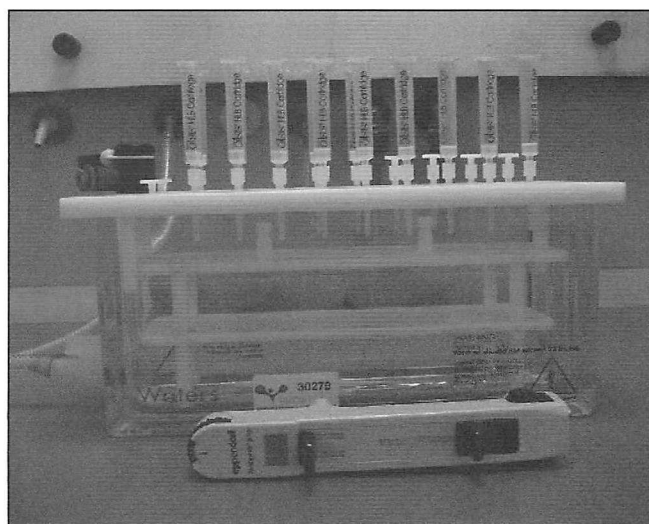
HPLC systeem

Kolom	SymmetryShield RP18 (150 x 4,6 mm i.d.), 3,5 µm (186000180) + Symmetry RP18 SentryGuard (20 x 3,9 mm i.d.), 3,5 µm (186000701)
Loopmiddel	0,01 mol/l NaH ₂ PO ₄ 2 water (pH = 7) – Tetrahydrofuraan 85 – 15
Flow	0,9 ml/min.
Detectie	246 nm
Temperatuur	50 °C
Injectie	90 µl

Opstarten en uitschakelen HPLC-systeem

In de routine is gebleken dat de SymmetryShield RP18 kolom bij de gebruikte temperatuur van 50 °C zeer kwetsbaar is. Het is daarom belangrijk de kolom met zo veel mogelijk zorg te behandelen. Voer daarom alle handelingen aan de kolom uit bij kamertemperatuur. Vervang bijvoorbeeld geen voorkolommen bij een temperatuur van 50 °C. Ook het systeem primen bij 50 °C is uit den boze. Breng de flow altijd in kleine stapjes omlaag of omhoog.

Na het equilibreren van het systeem moet een testmonster met daarin cortison en cortisol worden ingespoten. De retentietijd van cortison moet ongeveer 16 minuten bedragen die van cortisol ongeveer 20 minuten. Verschillen de waargenomen tijden te veel van deze richtlijn bestaat de mogelijkheid dat tijdens de bepaling cortisol wordt gestoord door een grote piek op ca. 18-19 minuten. Deze piek is af en toe te zien bij patiëntenuurines en wordt alleen van de cortisol gescheiden wanneer deze zich op ca. 20 minuten in het chromatogram bevindt. Afwijkingen ten opzichte van de voorgestelde retentietijden kunnen meestal worden opgelost door 1 – 3 ml tetrahydrofuraan aan het loopmiddel toe te voegen, afhankelijk van de ouderdom van het loopmiddel en de hoeveelheid die zich nog in de fles bevindt.



Extractie manifold



Grondstoffen

Artikel	Artikelnummer
Tetrahydrofuraan LiChrosolv®	Merck 108101
Methanol p.a.	Merck 106009
Aceton p.a.	Merck 100014
Hexaan p.a.	Merck 104371
Ethylacetaat p.a.	Merck 109623
Natriumhydroxide p.a.	Merck 106498
Natriumdiwaterstoffsfaat.2 water	Bufa B.V. 195113
Acidum boricum	Bufa B.V.176411
Hydrocortison (cortisol)	Bufa B.V. 116305
Cortison	Sigma C2755
6-alfa-methylprednisolon	Sigma M0639
Urine controles Low, Medium en High	

Reagentia

Reagens	Bereiding
0,01 mol/l natriumdiwaterstoffsfaat.H ₂ O pH=7,0	2,07 g natriumdiwaterstoffsfaat.H ₂ O oplossen in 1000ml aqua demi. Breng op pH=7,0
Aqua demi - aceton	Meng 400 ml aqua demi met 100 ml aceton
Cortisol 1,0 mg/ml in methanol	Los 25,0 mg cortisol op in 25,0 ml methanol
Cortison 1,0 mg/ml in methanol	Los 25,0 mg cortison op in 25,0 ml methanol
6-alfa-methylprednisolon 1,0 mg/ml in methanol	Los 25,0 mg alfamethylprednisolon op in 25,0 ml methanol
Boorzuur 0,5 mol/l pH=7,5	Los 15,5 g boorzuur op in 500 ml aqua demi. Breng op pH=7,5
Natriumhydroxide 0,1 mol/l	Los 2 g natriumhydroxide op in 500 ml aqua demi
Blanco urine	

Standaarden en monsters cortisol en cortison

Uitgaande van de stamoplossing 1,0 mg/ml cortisol en 1,0 mg/ml cortison in methanol:
40 µl ad 20,0 ml aqua demi (oplossing A)

	67,3 nmol/l	134,6 nmol/l	269,2 nmol/l	monster
Aqua demi	3 ml	3 ml	3 ml	
Oplossing A	50 µl	100 µl	200 µl	
Urine monster/controle				3 ml
Interne standaard	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Aqua demi	350 µl	300 µl	200 µl	400 µl
0,5 m boorzuur pH=7,5	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Eindvolume	4,1 ml	4,1 ml	4,1 ml	4,1 ml

De urinemonsters worden bij de beschreven werkwijze verdund met een factor $(4,1/3) = 1,37$. Om een waarde voor cortisol in het monster ongecorrigeerd te kunnen aflezen dienen de waarden van de standaarden met de factor 1,37 vermenigvuldigd te worden.
Derhalve dient in de software de volgende concentraties te worden ingegeven.

Standaard 67,3 x 1,37 = **92,2 nmol/l**
Standaard 134,6 x 1,37 = **184,4 nmol/l**
Standaard 269,2 x 1,37 = **368,8 nmol/l**

Interne standaard

6-alfa-methylprednisolon 1,0 mg/ml in methanol.
Hiervan 50 µl ad 10,0 ml aqua demi.

Controle oplossingen

De controles worden bereid uitgaande van vers afgenomen blanco urine. Uitgaande van een controle oplossing cortisol/ cortisol met concentratie 1,0 mg/ml in methanol: 40 µl ad 10,0 ml water (oplossing B)

Low controle : blanco urine
Medium controle (99 nmol/l) : 90 µl oplossing B
ad 10,0 ml blanco urine.
High controle (331 nmol/l) : 300 µl oplossing B
ad 10,0 ml blanco urine.

Verdun de blanco urine op dusdanige wijze dat een eind-concentratie van ca 20 nmol/l wordt bereikt. Hiervoor is geen richtlijn, dit moet proefondervindelijk worden bepaald. De theoretische waarde van de medium controle is: gevonden waarde low controle + 99.
De theoretische waarde van de high controle is: gevonden waarde low controle + 331

De reden dat op deze wijze te werk wordt gegaan, vormt de constatering, dat cortisol wanneer deze wordt gespiked in urine, niet stabiel is. Na drie weken begint de concentratie cortisol terug te lopen. Uiteraard vormt deze werkwijze geen sluitende controle op de juistheid van de ijklijn. In ons laboratorium wordt daarom als aanvullende controle op de ijklijn, de medium controle van een vorige run bepaald met de nieuwe ijklijn. Deze manier blijkt in de praktijk goed te werken.

De controles worden op overeenkomstige wijze opgewerkt als de patiëntenmonsters.

	Low	Medium	High
Urine	3 ml	3 ml	3 ml
Interne standaard	200 µl	200 µl	200 µl
Aqua demi	400 µl	400 µl	400 µl
0,5 m boorzuur pH=7,5	500 µl	500 µl	500 µl
Eindvolume	4,1 ml	4,1 ml	4,1 ml

Uitvoering

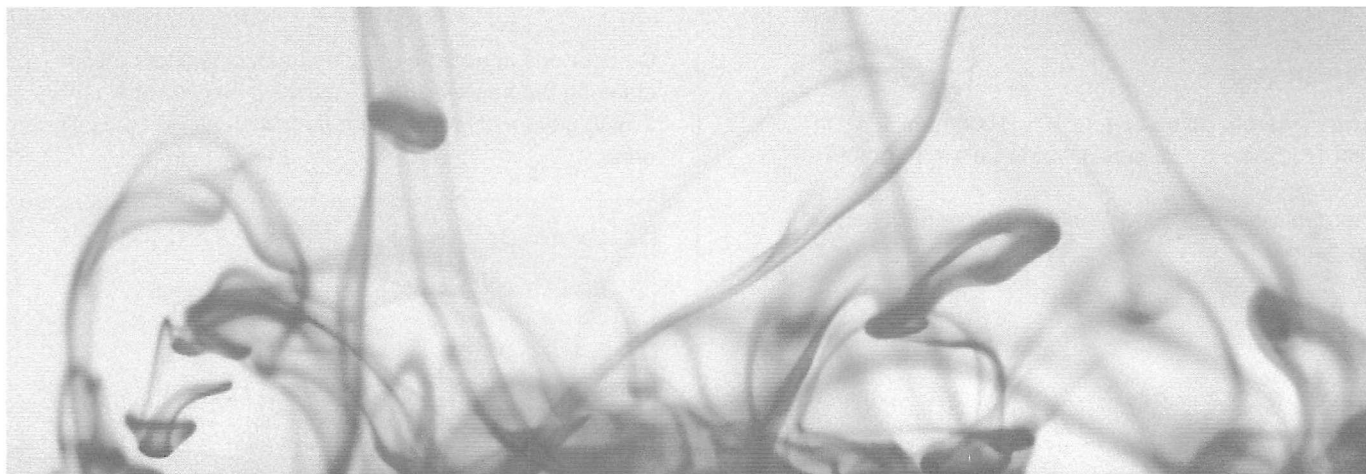
1. Plaats de benodigde cartridges op de manifold (Oasis HLB 3 ml).
2. Spoel achtereenvolgens met 3 ml methanol en 3 ml water.
3. Breng 3 ml standaard, controle of monster op.
4. Was met 2 ml aqua demi.
5. Was met 2 ml aqua demi - aceton 80 - 20.
6. Was met 2 ml hexaan.
7. Plaats de opvangbuisjes voorzien van 1,5 ml NaOH 0,1 mol/l in het opvang rek.
8. Elueer met 2 ml ethylacetaat.
9. Vortex gedurende 1 minuut en centrifugeer 10 minuten bij 4500 r.p.m.
10. Breng de bovenstaande laag over in een indampampul van 10 ml
11. Damp droog onder stikstof bij ca. 40 °C.
12. Neem het residu op in 120 µl eluens.

Retentietijden

Cortison	15,44 minuten
Cortisol	19,45 minuten
Methylprednisolon	34,61 minuten

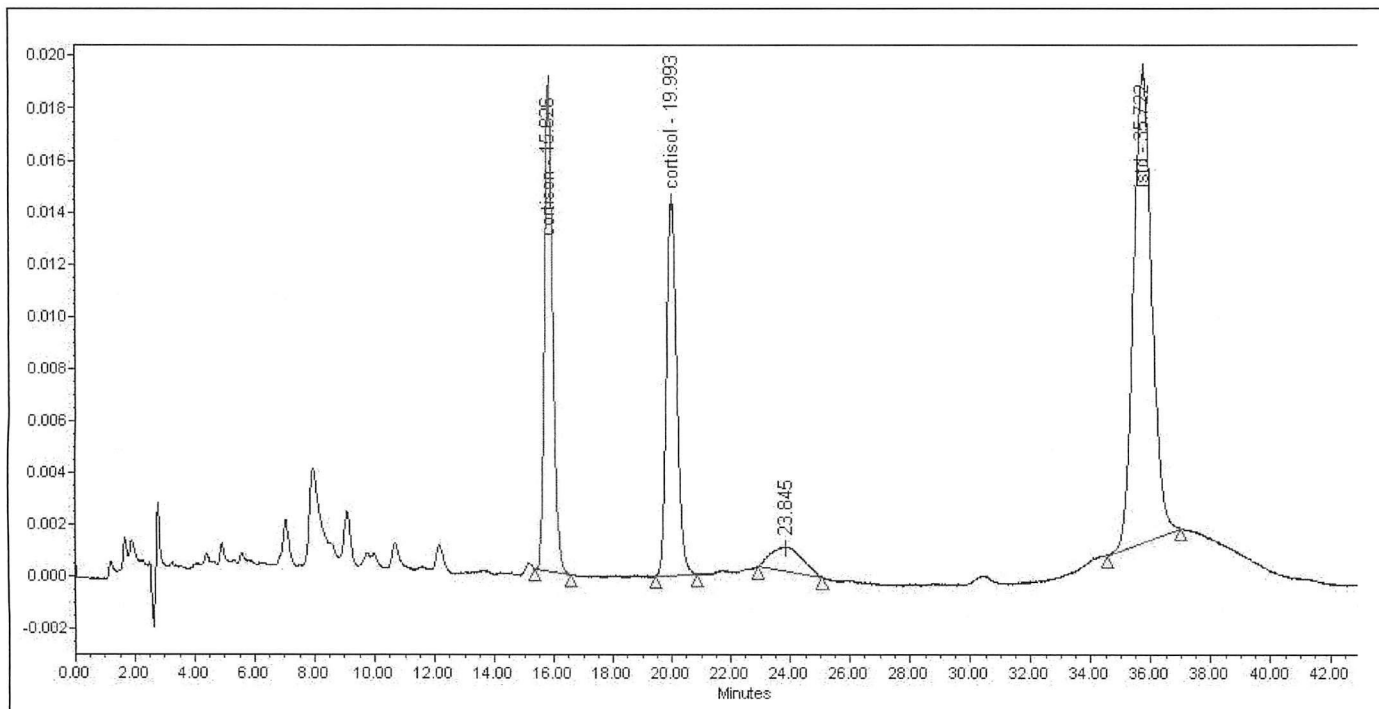
Referentiewaarde

Cortisol	< 145 nmol/24 uur
----------	-------------------



Chromatogram

Chromatogram van een urine controle.



Validatie

De methode is gevalideerd zoals omschreven in de op dit moment geldende instructie van het laboratorium. De belangrijkste validatieparameters van cortisol zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Validatieparameters van cortisol

Concentratie nmol/l	Herhaalbaarheid (R.S.D.) %
156	0,75
264	6,93
538	3,47
1022	0,82
Recovery	80%
Juistheid	93%

Meetbereik

Het meetbereik ligt tussen de 10 – 1000 nmol/l
 Waarden onder de 10 nmol/l worden als < 10 nmol/l doorgegeven.
 Waarden groter als 1000 nmol/l worden > 1000 nmol/l doorgegeven.

Conclusie

De bepaling van vrij cortisol in urine wordt uitgevoerd door het laboratorium van de apotheek. Het klinisch chemisch laboratorium zorgt voor de berekening van de uitslagen naar 24 uren urine. Het klinisch chemisch laboratorium is eindverantwoordelijk voor het doorgegeven resultaat naar de aanvrager. De beschreven methode is geschikt voor

de bepaling van vrij cortisol in urine.

De methode is op dit moment sinds augustus 2006 bij ons operationeel. Momenteel worden naast aanvragen uit ons eigen ziekenhuis, ook monsters uit het Elkerliek Ziekenhuis in Helmond door ons in behandeling genomen.

De door ons opgedane ervaring heeft geleid tot de constatering dat amtriptyline, nortriptyline en diltiazem aanleiding geven tot storing in de bepaling van vrij cortisol in urine.

Literatuur

1. Academisch Medisch Centrum Amsterdam.
Cortisol in urine: Specieel laboratorium
Endocrinologie en Radiochemie.
2. Netherlands Journal of Medicine 53 (1998)
153-163.