

## MÉTHODES DE DÉTECTION DES STÉROÏDES CONJUGUÉS SÉPARÉS PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

O. CRÉPY, O. JUDAS ET B. LACHESE

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine,  
Paris (France)\**

(Reçu le 16 mars 1964)

Dans ce travail nous présentons une adaptation à la chromatographie en couche mince de deux procédés de détection des sulfates et des glucosiduronates de stéroïdes utilisés en chromatographie sur papier<sup>1-2</sup>.

Nous décrivons deux exemples de leur application à l'étude des stéroïdes conjugués: le premier concerne la séparation des glucosiduronates de 5 $\beta$ -pregnane 3 $\alpha$ -yl 20 $\alpha$ -ol et de 5 $\beta$ -pregnane 3 $\alpha$ -yl 20-one et de leurs isomères en 5 $\alpha$ ; le second se rapporte à l'identification des sulfates de stéroïdes en C<sub>19</sub>.

### DÉTECTION DES GLUCOSIDURONATES

Cette technique est basée sur la combinaison des glucosiduronates avec le 1(2-pyridyl-azo)2-naphtol et la formation avec le cobalt d'un chélate coloré.

#### *Réactifs utilisés*

(1) Solution de 1(2-pyridyl-azo)2-naphtol ou P.A.N. à 0.4 g % dans l'éthanol. Ce réactif est dilué extemporanément par 4 volumes de dichlorométhane.

(2) Solution de nitrate de cobalt à 0.8 % dans l'eau bidistillée.

(3) Solution tampon d'acétate de Na/acide acétique 2 M, de pH 4.6, préparée avec de l'eau bidistillée et de l'acide acétique exempt de traces de fer.

(4) A 8 ml de la solution (2) on ajoute 4 ml de la solution (3) et on complète à 100 ml avec de l'eau bidistillée.

#### *Mode opératoire*

La solution (1) (P.A.N.) est pulvérisée sur la plaque jusqu'à ce que toute celle-ci soit d'un jaune uniforme. Quand la plaque est sèche, la solution (4) est pulvérisée à son tour. Les taches de glucosiduronates apparaissent en violet sur fond jaune. Ces taches changent d'aspect rapidement. Cependant quand la plaque est sèche elles réapparaissent plus faiblement en verdâtre sur fond vert plus clair. Il est possible avec ce procédé, de déceler 1 à 2  $\mu$ g de glucosiduronates.

En chromatographie sur papier, il est indispensable d'enlever l'excès de P.A.N. en traitant le chromatogramme par le chlorhydrate de phénylhydrazine<sup>1</sup>. Il n'est pas nécessaire de le faire avec la chromatographie sur plaques.

Par contre, toute trace de métaux susceptibles de former des chélates avec le

\* Laboratoire de Chimie biologique (Prof. M. F. JAYLE), 45 rue des Saints-Pères, Paris-6e.

P.A.N. doit être prohibée. C'est pourquoi il faut utiliser de l'eau bidistillée pour la préparation des plaques. Il faut également que les solvants soient très purs et que l'acide acétique soit exempt de fer. (Nous utilisons à cet usage l'acide acétique glacial pour analyses Merck.)

#### DÉTECTION DES SULFATES DE STEROÏDES

Cette réaction est basée sur la formation d'un complexe coloré, entre le bleu de méthylène et les estersulfates.

##### *Mode opératoire*

25 mg de bleu de méthylène sont écrasés dans un mortier, en ajoutant à plusieurs reprises de l'acide sulfurique *N/20* et en décantant la solution dans une fiole de 100 ml jusqu'à ce que tout le bleu de méthylène soit dissous. La fiole est complétée au trait de jauge avec la solution d'acide sulfurique et gardée à l'abri de la lumière. Au moment de l'emploi, on dilue le réactif avec volume égal d'acétone pure. Le réactif est pulvérisé sur la plaque jusqu'à ce que celle-ci soit uniformément bleue. Les taches apparaissent rapidement avec des couleurs variées suivant les estersulfates. Ces couleurs sont stables pendant plusieurs heures, elles s'atténuent ensuite.

Il arrive exceptionnellement que certains sulfates comme le sulfate de *p*-crésol se révèlent difficilement. On peut cependant les mettre en évidence en plaçant la plaque dans une cuve contenant du chloroforme. Si on laisse celui-ci monter par capillarité, il entraîne avec lui le complexe estersulfates/bleu de méthylène et laisse à sa place une tache blanche.

L'addition d'acétone au réactif limite la diffusion des taches et accélère son évaporation. Elle permet d'obtenir une pulvérisation plus homogène, les gouttelettes étant beaucoup plus fines, en raison de la diminution de la tension superficielle du liquide. Le fond bleu ciel est plus uni et les taches sont plus nettes. Le sulfate de Na présent dans le réactif de Vlitos habituel a été supprimé car ce sel est précipité par l'acétone.

Par ce procédé, il est possible de déceler 1 à 2  $\mu\text{g}$  d'estersulfate.

#### APPLICATION

##### *Premier exemple*

Séparation des glucosiduronates de  $5\beta$ -pregnane  $3\alpha$ -yl  $20\alpha$ -ol,  $5\beta$ -pregnane  $3\alpha$ -yl  $20$ -one,  $5\alpha$ -pregnane  $3\beta$ -yl  $20\alpha$ -ol et  $5\alpha$ -pregnane  $3\beta$ -yl  $20$ -one, par chromatographie de partage en deux dimensions.

*Support utilisé.* Mélange 9/1 de Kieselguhr G/Kieselgel G. La poudre délayée dans deux fois son poids d'eau bidistillée est étalée sur la lame de verre selon la méthode classique de STAHL; épaisseur: 0.25 mm.

Les plaques sont chauffées à 105° pendant 30 min et gardées dans un exsiccateur.

*Système de solvants utilisé.* Toluène-butanol tert.-acide acétique-eau (82:18:30:70).

Comme il s'agit d'une chromatographie de partage il est nécessaire que la plaque soit en équilibre avec les deux phases du mélange. Pour cette raison, le papier Whatman qui borde les parois de la petite cuve rectangulaire est imprégné de la phase aqueuse et plusieurs béchers contenant l'une et l'autre des phases sont placés au fond de la cuve.

Après avoir déposé en 1 tache de 3 mm de diamètre l'extrait contenant les 4 glucosiduronates, à 1.5 cm du bord gauche et au bas de la plaque, celle-ci est placée dans la cuve. On laisse l'équilibre s'établir pendant 1½ h, puis on introduit la phase organique du solvant. Lorsque celui-ci a atteint environ 15 cm la plaque est séchée à l'air et replacée dans la cuve en la faisant tourner de 45°. On attend de nouveau 1½ h avant de verser la phase mobile qui monte de nouveau jusqu'à environ 15 cm. Après séchage de la plaque, celle-ci est révélée par le réactif au P.A.N.

La Fig. 1 illustre les résultats obtenus. On voit que par cette technique les 4 glucosiduronates sont bien séparés.

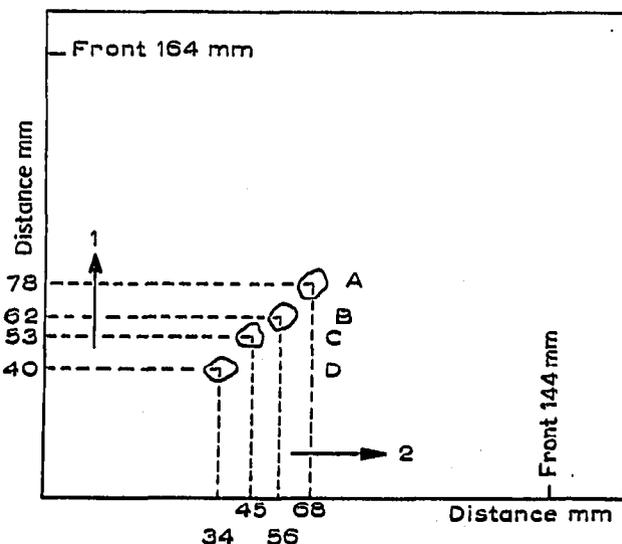


Fig. 1. Séparation par chromatographie en deux dimensions des 4 glucosiduronates suivants.

Glucosiduronate de	$R_F$	
	(1)	(2)
(A) 5 $\alpha$ -prégnane 3 $\alpha$ -yl 20-one	0.47	0.47
(B) 5 $\beta$ -prégnane 3 $\alpha$ -yl 20-one	0.38	0.38
(C) 5 $\alpha$ -prégnane 3 $\alpha$ -yl 20-ol	0.32	0.31
(D) 5 $\beta$ -prégnane 3 $\alpha$ -yl 20-ol	0.24	0.24

### Deuxième exemple

Chromatographie de partage et détection par le réactif au bleu de méthylène, du sulfate de *p*-crésol et de 5 estersulfates de stéroïdes en C<sub>10</sub>.

*Support utilisé.* Mélange de Kieselguhr G/Kieselgel G préparé comme dans le cas précédent. Les proportions sont: (1) 19/1 et (2) 9/1.

*Système de solvants.* Mélange de acétate de butyle-toluène-NH<sub>4</sub>OH 4N-méthanol dans les proportions (1) 85:35:50:70 et (2) 110:90:120:160.

Les plaques sont mises en équilibre avec les deux phases du solvant comme dans le cas précédent ou selon la variante suivante: deux cuves sont préparées; dans la première, la phase aqueuse se trouve dans le fond de la cuve et imprègne aussi le papier Whatman adhérent aux parois. Une série de petits béciers sont remplis de phase organique. Après dépôt des extraits sur la plaque celle-ci est placée dans la cuve,

sur des petits rouleaux de verre qui la maintiennent au-dessus de la surface du liquide. Dans la deuxième cuve, la phase organique se trouve au fond et imprègne aussi le papier entourant les parois, la phase aqueuse est contenue dans une série de petits béchers.

Après 2 h de séjour dans la première cuve, la plaque est retirée et plongée immédiatement dans la deuxième cuve. Le solvant organique monte par capillarité jusqu'à 15 cm. La plaque est alors séchée à l'air et révélée par le réactif au bleu de méthylène. Les résultats sont indiqués dans le Tableau I.

TABLEAU I  
CHROMATOGRAPHIE DES DIFFÉRENTS SULFATES DE STÉROÏDES EN C<sub>19</sub>

	Migration en cm		Révélation par le réactif au bleu de méthylène Couleur des taches
	Syst. 1*	Syst. 2*	
Sulfate de <i>p</i> -crésol	5.1	3.2	± bleu
Sulfate d'androsta-5-ene 3β-yl 17-one (déhydroépiandrostérone)	8.5	5.0	rose vif
Sulfate de 5α-androstane 3α-yl 17-one (androstérone)	8.2	5.1	bleu outre-mer
Sulfate de 5α-androstane 3β-yl 17-one (épiandrostérone)	8.7	5.5	rose orangé
Sulfate de androst-5-ane 3β-yl 20β-ol (androstenediol)	6.1	3.8	rose vif
Sulfate de 5α-androstane 3α-yl 20β-diol (androstenediol)	7.6	4.0	violet

\* *Solvants*: Système 1: Acétate de butyle-toluène-NH<sub>4</sub>OH 4 *N*-méthanol (85:35:50:70).  
Système 2: Acétate de butyle-toluène-NH<sub>4</sub>OH 4 *N*-méthanol (110:90:120:160).

Les migrations des sulfates d'androstérone, de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone sont très voisines mais les couleurs obtenues avec ces stéroïdes sont différentes. Les 3 stéroïdes possédant un hydroxyle en 3β donnent des couleurs rose vif ou orangé, les 3α-hydroxystéroïdes donnent une coloration bleue ou violette.

#### RÉSUMÉ

Description de deux procédés de révélation des stéroïdes conjugués adaptés à la chromatographie en couche mince, le premier utilisant le réactif au pyridyl-azonaftol pour la révélation des glucosiduronates, le deuxième, le réactif au bleu de méthylène pour celle des estersulfates.

Leur application à la séparation chromatographique des glucosiduronates de 5α- et 5β-prégnane 3α-yl 20α-ol et de 5α et 5β-prégnane 3α-yl 20-one et à celle de cinq estersulfates en C<sub>19</sub> est discutée.

#### SUMMARY

Two procedures for the detection of conjugated steroids on thin-layer chromatograms are described. In the first, pyridyl-azo-naphthol is used to reveal glucosiduronates, and in the second methylene blue reagent for sulphates. The application of these reagents to the chromatographic separation of the glucosiduronates of 5α- and 5β-pregnan-3α-yl-20α-ols and 5α- and 5β-pregnan-3α-yl-20-ones, as well as to that of five C<sub>19</sub> sulphates, is discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> O. CRÉPY, B. LACHESE ET O. JUDAS, *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, 6 (1961) 601.  
<sup>2</sup> O. CRÉPY ET O. JUDAS, *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, 5 (1960) 284.

*J. Chromatog.*, 16 (1964) 340-344