

Notes

CHROM. 4294

Une méthode ultrasensible de mesure de l'oestriol par chromatographie en phase gazeuse avec capture d'électrons

Formation de 16,17-diheptafluorobutyrate de 3-méthyl-oestriol

La faible quantité d'oestrogènes contenue dans le plasma en dehors de la grossesse humaine rend leur dosage très délicat. Depuis quelques années cependant des méthodes spécifiques et très sensibles ont été publiées pour l'oestrone et l'oestradiol libres plasmatiques, ayant recours, soit à la double dilution isotopique^{1,2}, soit à la chromatographie en phase gazeuse avec capture d'électrons³⁻⁵, soit à la fixation protéique compétitive⁶⁻⁸. Cependant à part quelques résultats publiés par WOTIZ *et al.*⁵ aucun auteur n'a à notre connaissance mis au point de technique de sensibilité équivalente pour l'oestriol plasmatique.

Préparation et identification du dérivé

Dans un premier temps, nous avons tenté d'obtenir et d'identifier des cristaux d'un dérivé fluoré du méthyl-oestriol, le 16,17-diheptafluorobutyrate de 3-méthyl-oestriol (oestratriène-3 β ,16 α ,17 β -triol) (DHF BMe_3). Ce dérivé a été préparé selon la méthode de VAN DER MOLEN *et al.*⁹: 100 mg de 3-méthyl-oestriol sont dissous dans 2 ml de tétrahydrofurane auquel on ajoute 0.5 ml d'anhydride heptafluorobutyrique (Fluka) et quelques gouttes de pyridine. Après agitation le tube bouché est gardé 2 h à l'obscurité puis évaporé sous azote à 45°. Le résidu sec après évaporation est dissous dans 3 ml de méthanol aqueux à 70 % et extrait 5 fois par 2 ml d'hexane. Les fractions hexane mélangées sont recristallisées 3 fois dans benzène/hexane. On obtient ainsi des cristaux blancs allongés se groupant en buisson et dont le point de fusion est de 92°.

L'heptafluorobutyrate de testosterone (HF BT) utilisé comme standard interne est préparé de la même manière.

La nature exacte du composé formé a pu être précisée. Les chromatographies sur couche mince de gel de silice dans divers systèmes n'ont montré qu'une seule tache absorbant en UV.

La chromatographie en phase gazeuse avec capture d'électrons donne un seul pic avec les colonnes 1 % XE-60 ou 1 % QF 1 sur Gas Chrom Q. De même un seul pic a été observé en ionisation de flamme après chromatographie sur une colonne de 2 % XE-60 sur chromosorb WAWO-MC.

La spectrographie de masse réalisée à Utrecht grâce au Dr. VAN DER MOLEN a montré que le composé d'un poids moléculaire de 694 possède 2 résidus heptafluorobutyriques. Il correspond donc à la formule $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{F}_{14}$.

La microanalyse a indiqué une teneur en gramme pour 100 g de produit brut de 46.61 pour C (calculée 46.65), 3.62 pour H (calculée 3.46), 37.37 pour F (calculée 38.30).

détecteur avec source de tritium et contenant une colonne de verre siliconé en U de 60 cm \times 4 mm remplie de Gas Chrom Q imprégné de QF 1 à 1%: La température du four est à 170°, le flash-heater à 210°, le détecteur à 210°. L'intervalle de pulsation est de 150 μ sec. Un mélange argon-méthane (95:5) est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 75 ml/min et comme gaz de purge avec un débit de 225 ml/min.

On utilise comme standard interne l'heptafluorobutyrate de testosterone. Le diheptafluorobutyrate de méthyl-oestriol (DHF₇Me₃) a par rapport à celui-ci un temps de rétention de 0.45 soit 8 et 17 min environ. La courbe de calibration (Fig. 2A) montre que le rapport de surface des pics de DHF₇Me₃ et de HFBT est égal à 1 quand la quantité de ce dernier dérivé est 3 fois supérieure à celle du précédent. Pour des quantités de 0.1 à 5 ng de DHF₇Me₃, la réponse du détecteur est linéaire (Fig. 2B). Une quantité aussi faible que 0.1 ng de DHF₇Me₃ correspondant à $1.8 \cdot 10^{-7}$ mmole d'oestriol libre donne une réponse nettement supérieure aux variations de la ligne de base et très aisément mesurable.

Conclusion

Nous disposons ainsi d'une micro-méthode ultra-sensible et spécifique de mesure de l'oestriol dans les milieux biologiques et plus particulièrement le plasma. Des résultats préliminaires¹⁰ sur l'application de cette méthode aux extraits plasmatiques ont déjà permis de constater que cette technique donnait des résultats positifs et reproductibles au cours de la phase lutéale du cycle menstruel aussi bien que dans le plasma des femmes enceintes.

La spectrographie de masse a été réalisée à Utrecht (Pays Bas) par le Docteur VAN DER MOLEN, la micro-analyse a été effectuée par le service central de micro-analyse du C.N.R.S.

Ce travail a été réalisé avec l'aide du C.N.R.S. (R.C.P. No. 150).

Laboratoire de Chimie Hormonale Maternité,
Paris 14e (France)*

E. ALSAT
C. CORPECHOT
C. EGO
E. RICHARD
L. CEDARD

- 1 R. SVENDSEN ET B. SORENSEN, *Acta Endocrinol.*, 47 (1964) 245.
- 2 D. T. BAIRD, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28 (1968) 244.
- 3 J. ATTAL, S. M. HENDELES ET K. B. EIK-NES, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 394.
- 4 J. ATTAL ET K. B. EIK-NES, *Anal. Biochem.*, 26 (1968) 398.
- 5 H. WOTIZ, G. CHARRANSOL ET I. N. SMITH, *Steroids*, 10 (1967) 127.
- 6 C. S. CORKER ET D. EXLEY, *J. Endocrinol.*, 43 (1969) XXX.
- 7 D. S. SHUTT, *Steroids*, 13 (1969) 69.
- 8 S. G. KORENMAN, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28 (1968) 127.
- 9 H. J. VAN DER MOLEN, J. H. VAN DER MAAS ET D. GROEN, *Eur. J. Steroids*, 2 (1967) 119.
- 10 L. CEDARD, ET G. EGO, résultats non publiés.

Reçu le 2 mai 1969

* Service du Prof. J. VARANGOT.