

CHROM. 5298

## Séparation des stéroïdes et des colorants marqueurs sur résine échangeuse d'ions

Pendant la mise au point d'une méthode de dosage simultané de plusieurs stéroïdes plasmatiques par double dilution isotopique, nous avons rencontré une difficulté particulière. La chromatographie sur papier des extraits plasmatiques contenant également les stéroïdes marqueurs- $^{14}\text{C}$  constitue une étape nécessaire, préalable à la réaction d'acétylation par l'anhydride acétique- $^3\text{H}$ . La quantité de stéroïde est trop faible pour la détection visuelle ou le scanning de radioactivité ( $35 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$  et  $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}$ ). Nous avons donc utilisé les colorants marqueurs préconisés par NEHER *et al.*<sup>1</sup>. Les colorants sont déposés, comme les stéroïdes, sur toute la largeur du chromatogramme: la migration présente parfois une certaine distortion; la zone colorée permet donc non seulement de localiser le stéroïde correspondant, mais également de préciser la forme de la surface à éluer.

Toutefois, dans plusieurs cas, le stéroïde est élué avec une fraction importante du colorant. Ce dernier étant en général acétylable, il est indispensable de l'éliminer. Plusieurs essais de chromatographie sur couche mince, sur différents supports et dans divers systèmes de solvants, n'ont pas donné de résultats satisfaisants (à l'exception de la séparation Rhodamine-Testostérone). Finalement, nous avons mis au point une courte chromatographie sur une micro-colonne de résine Dowex 50 X2 en solution éthanolique ce qui nous a permis d'obtenir la rétention complète des colorants avec une excellente récupération des stéroïdes.

### Partie expérimentale

Tous les solvants utilisés sont des réactifs pour analyse, redistillés. Le papier est le Schleicher & Schüll No. 2043a,  $8 \times 50$  cm. Le papier est d'abord lavé au méthanol et séché à l'air. Comme phase stationnaire, nous utilisons le propylène glycol à 50 % dans l'acétone, comme phase mobile, toluène-cyclohexane (4:9)<sup>2</sup>. La quantité de chaque colorant est de 10-20  $\mu\text{g}$ . Après la chromatographie, le papier est séché plusieurs heures, à la température ambiante, ensuite 1 h dans l'étuve à  $60^\circ$  afin d'éliminer les dernières traces de la phase stationnaire.

Les zones localisées sont éluées à l'éthanol absolu ( $2 \times 2$  ml); le solvant est ensuite évaporé sous azote. Le résidu sec est repris dans 0.1 ml d'éthanol et transféré sur une micro-colonne de  $5 \times 30$  mm chargée de Dowex 50 X2. L'élution du stéroïde se fait avec  $2 \times 2$  ml d'éthanol absolu. La résine est préparée avant l'emploi par traitement avec NaOH 1 N, puis avec le HCl 3 N, ensuite par lavage à l'eau et à l'éthanol<sup>3</sup>. Elle est conservée dans ce dernier solvant.

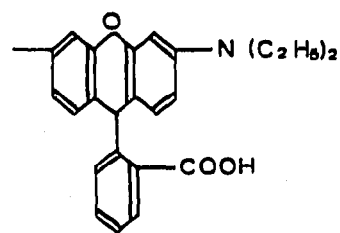
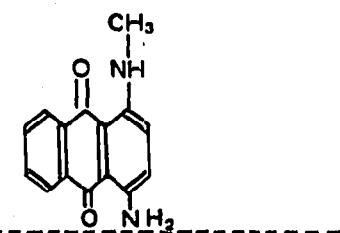

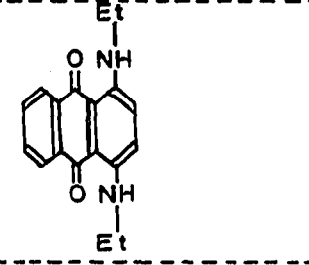
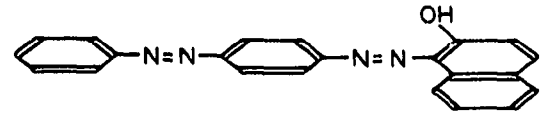
La chromatographie sur couche mince du mélange Rhodamine-Testostérone est faite sur des plaques MN-Kieselgel S-HR, lavées au préalable au méthanol et activées 1 h à  $110^\circ$ . Le solvant utilisé est chloroforme-acétone (8:2)<sup>4</sup>.

### Résultats et discussion

Les colorants utilisés sont rapportés dans le Tableau I. Le Tableau II indique les stéroïdes et leurs  $R_F$ , relatifs au colorant correspondant. La Figure 1 illustre les positions de ces substances sur le chromatogramme développé pendant 24 h à  $22^\circ$ . Fi-

## TABLEAU I

## NOMS ET FORMULES DES COLORANTS

Noms	Formules
Rhodamine	$(C_2H_5)_2N$ 
4-Amino-1-méthylamino anthraquinone (F <sub>11</sub> )	
<i>p</i> -Aminoazobenzol	
Sudan Bleu	
Oil Red (Sudan III)	

## TABLEAU II

*R<sub>F</sub>* DES STÉROIDES RELATIFS AUX COLORANTS

Stéroïde	Code	Colorant	<i>R<sub>F</sub></i> relatif (stéroïde/colorant)
Testostérone	T	Rhodamine	1.21
Déhydroisoandrosterone	DIA	F <sub>11</sub>	2.01
Pregnénolone	Pr	<i>p</i> -Aminoazobenzol	0.95
Androstènedione	A	Sudan Bleu	0.78
Progestérone	P	Oil Red	0.97 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> La progestérone est récupérée après 24 h dans une cuvette.

nalement, dans le Tableau III se trouvent réunies les données de récupération des stéroïdes après l'éluion du papier et après le passage par la colonne de résine. Ces chiffres ont été obtenus par le comptage de  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$  en scintillation liquide. Étant donné que ces récupérations sont presque quantitatives et que l'éluat est exempt de colorants, cette méthode est applicable aux stéroïdes neutres.

TABLEAU III  
RÉCUPÉRATION EN %

<i>Stéroïde</i>	<i>Récupération du papier</i>	<i>Récupération de la colonne</i>
T	102.5	— <sup>a</sup>
DIA	75.62	96.63
Pr	64.95	98.17
A	81	88.92
P	102.1	91.34

<sup>a</sup> Chromatographie sur couche mince et non sur colonne.

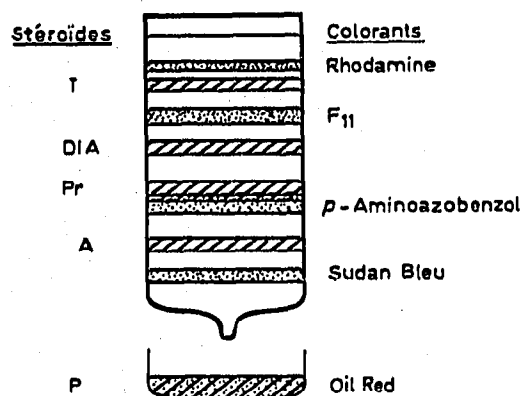


Fig. 1. Position des stéroïdes et des colorants sur le chromatogramme.

Nous remercions le Dr. R. NEHER, de Ciba A.G. Basel, pour le don de plusieurs colorants.

Ce travail a été subsidié par la Ford Foundation.

Laboratoire de Radiochimie, Faculté de Médecine,  
Université Catholique de Louvain, Louvain (Belgique)

MARIE-PAULE VAN DAMME  
P. A. OSINSKI

- 1 R. NEHER, C. MEYSTRE ET A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 42 (1959) 132.
- 2 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI ET E. H. KEUTMAN, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 769.
- 3 W. A. SCHROEDER, dans C. H. W. HIRS (Rédacteur), *Methods in Enzymology*, Vol. XI, Academic Press, New York, 1967, p. 355.
- 4 R. NEHER, dans E. STAHL (Rédacteur), *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, 1967, p. 324.

Reçu le 15 janvier 1971