

CHROM. 8797

## ÉTUDE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION DE 17-CÉTOSTÉROÏDES LIBRES ET CONJUGUÉS\*

MICHEL LAFOSSE, GÉRARD KÉRAVIS et MARC HENRI DURAND

Laboratoire de Chimie Organique Physique, U.E.R. Sciences, Université d'Orléans, 45045 Orléans CEDEX (France)

(Reçu le 15 juillet 1975; manuscrit modifié reçu le 10 octobre 1975)

---

### SUMMARY

#### *High-pressure liquid chromatography of free and conjugated 17-ketosteroids*

High-pressure liquid chromatography (HPLC) should be used more frequently in biomedical research because heavy molecules can be analysed at ambient temperature without derivatisation to volatile compounds. In this paper the separation of four free 17-ketosteroids, their ester sulfates and glucuronides by reversed-phase HPLC on a Micropak CH column is described. In order to improve the separation several parameters have been studied. Retention data allow comparison of the hydrophilic behaviour of free and conjugated steroids.

---

### INTRODUCTION

L'analyse des stéroïdes à des fins médicales ou scientifiques est réalisée principalement par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les stéroïdes, extraits des liquides biologiques, sont soumis à une hydrolyse nécessaire pour obtenir le stéroïde libre à partir de sa forme conjuguée. Ils sont souvent silylés et analysés à température élevée (200–250°). Les travaux les plus complexes sont réalisés sur colonnes capillaires et en couplant l'appareil de CPG à un spectrographe de masse<sup>1-5</sup>.

Depuis peu, certains stéroïdes hormonaux ont été analysés par chromatographie liquide haute pression (CLHP)<sup>6-10</sup>. Cette technique permet d'éviter les opérations chimiques de silylation et d'étudier les composés, en particulier les stéroïdes conjugués, tels qu'ils se trouvent dans les liquides biologiques<sup>11,12</sup>.

Nous étudions dans le présent travail la séparation par chromatographie de partage avec phases inversées de quatre stéroïdes libres et de leurs formes conjuguées, sulfates et glucuronides: androstérone (A), épiandrostérone (EA), étiocholanolone (E), déhydroépiandrostérone (DHEA) (Fig. 1). Nous examinerons l'action des différents paramètres sur la séparation en vue de l'améliorer.

---

\* Ce travail est réalisé dans le cadre de la Thèse de G. Kérvais.

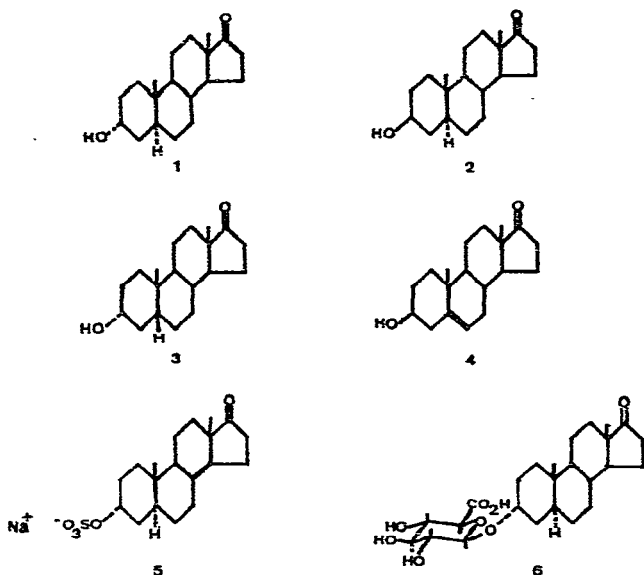


Fig. 1. Représentation des différentes molécules étudiées. 1 = Androstérone (A) ou 3 $\alpha$ -hydroxy 5 $\alpha$ -androstane 17-one; 2 = épiandrostérone (EA) ou 3 $\beta$ -hydroxy 5 $\alpha$ -androstane 17-one; 3 = étiolcholanolone (E) ou 3 $\alpha$ -hydroxy 5 $\beta$ -androstane 17-one; 4 = déhydroépiandrostérone (DHEA) ou 3 $\beta$ -hydroxy androstène-5 17-one; 5 = sulfate de sodium de l'androstérone (AS): représente les différents sulfates de stéroïdes étudiés; 6 = glucuronide de l'androstérone sous forme acide et non de sel de sodium (AG): représente les différents glucuronides étudiés.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'appareil utilisé, réalisé au laboratoire, est schématisé (Fig. 2). L'éluant eau-méthanol est dégazé par ébullition. La pompe Orlita DMP 1515, protégée par un filtre Nupro, assure la circulation du liquide sous des pressions allant de quelques bars à 100 bars environ. Les pulsations créées par cette pompe à membrane sont rendues négligeables par l'amortisseur de Halász.

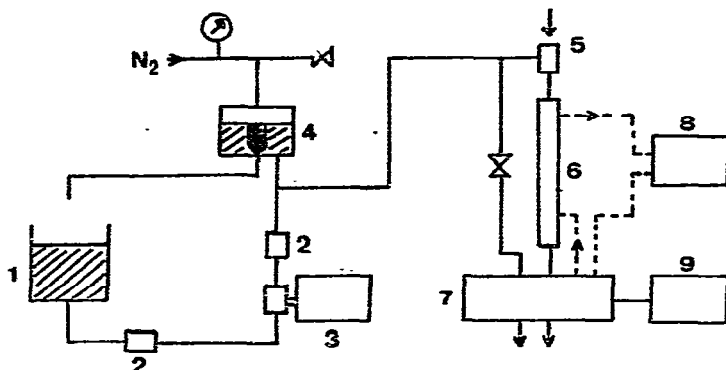


Fig. 2. Schéma de l'appareil CLHP. 1 = Réservoir de solvant; 2 = filtres; 3 = pompe; 4 = amortisseur de pulsations Halász; 5 = injecteur; 6 = colonne thermostatée; 7 = détecteur réfractométrique; 8 = bain thermostatique; 9 = enregistreur.

Les solutions méthanoliques de stéroïdes (1 g/l) sont introduites par injection de 2-5  $\mu$ l à l'aide de seringues Hamilton HP 305, 7105 N ou SGE 10 B LRD-3. Les essais réalisés avec cette dernière se sont révélés peu satisfaisants. L'injecteur (Fig. 3) réalisé au laboratoire reprend un système connu utilisant deux septa maintenus par des disques d'acier. Nous ajoutons un guide pour le corps de la seringue; ceci permet d'injecter toujours dans le même trou ce qui facilite le travail de la seringue et augmente la durée de vie du septum<sup>13</sup>.

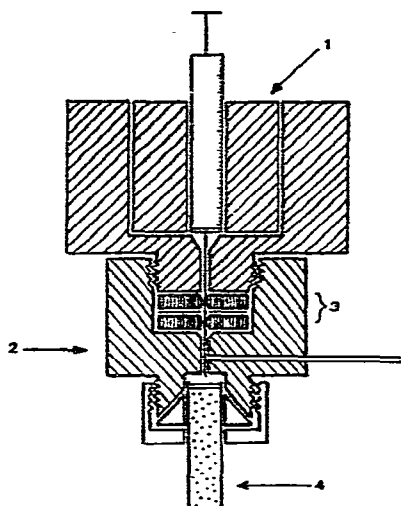


Fig. 3. Injecteur. 1 = Guide du corps de seringue; 2 = guide de l'aiguille; 3 = septa séparés par disques d'acier; 4 = colonne.

Le guide permet avec un seul septum de faire deux à trois fois plus d'injections qu'avec un injecteur sans guidage sous une pression pouvant aller jusqu'à 100 bars. Au delà de 100 bars il faut mettre deux septa.

La phase stationnaire de la colonne (longueur 25 cm, diamètre extérieur 3<sup>3</sup>/<sub>8</sub> mm) est une chaîne alkyle en C<sub>18</sub> greffée sur des grains de silice de 10  $\mu$ m (Micropak CH; Varian).

Les produits élués sont détectés par le réfractomètre différentiel Varian. La colonne et le détecteur sont maintenus à température constante. Cette précaution est importante pour obtenir la stabilité de la ligne de base. L'enregistrement est fait avec un appareil Hitachi utilisé sur la sensibilité 1 mV.

L'eau et le méthanol sont purifiés par distillation.

Les produits étudiés ont été fournis par Sigma: les quatre stéroïdes libres (A, E, EA et DHEA), les esters sulfates de sodium correspondants (AS, ES, EAS, DHEAS) (5 dans Fig. 1), les glucuronides de l'androstérone (AG), de l'étiocolanolone (EG) et de la DHEA (DHEAG) sous forme acide (6, Fig. 1).

Les Tableaux I et II donnent en fonction de la nature de l'éluant les volumes de rétention réduits  $V'_{R_i}$  de chaque stéroïde libre et conjugué pris séparément à 25°. Les valeurs sont calculées à partir de la distance de sortie de l'eau non retenue sur la phase stationnaire.

TABLEAU I

VOLUMES DE RÉTENTION RÉDUITS  $V'_R$  DES STÉROÏDES LIBRES À 25° EN FONCTION DE LA NATURE DE L'ÉLUANT EAU-MÉTHANOL

Eau (%)		$\delta_M$	$V'_R$ (ml)			
En masse	En volume*		DHEA	EA	E	A
20.14	16.6	14.25	0.38	0.44	0.46	0.51
27.45	23.0	14.8	0.68	0.81	0.85	0.96
36.21	31.0	15.4	1.24	1.54	1.63	1.85
45.98	40.2	16.2	3.00	3.82	4.30	5.00
49.43	43.6	16.4	3.87	4.98	6.05	7.03
50.60	44.8	16.5	3.96	5.08	6.08	7.06
55.77	49.8	16.95	10.9	15.6	19.6	23.2

\* Avant le mélange qui entraîne une réduction de volume.

TABLEAU II

VOLUMES DE RÉTENTION RÉDUITS  $V'_R$  DES STÉROÏDES CONJUGUÉS À 25° EN FONCTION DE LA NATURE DE L'ÉLUANT EAU-MÉTHANOL

Eau (%)		$\delta_M$	$V'_R$ (ml)						
En masse	En volume*		DHEAS	EAS	ES	AS	DHEAG	EG	AG
70.0	64.8	18.1	2.04	2.84	3.49	4.20	—	—	—
75.0	70.3	18.6	2.72	3.70	4.24	4.92	1.80	4.08	4.88
80.0	75.9	19.0	3.66	4.40	4.92	5.75	2.16	5.36	6.30

\* Avant le mélange qui entraîne une réduction de volume.

#### OPTIMISATION DE LA SÉPARATION

Le pouvoir de résolution  $R$  de la colonne pour deux composés en quantités sensiblement égales s'exprime en fonction du nombre de plateaux  $N$ , du facteur de sélectivité  $\alpha$  et du facteur de capacité  $k'$  par la relation classique:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'}$$

$N$  et  $k'$  sont relatifs au deuxième composé. Si l'on est en présence de plusieurs isomères dont la rétention est du même ordre de grandeur, ce sont les valeurs optimales de  $N$  et  $k'$  du premier et du dernier pic qui encadreront celles de l'ensemble.

Recherchons quelles sont les valeurs de  $N$ ,  $\alpha$  et  $k'$  qui entraînent un pouvoir de résolution au moins égal à l'unité.

#### Influence du facteur de capacité $k'$

Pour qu'on puisse au moins envisager l'étude d'un problème de séparation il faut que les distances de rétention des pics ne soient ni trop petites ni trop grandes. Cela se traduit par des valeurs du facteur  $k' = V'_R/V_M^*$  que l'on considère habituellement devoir être comprises entre 1 et 10. Nous avons cherché quelles sont les compositions de l'éluant eau-méthanol satisfaisant à cette condition. Le Tableau III montre

\*  $V_M$  = volume mort de la colonne.

TABLEAU III

FACTEUR DE CAPACITÉ  $k'$  DE LA DEHYDROÉPIANDROSTÉRONNE ET DE L'ANDROSTÉRONNE EN FONCTION DE LA NATURE DE L'ÉLUANT EAU-MÉTHANOL

Eau en masse (%)	$k'_{DHEA}$	$k'_A$
20.14	0.5	0.7
27.45	0.9	1.3
36.21	2.0	2.5
45.98	3.6	5.9
49.43	5.3	9.8
50.60	5.7	10.4
55.77	14.5	30.9

que  $k'$  croît rapidement avec le taux d'eau dans le mélange car  $k'$  est lié au coefficient de partage  $K$  qui est lui-même fonction exponentielle de ce taux comme nous le rappe-  
lons ci-après.

On voit qu'il faut éliminer les éluants à 20.14% et à 27.45% d'eau car les échanges entre phases sont trop courts et l'éluant à 55.77% d'eau qui provoque une trop forte rétention.

#### Influence du facteur de sélectivité $\alpha$

La séparation exige  $\alpha > 1$  ce qui correspond à des coefficients de partage différents puisque  $\alpha = K_i/K_j$ . Le seul paramètre est ici encore la composition de l'éluant.

Le coefficient de partage  $K_i$  d'un soluté  $i$  entre deux phases liquides stationnaire  $S$  et mobile  $M$  non miscibles est lié à la "polarité" ou "paramètre de solubilité  $\delta$  de Hildebrand" de chacun de ces trois éléments respectivement  $\delta_i$ ,  $\delta_S$  et  $\delta_M$  par la relation suivante<sup>14</sup>:

$$\ln K_i = \frac{\bar{V}_i}{RT} [(\delta_i - \delta_M)^2 - (\delta_i - \delta_S)^2]$$

où  $\bar{V}_i$  est le volume molaire du soluté  $i$ . Nous étudions les systèmes isocratiques eau-méthanol donc  $\delta_M$  est seul variable:

$$\ln K_i = \frac{\bar{V}_i}{RT} (\delta_M^2 - 2\delta_i\delta_M + 2\delta_i\delta_S - \delta_S^2)$$

Le volume de rétention réduit est lié au coefficient de distribution  $K_i$  par la relation fondamentale:  $V'_{R_i} = K_i V_S$  ( $V_S$  = volume de phase stationnaire) et s'exprimera en régime isocratique comme une fonction exponentielle de la "polarité" de l'éluant  $\delta_M$

$$V'_{R_i} = V_S \exp \frac{\bar{V}_i}{RT} (\delta_M^2 - 2\delta_i\delta_M + 2\delta_i\delta_S - \delta_S^2)$$

La polarité de l'éluant  $\delta_M$  est calculée à partir de celles du méthanol ( $\delta = 12.9$ ) et de l'eau ( $\delta = 21$ ) selon la loi linéaire des mélanges<sup>14</sup>:

$$\delta_M = \frac{(21 - 12.9) x}{100} + 12.9$$

$x$  étant le pourcentage en volume de l'eau qui va constituer le mélange.

Ainsi le diagramme de la Fig. 4 représentant les volumes de rétention en fonction du pourcentage d'eau exprime la variation des coefficients de partage de chaque stéroïde en fonction de la polarité de l'éluant. Cette variation suit une loi exponentielle.

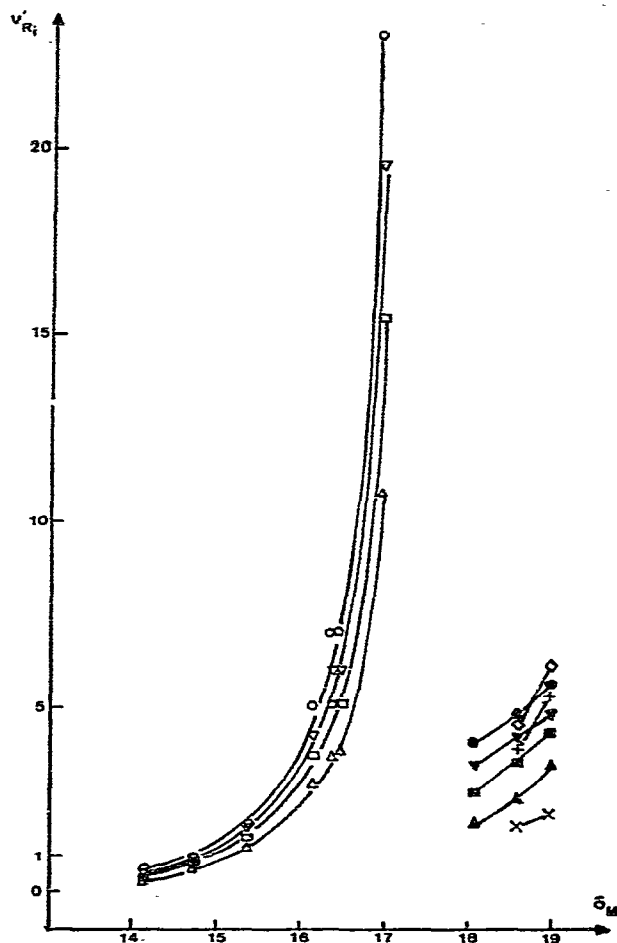


Fig. 4. Volume de rétention réduit  $V'_{Ri}$  en fonction de la polarité de l'éluant  $\delta_M$ .  $\Delta$  = DHEA,  $\square$  = EA,  $\nabla$  = E,  $\circ$  = A,  $\blacktriangle$  = DHEAS,  $\blacksquare$  = EAS,  $\blacktriangledown$  = ES,  $\bullet$  = AS,  $\times$  = DHEAG,  $+$  = EG,  $\diamond$  = AG.

Le facteur de sélectivité  $\alpha$ , donné au Tableau IV pour chaque couple de composés voisins, montre que l'influence de  $\delta_M$  est différente selon les stéroïdes libres et les stéroïdes conjugués (Fig. 5). En effet l'augmentation de  $\delta_M$  provoque une amélioration de la séparation des stéroïdes libres et l'on choisira un mélange d'environ 50% en masse d'eau.

Par contre si l'on veut obtenir  $\alpha_{i,j} > 1.2$  pour les conjugués il faut travailler avec un éluant à 70% d'eau en masse. En effet à 60% les solutés sortent dans la traînée du solvant avec un facteur de capacité inférieur à 1, alors qu'à 70% ce facteur de capa-

TABLEAU IV

FACTEUR DE SÉLECTIVITÉ  $\alpha_{i,j}$  DE DEUX COMPOSÉS CONSÉCUTIFS EN FONCTION DE LA POLARITÉ  $\delta_M$  DE LA PHASE MOBILE

1 = DHEA; 2 = EA; 3 = E; 4 = A; 5 = DHEAS; 6 = EAS; 7 = ES; 8 = AS; 9 = DHEAG; 10 = EG; 11 = AG.

$\delta_M$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$	$\alpha_{3,4}$	$\alpha_{5,6}$	$\alpha_{6,7}$	$\alpha_{7,8}$	$\alpha_{9,10}$	$\alpha_{10,11}$
14.25	1.16	1.04	1.11					
14.8	1.20	1.04	1.13					
15.4	1.24	1.06	1.13					
16.2	1.27	1.13	1.16					
16.4	1.29	1.21	1.16					
16.5	1.28	1.20	1.16					
16.95	1.43	1.26	1.18					
18.1				1.39	1.23	1.20		
18.6				1.36	1.14	1.16	2.26	1.20
19.0				1.20	1.12	1.17	2.48	1.17

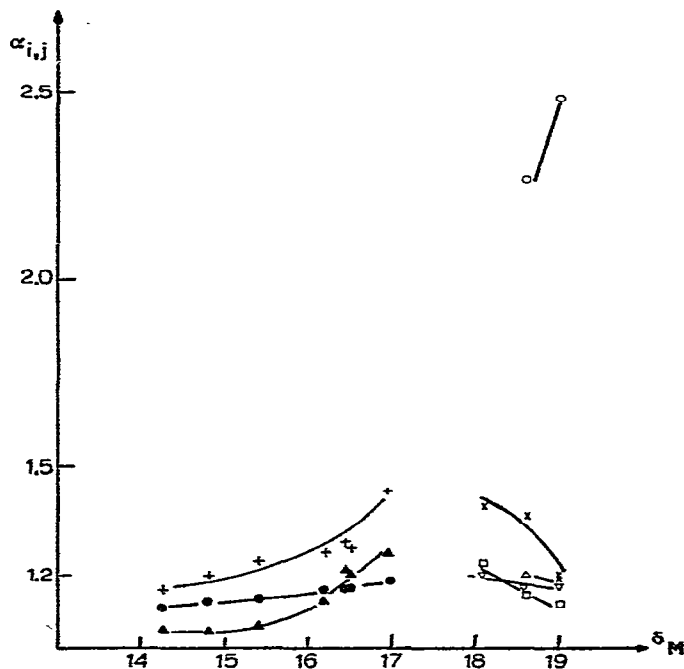


Fig. 5. Variation de  $\alpha_{i,j}$  de deux stéroïdes consécutifs en fonction de la polarité de l'éluant. Notation voir Tableau IV. + =  $\alpha_{1,2}$ ;  $\blacktriangle$  =  $\alpha_{2,3}$ ;  $\bullet$  =  $\alpha_{3,4}$ ;  $\times$  =  $\alpha_{5,6}$ ;  $\square$  =  $\alpha_{6,7}$ ;  $\nabla$  =  $\alpha_{7,8}$ ;  $\circ$  =  $\alpha_{9,10}$ ;  $\triangle$  =  $\alpha_{10,11}$ .

cité est compris dans les limites raisonnables de 2-5 et de plus le facteur de sélectivité  $\alpha$  est d'environ 1.2. Un taux plus élevé d'eau diminue  $\alpha$  et augmente la viscosité de l'éluant. Il est curieux de noter que le glucuronide de DHEA a un comportement différent des deux autres composés qui le suivent et l'augmentation de  $\delta_M$  améliore sa séparation par rapport à ces deux composés.

Selon les grandeurs relatives des volumes molaires  $\bar{V}_i$  et  $\bar{V}_j$ , la variation exponentielle de  $\alpha_{i,j}$  peut être différente:

$$\alpha_{i,j} = \exp \frac{1}{RT} [(\bar{V}_j - \bar{V}_i) \delta_M^2 + (\bar{V}_j \delta_j - \bar{V}_i \delta_i) 2(\delta_S - \delta_M) - (\bar{V}_j - \bar{V}_i) \delta_S^2]$$

Pour un éluant de polarité donnée  $\delta_M$ , la séparation de deux composés de structures proches et de polarité semblable ( $\delta_j \approx \delta_i$ ) est régie par leur différence de volume molaire selon une loi simple ( $A =$  facteur constant)

$$\alpha_{i,j} = \exp \frac{A}{RT} (\bar{V}_j - \bar{V}_i)$$

De même si leurs volumes molaires sont voisins ( $V_j \approx V_i$ ), la séparation est due à leur différence de polarité ( $B =$  facteur constant):

$$\alpha_{i,j} = \exp \frac{B}{RT} (\delta_j - \delta_i)$$

### *Influence de l'efficacité*

Le pouvoir de résolution  $R$  d'une colonne donnée pour deux produits dépend également de l'aptitude qu'a cette colonne à délivrer des pics fins.

L'étude des paragraphes précédents montre que des taux d'eau de l'ordre de 50% et 70% sont respectivement nécessaires pour séparer les stéroïdes libres et les stéroïdes conjugués entre eux.

La relation exprimant la résolution en fonction du nombre de plateaux effectifs  $N_{\text{eff}}$  est de la sélectivité  $\alpha$

$$R = \frac{\sqrt{N_{\text{eff}}}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha}$$

permet de connaître l'efficacité  $N_{\text{eff}}$  suffisante pour avoir  $R = 1$  et  $\alpha = 1.2$ . Dans le cas présent il faut au moins 576 plateaux soit 2300 plateaux au mètre. Cette efficacité nécessaire n'est pas considérable car la valeur choisie pour  $\alpha$  est grande<sup>15</sup>. Mais on remarque d'après le Tableau V que l'efficacité  $N_{\text{eff}}$  relative à la DHEA ne dépasse guère 2500 plateaux au mètre, cette valeur étant sensiblement la même pour les autres stéroïdes libres. C'est pourquoi pour avoir les meilleurs conditions de séparation en un temps minimum, on doit travailler à un débit d'environ 0.40 ml/min pour une efficacité suffisante.

TABLEAU V

NOMBRE DE PLATEAUX EFFECTIFS PAR MÈTRE DE COLONNE MICROPAK CH RELATIFS À LA DHEA EN FONCTION DE LA COMPOSITION DE L'ÉLUANT EAU-MÉTHANOL ET DU DÉBIT À 25°

Eau en masse (%)	Débit (ml/min)	$N_{\text{eff}}/m$ (rel. à la DHEA)
49.43	0.35	2700
	0.49	1600
50.60	0.49	1680



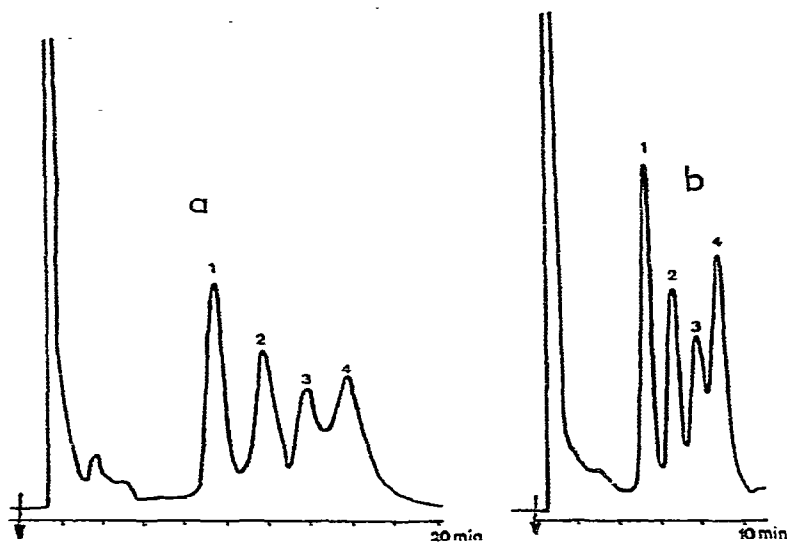


Fig. 6. Chromatogrammes des quatre stéroïdes libres à 25° (a) et à 45° (b). Colonne, Micropak CH (25 cm  $\times$  3 $\frac{3}{8}$  mm). Éluant, eau-méthanol (50.6% eau en masse). Débit, 0.49 ml/min à 25° et 0.55 ml/min à 45°. Volume injecté, 4  $\mu$ l. 1 = DHEA, 2 = EA, 3 = E, 4 = A.

Les chromatogrammes de la Fig. 6a représentent la séparation optimale des stéroïdes libres.

La séparation des sulfates et des glucuronides entre eux est effectuée avec un éluant à 70–80% d'eau (Figs. 7a et 7c). Signalons que pour un tel éluant de viscosité élevée pour la colonne Micropak, il faut opérer à des pressions de 150 bars pour de faibles débits.

TABLEAU VI

VARIATION AVEC LA TEMPÉRATURE DES GRANDEURS DE RÉTENTION DES STÉROÏDES LIBRES

Température (°C)	Composé	Polarité de l'éluant			
		16.5		16.95	
		$V'_R$	$\alpha_{DHEA,1}$	$V'_R$	$\alpha_{DHEA,1}$
25	DHEA	3.96	1	10.9	1
	EA	5.08	1.28	15.6	1.43
	E	6.08	1.54	19.6	1.80
	A	7.06	1.78	23.2	2.13
45	DHEA	2.58	1	6.12	1
	EA	3.28	1.27	8.52	1.39
	E	3.92	1.51	11.40	1.86
	A	4.48	1.73	13.68	2.23

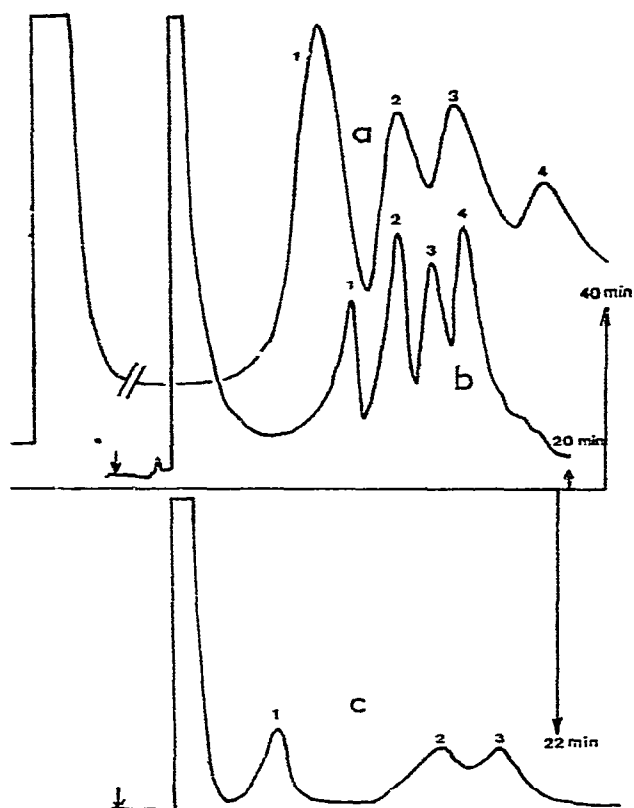


Fig. 7. Chromatogrammes des stéroïdes conjugués esters sulfates (a) et (b), et glucuronides (c). Colonne, Micropak CH (25 cm  $\times$  3<sup>3</sup>/<sub>8</sub> mm). Éluant, eau-méthanol (a et b 80% d'eau; c 70% d'eau). Débit, a 0.20 ml/min; b et c 0.30 ml/min. Volume injecté, a et b, 4  $\mu$ l; c, 1  $\mu$ l. Température, a et c, 25°; b, 45°. Pics, a et b: 1 = DHEAS, 2 = EAS, 3 = ES, 4 = AS, c: 1 = DHEAG, 2 = EG, 3 = AG.

#### *Influence de la température*

Ses effets sont différents et plus complexes que ceux observés en CPG. En CPG, le rôle de la tension de vapeur des solutés fait que très souvent l'augmentation de la température provoque un abaissement de la résolution et conduit à un temps de rétention plus court. En CLHP, la température a une influence à la fois sur la viscosité du fluide mais aussi sur la dissolution dans la phase mobile et dans la phase stationnaire<sup>7,16</sup>. Nous avons réalisé la séparation des quatre stéroïdes libres et des quatre esters sulfates à 45°.

Le volume chassé de la pompe à chaque pulsation est conservé. Comme la viscosité de l'éluant est plus faible à 45° qu'à 25°, ce volume constant va se répartir de façon plus importante dans la colonne et moindre dans l'amortisseur Halász si l'on conserve la pression d'azote constante. Ceci explique que l'augmentation de température provoque dans notre système une vitesse ou un débit de l'éluant supérieur en sortie de colonne, tous les autres réglages étant maintenus identiques.

Le Tableau VI exprime la variation du volume de rétention de chaque stéroïde libre avec la température. Lorsque la température augmente on constate que  $V'_R$  diminue ainsi que le coefficient de partage lié par la relation :

$$V'_R = K_l V_S$$

où  $V_S$  est le volume constant de phase stationnaire.

Par contre la rétention relative à la DHEA ne change guère. La température a donc pour effet de diminuer pour chaque composé la dissolution dans la phase stationnaire par rapport à celle dans la phase mobile. Mais cet effet étant sensiblement identique pour tous les composés on observe une aussi bonne séparation en un temps plus court (Figs. 6b et 7b), car l'efficacité relative à la DHEA est très peu abaissée ( $N_{eff/m}(25^\circ) = 1680$ ,  $N_{eff/m}(45^\circ) = 1252$ ).

#### COMPARAISON DU CARACTÈRE HYDROPHILE-LIPOPHILE DES STÉROÏDES LIBRES ET CONJUGUÉS

Le graphique de la Fig. 4 illustrant les Tableaux I et II conduit aux remarques suivantes :

Le coefficient de partage des stéroïdes conjugués est inférieur à celui des stéroïdes libres puisque leur volume de rétention réduit est inférieur. En conséquence les conjugaisons sulfate et glucuronide confèrent à la molécule de stéroïde une moins grande solubilité dans la phase stationnaire. Les stéroïdes conjugués sont plus hydrophiles.

L'augmentation du taux d'eau dans la phase mobile eau-méthanol accentue la dissolution des conjugués dans la phase stationnaire. Le méthanol se présente donc comme un bon solvant de ces molécules.

Lorsque l'éluant est très riche en eau on constate que la nature du stéroïde et de la conjugaison donnent des résultats différents. Aussi le glucuronide de DHEA est plus hydrophile que l'ester-sulfate correspondant. C'est l'inverse, mais avec moins de différence pour l'étiocolanolone et l'androstérone.

En général l'ordre croissant du caractère lipophile ( $K_l$  augmentant) est le même pour les stéroïdes libres que pour les conjugués DHEA, épiandrostérone, étiocolanolone et androstérone.

#### CONCLUSIONS

La chromatographie liquide-liquide en phases inversées a permis de séparer des stéroïdes isomères sans transformations chimiques. La séparation de chaque série de composés conjugués ou libres a été effectuée séparément. Pour séparer tous les composés ensemble il faut d'abord considérer que les sulfates sont des sels de sodium et les glucuronides sont sous forme acide organique. Or dans le corps humain, les composés sont des sels de sodium et il a été prouvé que le sel de sodium du glucuronide est plus soluble dans le butanol que l'acide libre<sup>17</sup>, ce qui laisse à penser que le sel de sodium du glucuronide serait plus soluble en milieu hydroalcoolique que le glucuronide. Pour les sels de sodium on aurait une courbe  $V'_R = f(\delta_M)$  située en dessous de celle des acides. Un gradient d'éluant serait sans doute possible avec des calculs

comme ceux de Snyder relatifs à l'adsorption<sup>18</sup> mais nous n'avons pu l'essayer à cause de l'amortisseur Halász et du détecteur réfractométrique. Notons qu'en système à phases inversées le gradient d'éluion va souvent du mélange méthanol-eau ( $12.9 < \delta_M < 21$ ) à méthanol pur ( $\delta_M = 12.9$ ) c'est à dire en baissant la "polarité" de l'éluant.

## RÉSUMÉ

La chromatographie liquide haute pression (CLHP) mérite sans doute d'être plus utilisée qu'elle ne l'est dans le domaine médical parce que l'on peut analyser à température ambiante des molécules lourdes sans les transformer par réactions chimiques en composés volatils. Ce travail expose la séparation de quatre 17-cétostéroïdes libres et des esters sulfates et glucuronides correspondants par CLHP par la technique du partage avec des phases inversées sur une colonne Micropak CH. Les différents paramètres sont étudiés pour améliorer la séparation. Les données de rétention permettent de comparer le caractère hydrophile des stéroïdes libres et conjugués.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. Novotny et A. Zlatkis, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 346.
- 2 B. F. Maume et J. A. Luyten, *J. Chromatogr. Sci.*, 11 (1973) 607.
- 3 A. L. German et E. C. Horning, *J. Chromatogr. Sci.*, 11 (1973) 76.
- 4 E. C. Horning et M. G. Horning, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 129.
- 5 F. L. Berthou, D. Picart, L. G. Bardou et H. H. Floch, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 662.
- 6 S. Siggia et R. A. Dishman, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1223.
- 7 P. R. Brown, *High Pressure Liquid Chromatography, Biochemical and Biomedical Applications*, Academic Press, New York, Londres, 1973, pp. 55, 152-156.
- 8 J. F. K. Huber, C. A. M. Meijers et J. A. R. J. Hulsman, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 111.
- 9 R. A. Henry, J. A. Schmit et J. F. Dieckman, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 513.
- 10 F. A. Fitzpatrick et S. Siggia, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 2211.
- 11 M. W. Anders et J. P. Latorre, *J. Chromatogr.*, 55 (1971) 409.
- 12 S. van der Wal et J. F. K. Huber, *J. Chromatogr.*, 102 (1974) 353.
- 13 J. N. Done, J. H. Knox et J. Loheac, *Applications of High Speed Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 1974, p. 13.
- 14 B. L. Karger, L. R. Snyder et C. Horvath, *An Introduction to Separation Sciences*, Wiley-Interscience, New York, 1973, p. 269.
- 15 B. L. Karger dans J. J. Kirkland (Éditeur), *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 18.
- 16 R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Varian S.A., Orsay, 1975, p. 151.
- 17 H. E. Hadd et R. T. Blickenstaff, *Conjugates of Steroid Hormones*, Academic Press, New York, Londres, 1969, p. 3.
- 18 L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 195.