

CHROM. 9919

## Note

### Mise au point du dosage simultané de l'éthynyl-oestradiol et de l'acétate de trenbolone® dans les aliments composés au moyen du couplage chromatographie sur couche mince—chromatographie en phase gazeuse

J. M. WAL, J. C. PELERAN et G. BORIES

*I.N.R.A.—Laboratoire de Recherches sur les Additifs Alimentaires, 180, chemin de Tournefeuille, 31 300-Toulouse (France)*

(Reçu le 8 septembre 1976; manuscrit modifié reçu le 20 décembre 1976)

L'acétate de trenbolone® (17 $\beta$ -acetoxy-oestra-4,9,11-trien-3-one) ou TBA est un stéroïde de synthèse aux propriétés anabolisantes. En implant sous-cutané, il entraîne une amélioration des performances des animaux d'élevage, qu'il soit administré seul<sup>1,2</sup>, ou en association avec l'éthynyl-oestradiol (EE<sub>2</sub>)<sup>3</sup>. L'adjonction à l'aliment de l'association TBA-EE<sub>2</sub> (2 ppm + 2 ppm) a été proposée en vue de favoriser la croissance, augmenter l'efficacité alimentaire et améliorer la qualité de la carcasse chez le porc<sup>4</sup>. L'utilisation comme additifs de ces deux substances soulève le problème de leur détection et de leur dosage dans les milieux complexes, à de faibles niveaux. Bien que des méthodes radio-immunologiques très sensibles aient été décrites<sup>5</sup> pour le dosage dans les milieux biologiques, le besoin subsiste d'une méthode plus simple à mettre en oeuvre pour l'évaluation simultanée de ces deux substances dans les aliments. Une méthode fluorimétrique associée à une séparation par chromatographie sur couche mince a été proposée<sup>6</sup> pour leur dosage simultané dans des milieux simples. La méthode décrite ici permet le dosage simultané des deux stéroïdes dans les aliments composés au niveau du ppm; elle est basée sur l'utilisation combinée de la chromatographie sur couche mince et de la chromatographie en phase gazeuse.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tous les solvants utilisés sont purs pour analyse et redistillés. TBA et EE<sub>2</sub> standards ainsi que les produits tritiés correspondants [6,7-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]TBA (50 Ci/mM) et [6,7-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]EE<sub>2</sub> (55 Ci/mM) ont été fournis par Roussel-Uclaf (Romainville, France). Les mesures de radioactivité ont été effectuées en scintillation liquide dans le mélange toluène-PPO-POPOP.

### Extraction

Dix grammes d'aliment granulé standard pour porc sont broyés finement. L'extraction des hormones est réalisée par deux fois 50 ml de chloroforme au moyen d'un broyeur de type Polytron ou Ultra-Turrax. Après filtration sur verre fritté No. 2, les extraits chloroformiques sont évaporés sous vide. Le résidu est repris par 90 ml d'acétonitrile saturé d'hexane dans une ampoule à décanter de 250 ml. Après addition

de 25 ml d'hexane, agitation durant 3 min suivie d'une décantation durant 1 h, la phase acétonitrile est recueillie puis évaporée à sec sous vide.

#### *Chromatographie sur couche mince*

L'extrait ainsi délipidé est repris par quatre fois 100  $\mu$ l de chloroforme et déposé sur plaque (20 cm  $\times$  20 cm) de gel de silice (Kieselgel G, Merck) de 0.25 mm d'épaisseur. Deux spots du mélange TBA-EE<sub>2</sub> standards sont déposés de part et d'autre de la bande de dépôt d'extrait, à titre de témoin. L'élution est effectuée au moyen du mélange hexane-éther éthylique-chlorure de méthylène (4:3:2). Le TBA standard est localisé par la fluorescence produite par excitation sous lumière ultra violette (254 nm); une bande est délimitée, en prenant soin de ménager une marge de 0.5 cm au dessus et au dessous des taches témoin de TBA. La silice est grattée, recueillie dans un entonnoir obturé par un tampon de laine de verre, puis les hormones sont éluées par trois fois 10 ml de chloroforme. Après évaporation partielle sous vide, transfert dans un tube à fond conique, puis évaporation complète sous courant d'azote, le résidu est repris par 100  $\mu$ l de chloroforme.

#### *Chromatographie en phase gazeuse*

1  $\mu$ l de la solution chloroformique est analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Packard 2101) dans les conditions suivantes: colonne, verre (Pyrex), 1.5 m  $\times$  1/4 in., silanisée (triméthylchlorosilane); support, Supelcoport (80-100 mesh) (Supelco Bellafonte, Pa., États-Unis); phase, SE-30, 3%; conditionnement, 48 h sous azote à 340°; gaz vecteur, azote, 30 ml/min; détection, ionisation de flamme (H<sub>2</sub>, 30 ml/min; air, 350 ml/min); température, injecteur 250°, détecteur 300°; programmation de température, 240° pendant 3 min, puis 5°/min jusqu'à 290° et 5 min à 290°; intégrateur Infotronics Type 204.

Les concentrations en TBA et EE<sub>2</sub> sont établies par comparaison avec un mélange standard de ces substances, de concentration connue et de valeur avoisinante. Les surfaces des pics sont déterminées par intégration tangentielle.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Dans les conditions décrites, le TBA révélé par fluorescence sous lumière UV a un  $R_F$  de 0.32. L'EE<sub>2</sub> chromatographié dans des conditions identiques et révélé par pulvérisation de permanganate de potassium a un  $R_F$  comparable (0.29). En pratique, la seule révélation du TBA par fluorescence permet ainsi, si l'on prend la précaution de ménager une marge de 0.5 cm de part et d'autre de la tache fluorescente, la délimitation et le grattage d'une bande de chromatogramme unique suffisamment large pour englober les deux substances. Cette façon de procéder a d'ailleurs été justifiée par l'étude des taux de récupération.

Les taux de récupération des hormones après extraction et purification en CCM ont été déterminés au moyen de TBA et EE<sub>2</sub> tritiés. Des surcharges d'environ 0.05  $\mu$ Ci (0.25 ng) de [<sup>3</sup>H]TBA et de [<sup>3</sup>H]EE<sub>2</sub> ont été incorporées séparément au même aliment broyé renfermant 2 ppm de chacune de ces substances non radioactives. Le radiochromatogramme obtenu (Fig. 1) montre que le comportement chromato-

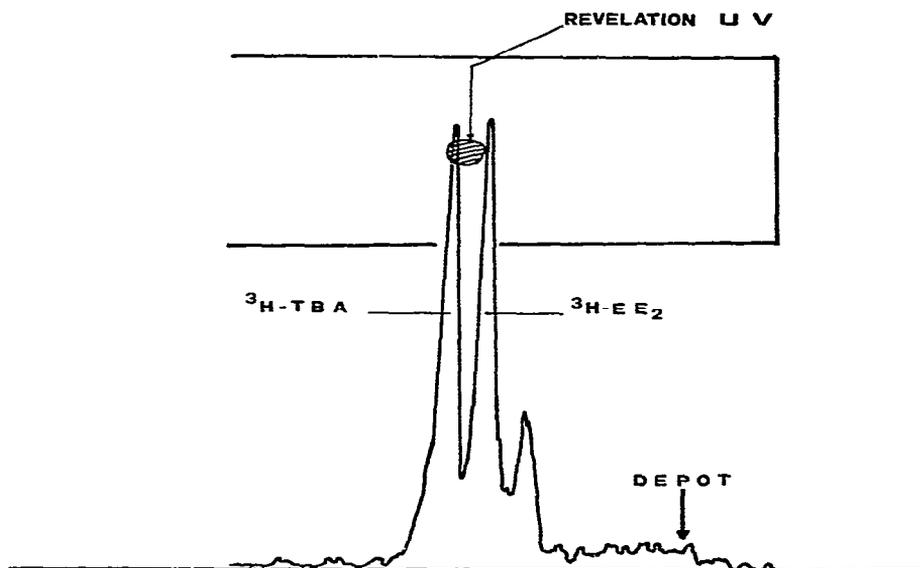


Fig. 1. Radiochromatogramme d'un extrait d'aliment supplémenté à 2 ppm d'éthynyl-oestradiol ( $\text{EE}_2$ ) + 2 ppm d'acétate de trenbolone® (TBA) et surchargé avec  $\text{EE}_2$  et TBA tritiés. En regard figure la tache du TBA révélé par fluorescence après excitation en lumière ultra violette.

graphique des produits tritiés, dans les conditions décrites, est identique à celui des hormones non marquées.

Après extraction et purification en CCM les pourcentages de radioactivité récupérés sont de: pour le TBA,  $m = 88.6$ ,  $s = 2.31$ ,  $c = 2.6\%$ ; pour l' $\text{EE}_2$ ,  $m = 87.3$ ,  $s = 2.28$ ,  $c = 2.6\%$  (où  $m$  est la moyenne,  $s$  l'écart type et  $c$  le coefficient de variation  $s/m$ , calculés sur six mesures).

La valeur élevée et la reproductibilité des taux de récupération rend inutile l'utilisation des radioéléments pour la mise en oeuvre pratique du dosage.

#### *Chromatographie en phase gazeuse*

Les chromatogrammes en phase gazeuse obtenus à partir d'un mélange de TBA et d' $\text{EE}_2$  standards en solution chloroformique (Fig. 2a) montrent qu'il y a séparation complète des deux hormones. Les temps de rétention relatifs, par rapport au pic de cholestérol pris comme référence, sont de 0.71 pour le TBA et de 0.56 pour l' $\text{EE}_2$ . La réponse spécifique est comparable pour les deux hormones. La linéarité de la réponse a été vérifiée pour des doses injectées de 100–400 ng. Compte tenu de ces éléments et malgré le travail en programmation de températures élevées, il n'est pas nécessaire de dérivatiser ces substances et le travail en mono-colonne est satisfaisant. Bien que la zone de linéarité englobe les gammes de concentrations devant être rencontrées dans la pratique, pour plus de sécurité, et pour éviter l'inconvénient des absorptions non spécifiques aux plus faibles concentrations, l'injection de l'échantillon est suivie d'une injection du mélange standard à concentration voisine. La reproductibilité de l'analyse en CPG a été testée sur six mesures du même extrait provenant d'un échantillon d'aliment supplémenté à 2 ppm de TBA et 2 ppm d' $\text{EE}_2$ . La

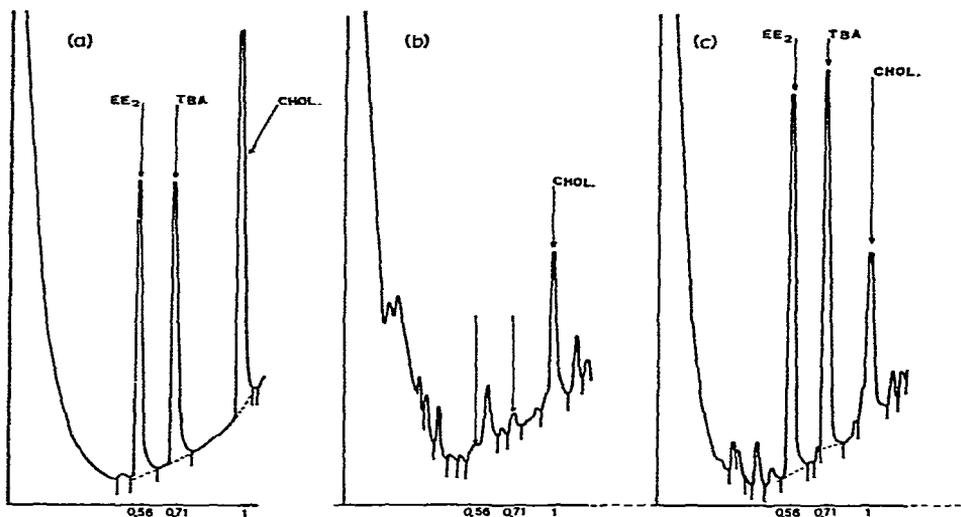


Fig. 2. (a) Chromatogramme en phase gazeuse d'un mélange standard d'éthynyl-oestradiol ( $EE_2$ ) et d'acétate de trenbolone<sup>®</sup> (TBA):  $0.16 \mu\text{g} + 0.16 \mu\text{g}$  dans  $1 \mu\text{l}$  de chloroforme. Les temps de rétention relatifs par rapport au cholestérol (CHOL.) injecté en même temps comme référence figurent en abscisse au niveau de chaque pic. (b) Chromatogramme en phase gazeuse d'un extrait d'aliment témoin pour porcs. (c) Chromatogramme en phase gazeuse d'un extrait du même aliment supplémenté à 2 ppm de TBA + 2 ppm de  $EE_2$ .

variabilité, exprimée par le coefficient de variation, est de 1.16% pour le TBA et 2.75% pour l' $EE_2$ .

#### Application à l'aliment

Dans les conditions décrites, les chromatogrammes en phase gazeuse obtenus avec des extraits, d'une part d'aliment témoin pour porcs, d'autre part du même aliment supplémenté à 2 ppm de TBA et à 2 ppm d' $EE_2$ , sont respectivement représentés aux Fig. 2b et 2c. Comme dans le cas de mélange standard, la séparation est complète, la zone de linéarité de la réponse s'étendant de 1-4 ppm. L'analyse de l'aliment témoin met en évidence un composé ayant le même temps de rétention que le TBA. Cette interférence qui détermine la sensibilité de la méthode se relève être inférieure à 5% pour tous les aliments testés. Dans ces conditions, l'évaluation statistique globale de cette méthode de dosage a été effectuée. Elle tient compte de la variabilité de la phase d'extraction et de purification en CCM et de celle de l'analyse et du dosage proprement dits en CPG. Pour une valeur moyenne de 2 ppm, l'écart type et le coefficient de variation sur six mesures valent: pour le TBA,  $s = 0.057$ ,  $c = 2.8\%$ ; pour l' $EE_2$ ,  $s = 0.076$ ,  $c = 3.8\%$ .

#### CONCLUSION

Les techniques d'incorporation à l'aliment et le conditionnement de l'aliment en granulés imposent à ces hormones des contraintes thermiques pouvant entraîner leur dégradation. Un contrôle en cours de fabrication et à l'issue de celle-ci s'impose donc. Les faibles doses incorporées et le respect d'un strict équilibre entre les activités

androgènes et oestrogènes nécessitent une méthode de dosage spécifique et sensible. Le couplage d'une purification en CCM et d'une analyse en CPG répond à ces impératifs en y joignant la simplicité et la rapidité nécessaires à la mise en oeuvre en routine.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. Beranger et C. Malterre, *C.R. Séances Soc. Biol. Paris*, 162 (1968) 1157.
- 2 P. van der Wal, P. L. M. Berende et J. E. Sprietsma, *J. Anim. Sci.*, 41 (1975) 978.
- 3 J. A. Grandadam, J. P. Scheid, A. Jobard, H. Dreux et J. M. Boissou, *J. Anim. Sci.*, 41 (1975) 969.
- 4 J. A. Grandadam, A. Jobard, R. Deroy, J. P. Scheid et H. Dreux, *Comm. XXe Congrès mondial vétérinaire, Salonique, 1975*.
- 5 H. Karg, H. J. Kyrein et B. Hoffmann, *J. Anim. Sci.*, 37 (1973) 256.
- 6 K.-L. Oehrle, K. Vogt et B. Hoffmann, *J. Chromatogr.*, 114 (1975) 244.