

# HORMONES STEROIDES DE LA SURRENALE DE RAT: ANALYSE DES 18-HYDROXYCORTICOSTEROIDES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE ET PAR FRAGMENTOGRAPHIE DE MASSE

M. PROST\* et B. F. MAUME†

Centre de Biochimie de la Différenciation Cellulaire (Directeur, P. Padiou) Université de Dijon,

\* Laboratoire d'Application en Chromatographie Gazeuse et en Spectrométrie de Masse, Faculté  
de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21033-Dijon,

† Laboratoire de Biochimie Générale, Faculté des Sciences, 6 boulevard Gabriel, 21000-Dijon, France

(Received 7 August 1973)

## SUMMARY

Adrenal 18-hydroxycorticosteroids as MO-TMS derivatives have been analyzed by c.g.l.-MS and by mass fragmentography. Experimental conditions have been found where the equilibrium between the 20-oxo and the hemiacetal form is completely shifted towards the 20-oxo form so that each steroid gives only one c.g.l. peak identified as the 20-MO-18-TMS derivative. We have detected and quantitated with a high specificity, 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone, corticosterone and 18-hydroxycorticosterone in newborn and adult rat adrenals.

The described mass fragmentographic method is compatible with the analysis of other adrenal steroids on the same sample.

## INTRODUCTION

En 1972, Rapp et Dahl [1], en étudiant les activités d'hydroxylations enzymatiques au niveau du carbone 11 et au niveau du carbone 18 de stéroïdes surrénaux de différentes souches de rat, précisent que des précautions ont été prises pour éviter l'emploi de méthanol et de chlorure de méthylène afin d'empêcher un phénomène mis en évidence en 1965 par Dominguez [2]. Cet auteur décrivait deux formes interconvertibles de la 18-hydroxy-déoxycorticostérone qu'il séparait en chromatographie sur couches minces et qu'il supposait être, d'une part la forme (18 → 20) hémiacétalique, d'autre part l'ester méthylique correspondant (forme méthylacétal) résultant d'une méthylation par l'action d'un solvant tel que le méthanol. Toutefois, la possibilité d'une interconversion entre les formes 18-hydroxy-20-oxo et (18 → 20) hémiacétalique n'était pas totalement écartée; mais de nombreux arguments étaient avancés contre cette hypothèse. La présence de deux formes interconvertibles de la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone en particulier et des 18-hydroxycorticostéroïdes en général peut être a priori gênante pour une analyse correcte de ces composés dans les extraits biologiques, tant du point de vue qualitatif (interférence possible avec d'autres composés pouvant masquer l'une ou l'autre forme) que du point de vue quan-

titatif, par l'augmentation du pourcentage d'erreur qui en découle. De plus, si certains solvants tels que le méthanol ou le chlorure de méthylène influencent la quantité relative de ces deux formes, les extractions de stéroïdes et les délipidations employant ces solvants, puis l'analyse par chromatographie sur couches minces ne devraient pas être favorables pour l'analyse des 18-hydroxycorticostéroïdes. Nous avons donc abordé l'analyse des corticostéroïdes hormonaux par la méthode de chromatographie gaz-liquide-spectrométrie de masse (c.g.l.-SM) qui permet la séparation des stéroïdes de structures différentes et leur identification; nous avons montré de plus que l'utilisation de la fragmentographie de masse (FM) offrait une sensibilité assez élevée pour permettre leur détection au niveau physiologique (faibles échantillons de surrénale ou de plasma) et simultanément leur évaluation quantitative précise à l'aide de composés de référence deutériés [3, 4]. Les possibilités de résolution offertes par ces méthodes nous ont amenés à envisager un type commun de dérivés pouvant permettre leur analyse à partir du même échantillon biologique tout en gardant la structure entière des stéroïdes à analyser.

La 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone est le stéroïde le plus abondant chez le rat après la corticostérone [5, 6]; par ailleurs, la 18-hydroxycorticostérone

est un précurseur important pour la synthèse de l'aldostérone dans la surrénale humaine normale et tumorale [7]. Nous nous sommes donc proposés d'envisager dans la même optique et de façon compatible avec nos travaux précédents [3, 4] les possibilités d'analyser les 18-hydroxycorticostéroïdes sous forme de dérivés O-méthylxime-éther de triméthylsilyl (MO-TMS) par c.g.l.-SM et par FM. En effet, les dérivés MO-TMS [8] sont stables en c.g.l. et permettent une bonne séparation chromatographique ou fragmentographique des principaux 17-déoxycorticostéroïdes et 17 $\alpha$ -hydroxycorticostéroïdes [9]. L'aldostérone peut aussi être analysée sous forme de MO-TMS [9 et 10]. Dans le cas particulier des 18-hydroxycorticostéroïdes nous avons établi que la formation des dérivés MO-TMS permet l'obtention d'un produit unique et stable pour chaque stéroïde. La formation d'une O-méthylxime en position 20 conduit au déplacement total de l'équilibre forme (18  $\rightarrow$  20) hémiacétalique, forme 18-hydroxy-20-oxo, vers cette dernière forme. L'emploi des réactifs silylants deutériés [11] donne le moyen de confirmer la structure des molécules analysées et fournit des étalons internes pour l'analyse quantitative [4].

Nous allons donc présenter d'abord les résultats obtenus sur les composés de référence et ensuite l'application à l'étude des 18-hydroxycorticostéroïdes extraits de la surrénale de rats adultes et nouveau-nés.

#### MATERIEL ET METHODES

##### *Chromatographie gaz-liquide (c.g.l.)*

Le chromatographe utilisé est un instrument Packard de type 7400; il est équipé de deux colonnes et de deux détecteurs à ionisation de flamme et doté de deux enregistreurs Sefram de type Servotrace. Les colonnes en verre silanisé ont une longueur de 4 m et un diamètre de 2 mm. Ces colonnes sont remplies de support Gas Chrom P (Supelco), de granulométrie 100-120 mesh tamisé, lavé aux acides, silanisé et imprégné de phase stationnaire, soit OV-1, soit Dexsil-300 (Supelco Inc.). La méthode de préparation des supports imprégnés est celle décrite par Horning *et al.* [12]. Le taux d'imprégnation est de 1%. Les séparations sont effectuées en programmant la température de la colonne à 1°C/mn à partir de 180°C avec un débit d'azote de 30 à 40 ml/mn. La température de l'injecteur est de 260°C et celle du détecteur de 290°C. Le nombre de plateaux théoriques est de l'ordre de 7000 à 230°C pour la n-octacosane.

##### *Chromatographie gaz-liquide-spectrométrie de masse (c.g.l.-SM)*

Nous employons le chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse LKB 9000. La colonne chromatographique est une colonne spiralee en verre silanisé de 4 m  $\times$  2 mm remplie avec une phase OV-1 imprégnée à 1% sur un support lavé aux acides, tamisé et silanisé de type Gas Chrom P (Supelco). La température de l'injecteur est de 260°C, celle du séparateur est de 270°C et celle de la source ionique est de 290°C. Le débit de gaz vecteur est de 30 ml/mn. Le voltage d'accélération est de 3,5 kV et le courant de trappe est de 60  $\mu$ A. Les spectres de masse sont effectués aux énergies d'ionisation de 20, 28 et 70 eV. Un alternateur de voltage d'accélération est utilisé pour les analyses en détection d'ions multiples. Il permet la détection de fragments dont la masse peut être jusqu'à 20% supérieure à la masse la plus basse détectée. Nous utilisons aussi un nouveau détecteur d'ions multiples couplé à un "peak matcher" (LKB) décrit par Hammar et Hessling [13]. Ce dispositif permet la détection simultanée de quatre fragments dont la masse peut être jusqu'à 33% supérieure à la masse la plus basse détectée ou à 25% inférieure à la masse la plus haute détectée. L'énergie d'ionisation est de 20 ou 28 eV pour la détection d'ions multiples.

##### *Composés de référence*

La 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone\* et la 18-hydroxyprogestérone proviennent de chez Searle (Mexico). La 18-hydroxycorticostérone ainsi que la corticostérone viennent de chez Ikapharm (Ramat-Gan, Israël). Les réactifs bis(triméthylsilyl)-acétamide (BSA), triméthylchlorosilane (TMCS), chlorhydrate de O-méthylxamine (MO, Cl) viennent de Pierce Chemical. Les réactifs silylants marqués au deutérium, BSA-D<sub>18</sub> et TMCS-D<sub>6</sub> viennent de Merck, Sharpe et Dohme (Montréal). La corticostérone 4-<sup>14</sup>C (50 mCi/mmol) nous a été fournie par le Centre d'Etude Atomique de Saclay.

##### *Dérivés*

Les composés sont analysés en chromatographie gaz-liquide sous forme de dérivés MO-TMS. Du chlorhydrate d'O-méthylxamine recristallisé est utilisé comme réactif pour la formation des dérivés O-méthylxime à la concentration de 16 mg/ml de pyridine (Merck) bidistillée sur ninhydrine et conservée sur potasse. On utilise 0,1 ml de cette solution pour 0,1 mg de substance de référence; les conditions employées pour la formation des dérivés MO-TMS sont différentes suivant les expériences:

1ère méthode: les dérivés MO sont formés en 2 h à température ambiante, puis la pyridine est évaporée.

\* Nous remercions le Dr. J. R. Pasqualini. (Fondation de Recherche en Hormonologie, France) pour nous avoir également donné un échantillon de ce stéroïde.

L'échantillon est silylé par BSA seul ou BSA D<sub>18</sub> dans la pyridine (50:50 v/v) pendant 16 h à 65°C.

2ème méthode: les dérivés MO sont formés à 65°C pendant 3 h, puis la pyridine est évaporée: (a) l'échantillon est silylé par BSA et TMCS (80:20 v/v) pendant 16 h à 65°C; (b) la silylation est effectuée par BSA-D<sub>18</sub> dans la pyridine (50:50 v/v) pendant 16 h à 65°C. Dans la méthode numéro 2 même les hydroxyles encombrés sont silylés.

### Préparation des échantillons biologiques

Les surrénales de rats mâles adultes de race Wistar sont prélevées aussitôt sur des animaux décapités après une anesthésie rapide à l'éther.

Elles sont pesées immédiatement et stockées dans le méthanol à -30°C jusqu'à ce que l'on effectue l'extraction qui peut avoir lieu plusieurs semaines plus tard sans affecter l'analyse future des stéroïdes et en particulier celle des 18-hydroxycorticostéroïdes. La première étape de l'extraction des corticostéroïdes est le broyage des glandes (68 surrénales) dans un homogénéiseur de Potter. Le milieu de broyage est le méthanol de départ auquel on ajoute 30% d'eau tridistillée et de la corticostérone-4-<sup>14</sup>C pour calculer le rendement de l'extraction. Le broyat est centrifugé, le surnageant est recueilli puis le culot est mis en suspension avec un mélange méthanol-eau (70:30 v/v) et centrifugé à nouveau. Nous répétons la manipulation 3 fois et les surnageants sont mis ensemble et laissés une nuit à -20°C. Les lipides précipités partiellement sont centrifugés à -15°C et à 4000 tours/mn. Le culot obtenu est resuspendu dans du méthanol à -50°C de façon à ne pas redissoudre les lipides précipités. On centrifuge de nouveau à -15°C. Le méthanol est alors évaporé sous un courant d'azote à 60°C et l'extraction proprement dite est effectuée sur le milieu aqueux par le chlorure de méthylène (3 fois) et par l'acétate d'éthyle (3 fois). Les solvants sont évaporés sous courant d'azote après avoir déshydraté les extraits sur sulfate de magnésium. Les dérivés MO-TMS sont alors formés sur le résidu sec dans les conditions données ci-dessus pour les composés de référence selon la méthode numéro 2. Le volume final du milieu réactionnel est de 200 µl. Le rendement d'extraction est alors calculé sur une partie aliquote de l'échantillon biologique en faisant le rapport du comptage de la radioactivité de départ avec celui de la radioactivité retrouvée. Ce rendement est de 80-90% pour la corticostérone. Les dérivés des extraits stéroïdiens sont alors analysés directement en c.g.l.-SM sans autre purification ou séparation préalable, mais on ajoute avant l'injection dans le chromatographe 100 ng de stéroïdes de référence sous forme de MO-TMS-D<sub>9</sub> préparés suivant la méthode 2b. Les analyses en chromatographie gazeuse

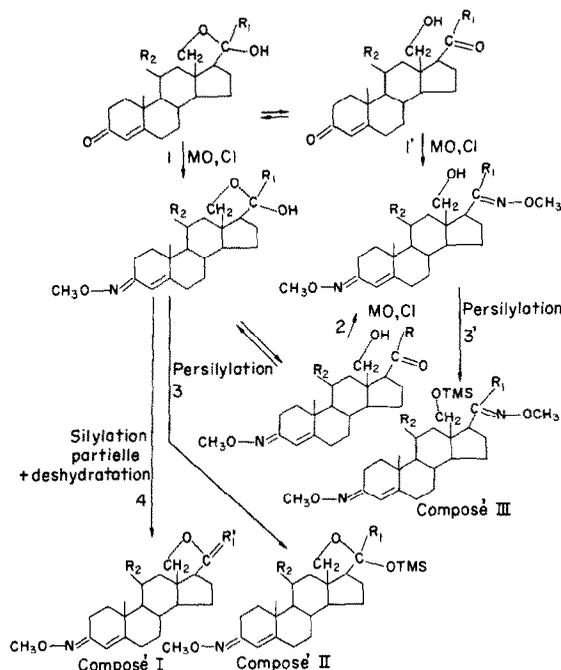


Fig. 1. (1) (1'): réaction avec MO, Cl, 2h à température ambiante ou 1 h à 65°C.

(2): réaction avec MO, Cl, 2 h à température ambiante (réaction partielle) ou 2 h à 65°C (réaction totale).

(3) (3'): réaction de silylation avec BSA, 15 h à 65°C: pour la voie (3), la réaction de l'hydroxyle tertiaire en 20 est incomplète et conduit au mélange du composé II et du composé 20-hydroxy n'ayant pas réagi. Pour la voie (3') la silylation est complète (les groupes hydroxyles peu ou moyennement encombrés ont réagi rapidement) et conduit au seul composé III.

(4): déshydratation thermique du groupe hydroxyle tertiaire dans la chambre d'injection du chromatographe conduisant au composé I.

N.B. L'hypothèse où le composé I serait chromatographié sans déshydratation et perdrait une molécule d'eau sous l'effet du bombardement électronique dans la source ionique du spectromètre de masse et donnerait l'ion M-18 a été envisagée; mais un argument en faveur de la déshydratation dans la chambre d'injection du chromatographe est apporté par la chromatographie gazeuse du composé sur deux phases de polarité différente, OV-1 et Dexsil-300. En effet ce composé est élué sur OV-1 et Dexsil-300 avec près de 2 unités d'indices de méthylène en moins que la forme hémiacétalique triméthylsilylée en 20 alors que sur Dexsil-300 le composé 20-hydroxy libre serait plus retenu donc élué sur cette phase polaire après le dérivé triméthylsilylé en 20. Pour la 18-hydroxyprogestérone R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H et R'<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>. Dans ce cas, le composé I a une masse moléculaire de 341, le composé II de 431 et le composé III de 460. Pour la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone ou ses dérivés, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OH ou CH<sub>2</sub>OTMS, R<sub>2</sub> = H et R'<sub>1</sub> = CHOH ou CHOTMS. Le composé I a alors une masse de 429, le composé II de 519 et le composé III de 548.

Pour la 18-hydroxycorticostérone ou ses dérivés, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OH ou CH<sub>2</sub>OTMS, R<sub>2</sub> = OH ou OTMS et R'<sub>1</sub> = CHOH ou CHOTMS. Le composé I a alors une masse moléculaire de 517, le composé II de 607 et le composé III de 636.

sont effectuées sur des quantités d'échantillons variant de 1 à 6  $\mu$ l, c'est à dire sur les stéroïdes de 1/3 à 2 surrénales. Nous sommes bien au-dessus de la limite de détection de l'appareillage pour la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone; mais ces quantités permettent la mesure simultanée de composés comme la 18-hydroxycorticostérone existant normalement en quantité beaucoup plus faible dans le même échantillon biologique.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Recherche des conditions optimales de formation des dérivés MO-TMS

La cinétique de formation des dérivés MO sur les fonctions cétones en 3 et en 20 des corticostéroïdes a été étudiée dans le cas de 21-hydroxystéroïdes, de 17 $\alpha$ -hydroxystéroïdes et de 11 $\beta$ -hydroxystéroïdes: dans tous les cas la formation des dérivés MO est complète en 2 h à température ambiante [9]. Ce temps de réaction est aussi compatible avec l'obtention quantitative des dérivés 3,20-di-MO de l'aldostérone [9]; dans ce dernier cas le temps de réaction de 2 h ne peut être dépassé sans qu'il y ait apparition de dérivé 3,18,20-tri-MO conduisant à la présence de multiples [10]. Dans le cas des 18-hydroxycorticostéroïdes, 2 h de réaction à température ambiante ne suffisent pas pour déplacer totalement la forme hémiacétalique en forme 3, 20-di-MO.

Dans une première expérience, nous avons effectué sur la 18-hydroxyprogestérone la réaction de formation des dérivés MO dans les conditions habituelles (température ambiante, 2 h) suivie d'une silylation dans des conditions où les hydroxyles primaire et secondaire en position 11 $\beta$  sont convertis totalement en dérivés TMS. L'analyse en c.g.l. conduit à l'obten-

tion de trois pics (I, II, III) bien séparés, d'indice de méthylène sur phase OV-1 27,50, 29,35 et 30,15 respectivement; l'analyse c.g.l.-SM donne respectivement les ions moléculaires à 341, 431 et 460. Ceci laisse prévoir trois types de dérivés différents: un dérivé mono-MO ayant d'après son comportement chromatographique vraisemblablement perdu une molécule d'eau, un dérivé mono-MO-TMS et un dérivé di-MO-TMS respectivement.

Dans une deuxième série d'expériences la température de la réaction de formation des O-méthylloximes est portée à 65°C et des parties aliquotes sont prélevées après 1, 2 et 3 h de réaction. On effectue les dérivés TMS dans les mêmes conditions que précédemment; l'analyse c.g.l. de la première partie de l'échantillon (1 h de formation des MO) donne trois pics identiques à ceux de la première expérience, le pic III ayant augmenté au détriment des deux précédents; dans les deux derniers échantillons (2 et 3 h de formation des MO) on constate la disparition complète des pics I et II au profit d'un seul pic III.

L'interprétation de ces résultats est résumée dans le schéma de la Fig. 1: les composés I et II correspondent à la forme (18  $\rightarrow$  20)-hémiacétal-3-MO, le composé I étant vraisemblablement déshydraté en 20 et le composé II étant 20-TMS. Le composé III est la 3,20-di-MO-18-TMS-progestérone.

Ces expériences répétées pour la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone et la 18-hydroxycorticostérone conduisent à des résultats similaires. Les trois types de dérivés pour chaque composé étudié ont été caractérisés en c.g.l. par leurs indices de méthylène reportés au Tableau 1.

Les structures ont été confirmées par l'étude des fragmentations de chaque composé et des dérivés perdu-

Tableau 1. Indices de méthylène des dérivés MO-TMS de la 18-hydroxyprogestérone, 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone, 18-hydroxycorticostérone

Composés	OV-1 1%	Dexsil-300 1%
18-Hydroxyprogestérone		
-3-MO-20-ène	27,50	
-3-MO-20-triméthylsilyloxy	29,35	
-3,20-di-MO-18-triméthylsilyloxy	30,15	31,00
18-Hydroxy-11-désoxycorticostérone		
-3-MO-20-ène-21-triméthylsilyloxy	31,15	
-3-MO-20,21-di-triméthylsilyloxy	31,65 (32,60)*	
-3,20-di-MO-18,21-di-triméthylsilyloxy	31,66 (32,30)*	31,95
18-Hydroxycorticostérone		
-3-MO-20-ène-11 $\beta$ , 21-triméthylsilyloxy	32,05	
-3-MO-11 $\beta$ ,20, 21-triméthylsilyloxy	32,85	
-3,20-di-MO-11 $\beta$ ,18, 21-triméthylsilyloxy	33,28	33,35

\* Pic mineur (environ 10%) isomère du pic principal.

Tableau 2. Abondances relatives des principaux fragments des dérivés des 18-hydroxycorticostéroïdes

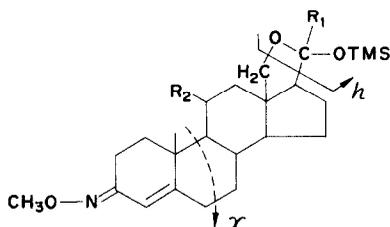
Composés et types de dérivés	Ion moléculaire M	Pic de base B	Masses et intensités relatives ( ) des autres fragments*
<i>18-Hydroxyprogestérone</i>			
-3-MO-20-ène	341(88)	125	326 <sup>1</sup> (9,6), 310 <sup>2</sup> (24), 298(4), 295 <sup>4</sup> (3,3), 266(5), 216(14), 189(7,8), 153 <sup>5</sup> (45), 151 <sup>6</sup> (44), 137(50)
-3-MO-20-triméthylsilyloxy	431(13,8)	125	416 <sup>1</sup> (18,8), 400 <sup>2</sup> (5), 341 <sup>7</sup> (75,5), 310 <sup>8</sup> (50), 298 <sup>3</sup> (69,5), 266(32,4), 153 <sup>5</sup> (65,5), 151 <sup>6</sup> (50,5), 137(48), 103 <sup>9</sup> (56)
-3-MO-20-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy	440(15)9†	1250	425 <sup>1</sup> (11,1)9, 422 <sup>10</sup> (9,3), 409 <sup>2</sup> (4,9)9, 341 <sup>11</sup> (75,5)0, 310 <sup>12</sup> (52,8)0, 298 <sup>13</sup> (73)0, 266(34,6)0, 153 <sup>5</sup> (71)0, 151 <sup>6</sup> (55,5)0, 137(53)0, 112 <sup>14</sup> (49)9
-3,20-di-MO-18-triméthylsilyloxy (a)‡	460(2,9)	370 <sup>7</sup>	429 <sup>2</sup> (28,4), 339 <sup>8</sup> (68,5), 298 <sup>15</sup> (10,4), 266(9,6), 153 <sup>5</sup> (12,6), 103 <sup>9</sup> (5,4), 100(4)
-3,20-di-MO-18-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy (a)	469(2,4)9	370 <sup>10</sup>	438 <sup>2</sup> (31,8)9, 339 <sup>12</sup> (72,6)0, 298 <sup>15</sup> (9,5)0, 266(9,2)0, 153 <sup>5</sup> (14,3)0, 112 <sup>14</sup> (5,2)9, 100(3,7)
<i>18-Hydroxy-11-désoxycorticostérone</i>			
-3-MO-20-ène-21-triméthylsilyloxy	429(100)	429	
-3-MO-20-ène-21-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy	438(100)9	4389	
-3-MO-20,21-di-triméthylsilyloxy	519(0,8)	416 <sup>16</sup>	504 <sup>1</sup> (1,8), 489(0,8), 488 <sup>2</sup> (0,4), 429 <sup>7</sup> (26), 399(4,7), 386(5,2), 357(2,6), 298 <sup>3</sup> (2,9), 266(1,6), 153 <sup>5</sup> (6,2), 151 <sup>6</sup> (4,5), 125(6,3), 117(8,4), 103 <sup>9</sup> (9)
-3-MO-20,21-di-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy	537(0,7)18	425 <sup>17</sup> 9	519 <sup>10</sup> (1,3)15, 507(1)18, 506 <sup>2</sup> (0,5)18, 438 <sup>11</sup> (31)9, 408(5,2)9, 395(5,2)9, 366(2,7)9, 298 <sup>18</sup> (3)0, 266(2,6)0, 153 <sup>5</sup> (5,6)0, 151 <sup>6</sup> (4,8)0, 153 <sup>5</sup> (5,6)0, 117(8)0, 112 <sup>14</sup> (8,2)9
-3,20-di-MO-18,21-di-triméthylsilyloxy (a)	548(19)	517 <sup>2</sup>	458 <sup>7</sup> (17), 427 <sup>8</sup> (38), 414 <sup>9</sup> (9,5), 396 <sup>24</sup> (93), 368 <sup>20</sup> (36), 337 <sup>2</sup> (9,5), 297 <sup>22</sup> (38), 266(31,5), 153 <sup>5</sup> (26), 103 <sup>9</sup> (83)
-3,20-di-MO-18,21-di-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy (a)	566(18,5)18	535 <sup>2</sup> 18	467 <sup>11</sup> (13,5)9, 436 <sup>12</sup> (42)9, 423 <sup>23</sup> (4)9, 405 <sup>25</sup> (98,5)9, 368 <sup>26</sup> (34,2)0, 337 <sup>27</sup> (10,8)0, 297 <sup>28</sup> (47,2)0, 266(19)0, 153 <sup>5</sup> (18,3)0, 112 <sup>14</sup> (86)9
<i>18-Hydroxycorticostérone</i>			
-3-MO-20-ène-11 $\beta$ , 21-di-triméthylsilyloxy	517(100)	517	
-3-MO-20-ène-11 $\beta$ , 21-di-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy	535(100)18	53518	
-3-MO-11 $\beta$ , 20,21-tri-triméthylsilyloxy	607(0,5)	517 <sup>7</sup>	592 <sup>1</sup> (1), 504 <sup>9</sup> (52), 487(16,4), 474(11), 427 <sup>20</sup> (47), 414 <sup>29</sup> (97), 324 <sup>30</sup> (12,1), 296 <sup>31</sup> (35), 264(38,4), 153 <sup>5</sup> (17,6), 151 <sup>6</sup> (15,4), 117(49,5), 103 <sup>9</sup> (79)
-3,20-di-MO-11 $\beta$ , 18,21-tri-triméthylsilyloxy (a)	636(4,5)	605 <sup>2</sup>	546 <sup>7</sup> (18,8), 515 <sup>8</sup> (45,6), 502 <sup>19</sup> (6,1), 484 <sup>24</sup> (94), 456 <sup>20</sup> (22,8), 425 <sup>21</sup> (45), 366 <sup>35</sup> (31), 295 <sup>32</sup> (67,5), 264 <sup>33</sup> (33), 153 <sup>5</sup> (17,8), 103 <sup>9</sup> (98)
-3,20-di-MO-11 $\beta$ , 18,21-tri-tri(perdeutérioriométhyl)silyloxy (a)	663(4,5)27	632 <sup>27</sup>	564 <sup>11</sup> (17,1)18, 533 <sup>12</sup> (45)18, 520 <sup>23</sup> (3,7)18, 502 <sup>25</sup> (91)18, 465 <sup>26</sup> (20,5)9, 434 <sup>27</sup> (50)9, 366 <sup>36</sup> (26,6)0, 295 <sup>34</sup> (69,6)0, 264 <sup>37</sup> (24,5)0, 153 <sup>5</sup> (13,7)0, 112 <sup>14</sup> (87,2)9

\* Les chiffres notés en exposant correspondent à la nature probable du fragment considéré (voir code en fin de tableau).

† Les chiffres en italique représentent le déplacement en masse du fragment considéré marqué au deutérium par rapport à la masse du fragment protoné correspondant.

‡ Pour les dérivés notés (a), l'énergie de bombardement des électrons est de 20 eV, condition utilisée pour la fragmentographie de masse; pour tous les autres, l'énergie de bombardement est de 70 eV.

tério-TMS correspondants. Le Tableau 2 donne les principaux fragments d'importance structurale: outre les fragmentations bien établies pour les dérivés O-méthoxyime (perte du groupe  $\text{OCH}_3$ ) et les dérivés TMS (perte de méthyle et de silanol), d'autres fragments caractéristiques ( $x$  et  $M-h$ ) peuvent s'expliquer par le schéma de fragmentation proposé ci-dessous.



Les dérivés 3,20-di-MO-18-TMS sont les plus favorables pour l'analyse quantitative par c.g.l. et c.g.l.-FM. En effet, dans les conditions que nous avons définies il est possible d'obtenir un seul pic chromatographique par stéroïde étudié; par ailleurs, la stabilité de ces dérivés est excellente et l'on peut reproduire le même tracé chromatographique à partir d'un échantillon laissé plusieurs semaines à la température ambiante; leurs propriétés chromatographiques sont satisfaisantes: la Fig. 2 montre la séparation entre 18-hydroxyprogesterone, 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone et 18-hydroxycorticostérone sur une colonne remplie de phase OV-1. Les coefficients de réponse ( $k_i$ ) du détecteur en ionisation de flamme de ces dérivés ont été calculés par rapport à un carbure saturé, le n-triacontane et à un stéroïde-di-MO (la progesterone) comme références ( $k_i = 1$ ) (Tableau 3). Ils sont du même ordre de grandeur que ceux des 18-désoxycorticostéroïdes correspondants. Le deuxième pic mineur de 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone observé sur le chromatogramme, Figure 2, n'est pas un reste de forme hémiacétalique; par contre, il a le même spectre que le composé identifié comme di-MO-per-TMS; un pic mineur existe également chez les dérivés MO-TMS de la 11-désoxycorticostérone. Le pourcentage de ce pic mineur ne dépasse pas 12% et reste constant au cours du temps. Enfin, les spectres de masse détaillés des

dérivés 3,20-di-MO-per-TMS confirment leurs structures comme le montrent les Figs. 3, 4 et 5. Ils permettent aussi de repérer les fragments spécifiques les plus intenses qui seront choisis pour l'analyse par fragmentation de masse.

Dans cette méthode, le spectromètre de masse permet une détection sensible des effluents de la colonne de chromatographie gazeuse en enregistrant en fonction du temps l'intensité d'un à quatre fragments déterminés au préalable; par exemple, les fragments 517 et 548, le rapport de leur intensité  $i548/i517 = \frac{1}{2}$  et l'indice de

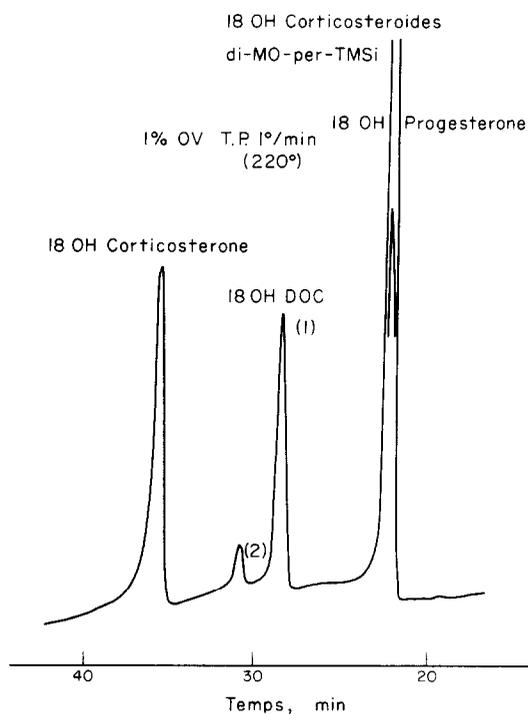


Fig. 2. Chromatogramme montrant la séparation de la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone et de la 18-hydroxycorticostérone sous forme de dérivés 3,20-di-MO-perTMS sur une colonne de 4 m et sur phase OV-1 1%, la température étant programmée de 1°C/mn à partir de 220°C. Le pic mineur (2) est un isomère 3,20-di-MO-perTMS de la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone (1). On a utilisé un détecteur à ionisation de flamme.

Tableau 3. Coefficient de réponse des dérivés 3,20-di-MO-per-TMS de trois 18-hydroxycorticostéroïdes

Composés	Coefficient de réponse référence = n-triacontane	Référence = progesterone-di-MO
C 30	1	0,66
Progesterone	1,5	1
18-Hydroxyprogesterone	1,5	1
18-Hydroxy-11-désoxycorticostérone	3,8 (pic 1)	1,9
	3,3 (pic 1 et 2)	1,6
18-Hydroxycorticostérone	3,7	1,8

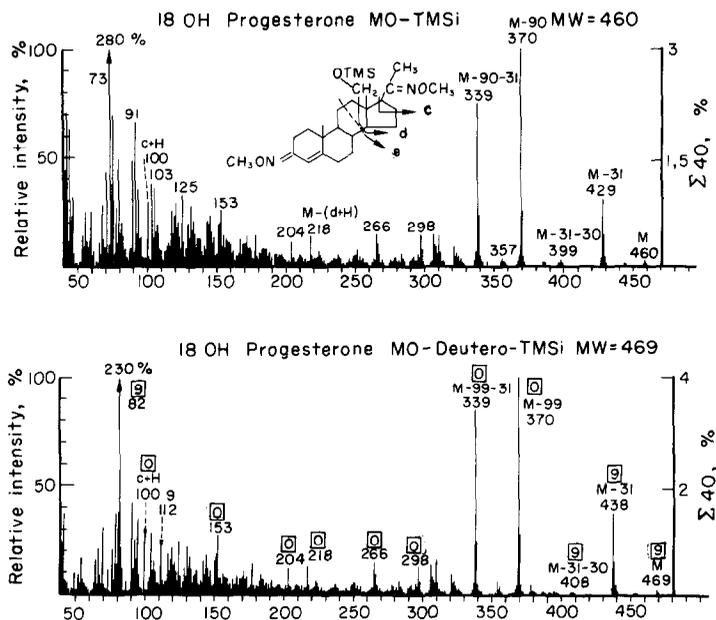


Fig. 3. Spectres de masse à 70 eV des dérivés 3,20-di-MO-18-TMS (spectre supérieur) et 3,20-di-MO-18-deutério-TMS (spectre inférieur) de la 18-hydroxyprogesterone. Pour le dérivé MO-deutério-TMS l'ion moléculaire a une masse augmentée de 9 par rapport au dérivé protoné. Les valeurs encadrées indiquent le déplacement positif de masse des ions considérés par rapport aux ions protonés correspondants.

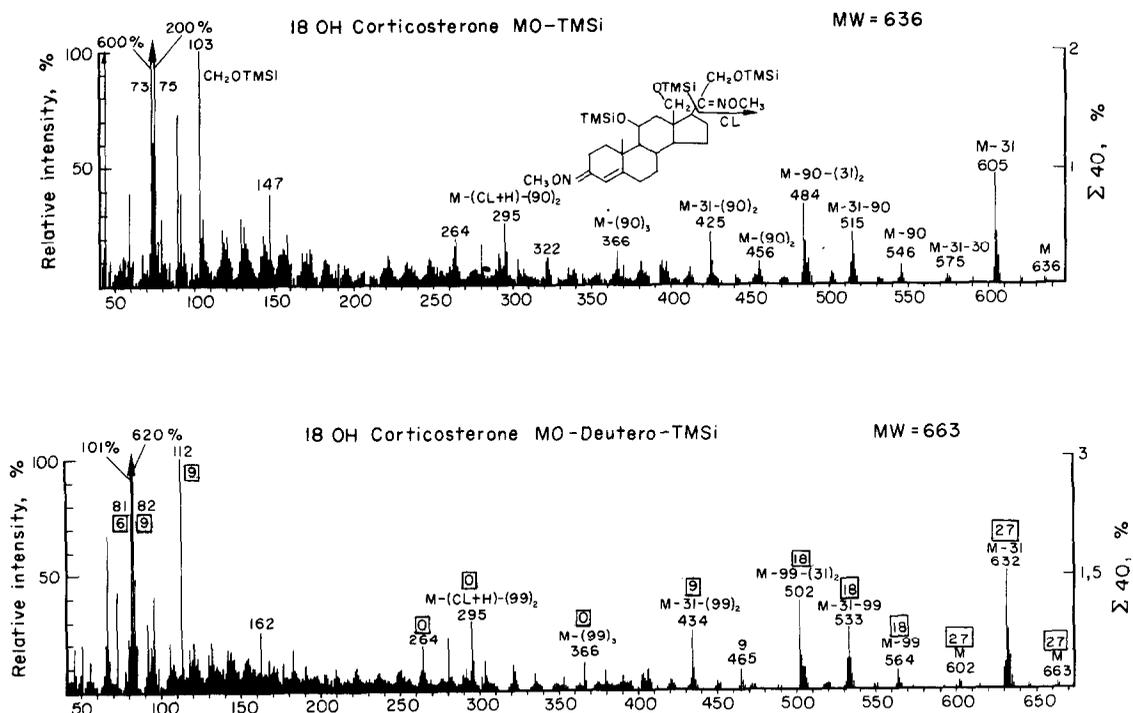


Fig. 4. Spectres de masse à 70 eV des dérivés 3,20-di-MO-18,21-di-TMS (spectre supérieur) et 3,20-di-MO-18,21-perdeutério-di-TMS (spectre inférieur) de la 18-hydroxy-11-désocorticostérone.

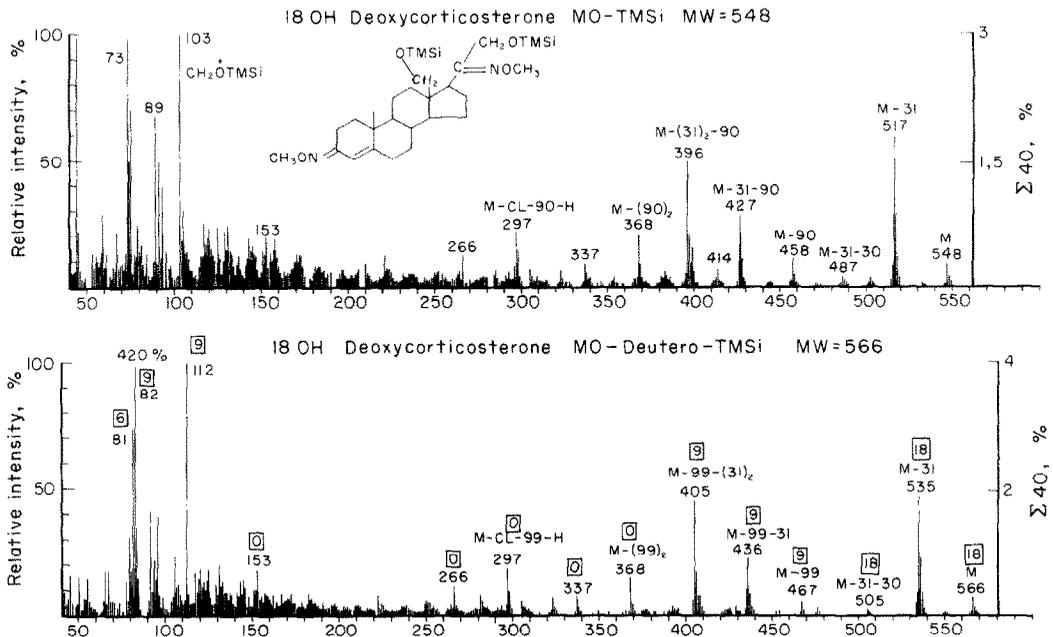


Fig. 5. Spectres de masse à 70 eV des dérivés 3,20-di-MO-11,18,21-tri-TMS (spectre supérieur) et 3,20-di-MO-11,18,21-perdeutério-tri-TMS (spectre inférieur) de la 18-hydroxycorticostérone.

méthylène  $IM_{OV-1} = 31,66$ , permet une identification non ambiguë de quantité voisine du ng de 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone.

Comme pour l'analyse de la corticostérone [4, 9], le dérivé perdeutério-TMS introduit simultanément avec l'échantillon non marqué peut fournir un étalon interne pour l'évaluation quantitative dans les milieux biologiques; il suffit de sélectionner un ion du dérivé perdeutérioré (par exemple le fragment 535 du dérivé 3,20-di-MO-18,21-di-TMS D<sub>6</sub> de la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone) qui n'interfère pas avec un fragment du dérivé non marqué.

#### Analyse des 18-hydroxycorticostéroïdes surrénaliens

La Fig. 6a montre la séparation chromatographique des stéroïdes libres d'un extrait surrénalien de rat Wistar mâle de trois mois. A côté du cholestérol, on a identifié par c.g.l.-SM la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone (en mélange avec la 11-déhydrocorticostérone et la  $3\beta,11\beta,21$ -trihydroxy- $5\alpha$ -pregnan-20-one), la corticostérone et le  $\beta$ -sitostérol. La présence dans la surrénale de métabolites réduits de la corticostérone [9] confirmant l'action d'une  $5\alpha$ -réductase surrénalienne [14, 15, 16] et de  $\beta$ -sitostérol montrant l'accumulation de stérols végétaux dans cet organe, fait l'objet d'une discussion détaillée dans des articles séparés (9 et résultats non publiés). La fragmentographie de masse (Fig. 6b) permet la détection spécifique de la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone surrénalienne; en

effet, les fragments ionisés 548 (M) et 517 (M-31) sont caractéristiques de ce stéroïde car ils sont absents des spectres des deux autres stéroïdes élués sous le même pic chromatographique: la 11-déhydrocorticostérone-MO-TMS ( $M = 474$ ) et la  $3\beta,11\beta,21$ -trihydroxy- $5\alpha$ -pregnan-20-one (MO-TMS). De plus, le rapport des intensités des ions 517 et 548 est trouvé égal à 5 dans le pic de la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone de l'extrait comme dans le composé de référence. Le fragmentogramme de la Fig. 6b montre aussi que l'on peut détecter simultanément la corticostérone, isomère de position de la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone mais qui en est séparée chromatographiquement et dont le rapport des intensités des ions 517 et 548 est égal à 1, et le  $\beta$ -sitostérol par son ion moléculaire à  $m/e$  486; ce dernier fragment est aussi utilisé comme caractéristique supplémentaire pour la corticostérone et la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone; il correspond à  $M-2 \times 31$ .

Aucun pic chromatographique correspondant à la 18-hydroxycorticostérone n'est détecté en courant d'ionisation total (TIC) pour une injection d'extrait correspondant à 2 surrénales de rat (Fig. 7a); nous avons alors enregistré en DIM les masses 636 correspondant à l'ion moléculaire de la 18-hydroxycorticostérone-3,20-di-MO-per-TMS et l'ion 605 correspondant à l'ion M-31 ( $M-OCH_3$ ). La 3ème masse 548 nous permet de détecter la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone et la corticostérone-MO-TMS sur le même

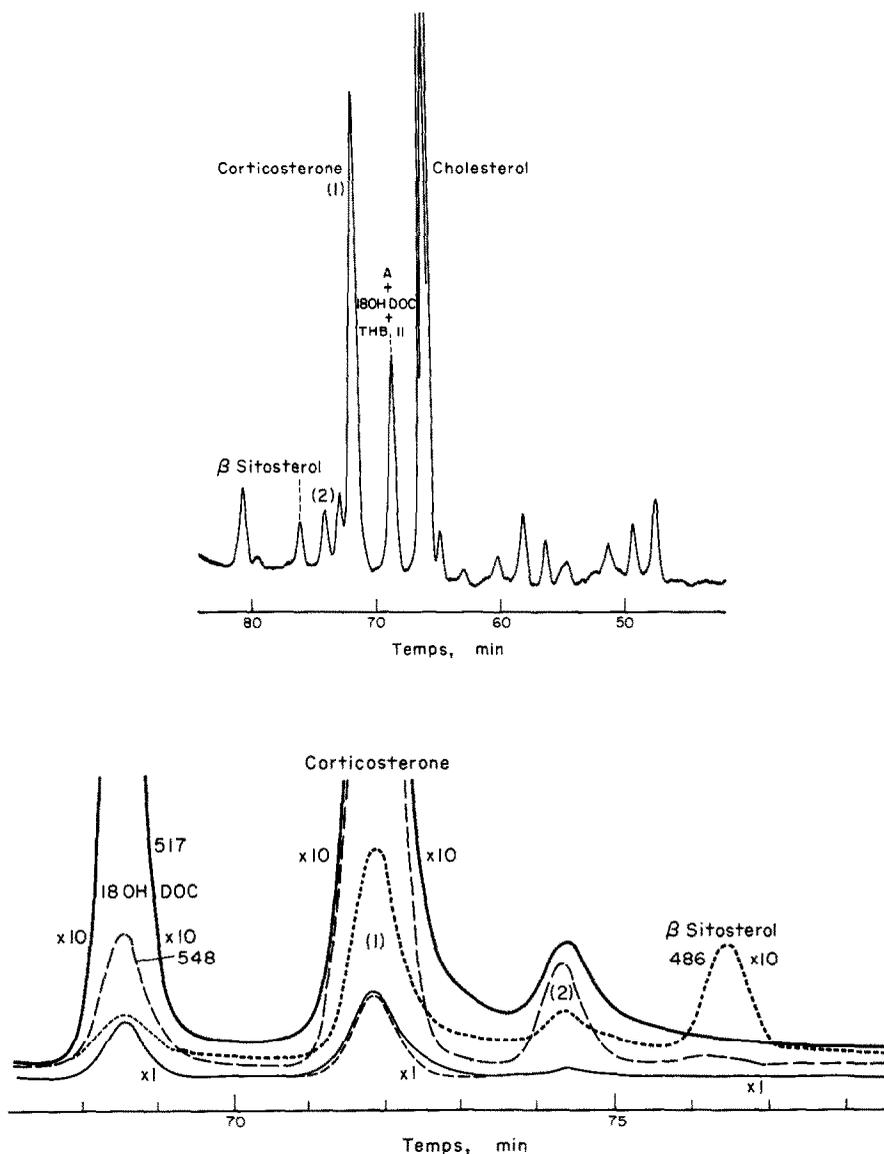


Fig. 6. Analyse par c.g.l.-SM et par FM d'un extrait surrénalien total de rat mâle adulte: (a) détection par courant d'ionisation total: A = 11-déhydrocorticostérone, 18-OH-DOC = 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone, THB II = 3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-trihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dione, corticostérone (1) = pic principal, (2) = pic mineur; (b) détection d'ions multiples (DIM) effectuée simultanément: tracé continu = ion à m/e 517, tracé discontinu = ion à m/e 548, tracé en pointillés = ion à m/e 486. Les pics fragmentographiques sortant de l'échelle de plus haute sensibilité ( $\times 10$ ) sont reportés sur une échelle 10 fois moins sensible ( $\times 1$ ).

La détection des trois stéroïdes analysés, en particulier de la 18-OH-DOC est spécifique (voir texte).  
Colonne de SE-30 à 1%; température programmée à 1°C/mn à partir de 180°C; énergie de bombardement des électrons = 20 eV; la DIM est obtenue à l'aide d'un alternateur de voltage d'accélération.

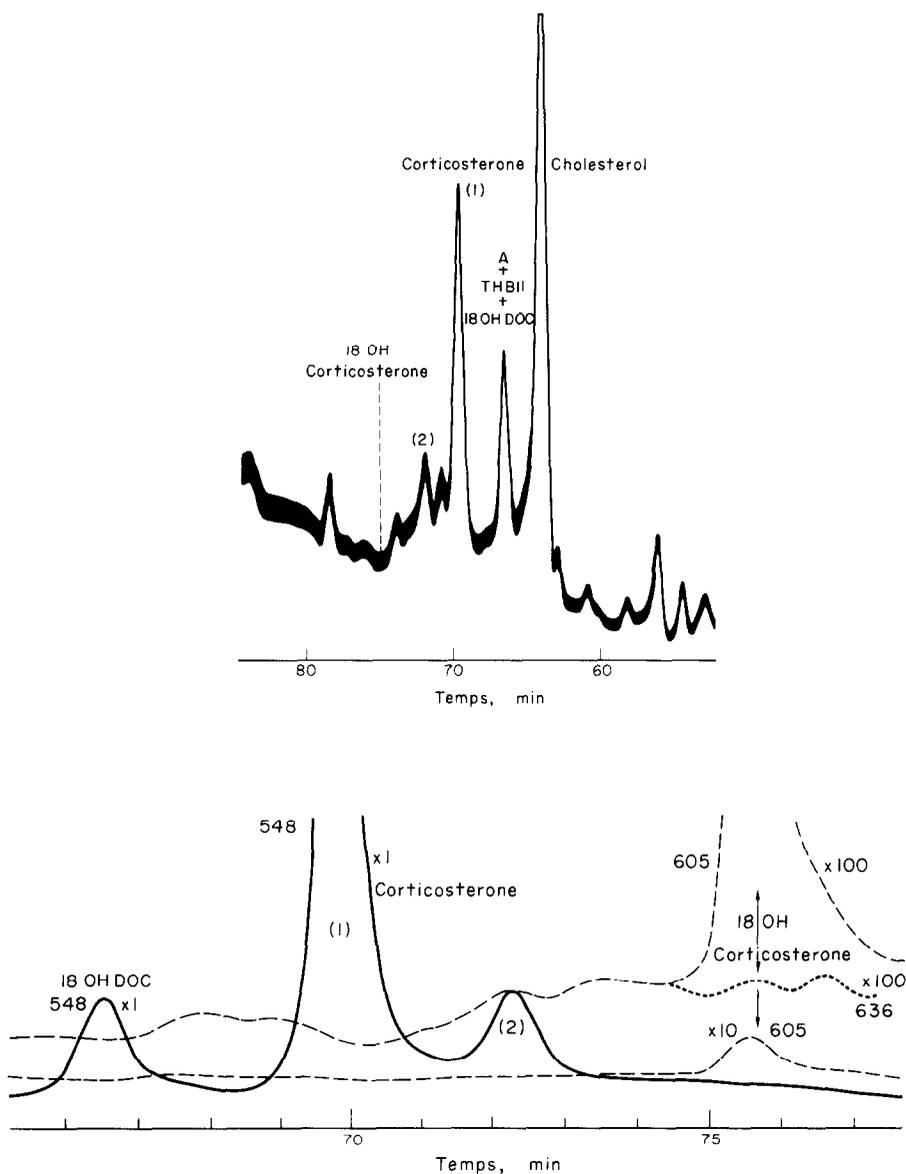


Fig. 7. Analyse par c.g.l.-SM et par FM d'un extrait surrénalien total de rat mâle adulte montrant la détection spécifique de la 18-hydroxycorticostérone: (a) détection par courant d'ionisation total: mêmes stéroïdes que dans la Fig. 6; la place où est éluée la 18-hydroxycorticostérone (18-OH corticostérone) est indiquée par un trait en pointillés; (b) détection d'ions multiples effectuée simultanément: tracé continu = ion à m/e 548, tracé discontinu = ion à m/e 605, tracé en pointillés = ion à m/e 636; ces deux derniers tracés permettent la mise en évidence de la 18-OH corticostérone avec des sensibilités 10 ( $\times 10$ ) et 100 ( $\times 100$ ) fois plus élevées que pour la détection de la corticostérone et de la 18-hydroxycorticostérone ( $\times 1$ ).

Mêmes conditions chromatographiques et fragmentographiques que pour la Fig. 6.

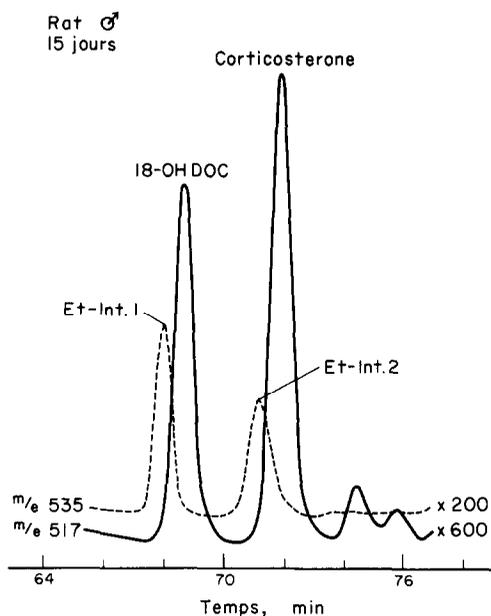


Fig. 8. Fragmentogramme de masse montrant l'analyse quantitative de la 18-OH DOC et de la corticostérone extraites de deux surrénales de rat mâle âgé de 15 jours. Détection des hormones de l'extrait par l'ion à  $m/e$  517 (tracé continu); détection de 200 ng de chaque hormone deutériée de référence correspondante (Et.Int.1 et Et.Int.2) jouant le rôle d'étalon interne, par l'ion à  $m/e$  535 (tracé discontinu). La DIM est obtenue à l'aide du nouveau DIM couplé à comparateur de pic (LKB 9060) [14]; l'énergie de bombardement des électrons est de 28 eV. La sensibilité de détection de l'ion à  $m/e$  517 ( $\times 600$ ) est 3 fois plus élevée que celle de l'ion à  $m/e$  535 ( $\times 200$ ). Mêmes conditions chromatographiques que la Fig. 6.

fragmentogramme. La Fig. 7b montre la détection de la 18-hydroxycorticostérone: le rapport des fragments  $636/605 = 1/22$  est le même pour le composé de l'extrait que pour le composé de référence; les indices de méthylène sur OV-1 sont aussi concordants.

La Fig. 8 montre un exemple d'évaluation quantitative de la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone et de la corticostérone extraite de surrénales de rat mâle de 15 jours. On a utilisé comme étalons internes les hormones de référence correspondantes, sous forme de dérivé MO-di-TMS  $D_9$ . Leurs temps de rétention sont voisins de ceux des stéroïdes à analyser, mais ils peuvent être détectés spécifiquement en utilisant le même fragment ionisé, par exemple M-31, mais déplacé de 18 unités de masse par la présence des atomes de deutérium. A l'âge de 15 jours, la surrénale de rat mâle contient un taux élevé d'hormones, respectivement 30 ng et 18 ng de corticostérone et de 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone par mg de tissu. Cette méthode

a été utilisée pour évaluer l'évolution de la stéroïdogénèse chez le rat en fonction de l'âge et du sexe [9]. Même lorsque le contenu de la glande surrénalienne en hormones est minimal à l'âge de 7 jours chez le mâle, il correspond à 3 ng de corticostérone et à 1,5 ng de 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone par mg de tissu. La méthode décrite permet une évaluation quantitative aisée de ces hormones sur quelques milligrammes de tissu surrénalien.

En conclusion, les dérivés 3,20-di-méthylxime-11,18,21-triméthylsilyloxy des 18-hydroxycorticostéroïdes sont bien appropriés pour l'analyse en phase gazeuse. La fragmentographie de masse permet le dosage de la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone et de la 18-hydroxycorticostérone jusqu'à des quantités voisines du ng dans des extraits surrénaux. La spécificité de la méthode due à l'alliance de la séparation chromatographique et de la détection de fragments ionisés propres à chaque 18-hydroxystéroïde permet d'éviter toute interférence avec les autres stéroïdes présents dans l'extrait surrénalien, tels que la corticostérone, la 11-déhydrocorticostérone, l'aldostérone, la désoxycorticostérone, les isomères de la tétrahydrocorticostérone et la progestérone.

La méthode décrite est compatible avec l'analyse par fragmentographie de masse de ces autres corticostéroïdes sur le même extrait stéroïdique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Rapp J. P. et Dahl L. K.: *Endocrinology* **90** (1972) 1435.
- Dominguez O. V.: *Steroids*, Suppl. II (1965) 29-49.
- Maume B. F., Bournot P., Durand J., Lhuguenot J. C., Maume G., Prost M. et Padieu P.: In *Organisation des Laboratoires*, Biologie prospective, II colloque de Pont-à-Mousson (1972). Expansion Scientifique Française, Paris (1973) p. 637-654.
- Maume B. F., Bournot P., Lhuguenot J. C., Baron C., Barbier F., Maume G., Prost M. et Padieu P.: *Analyt. Chem.* **45** (1973) 1073-1082.
- Péron F. G.: *Endocrinology* **69** (1961) 39-45.
- Birmingham M. K. et Ward P. J.: *J. biol. Chem.* **236** (1961) 1661-1667.
- Pasqualini J. R.: *Nature* **201** (1964) 501.
- Gardiner W. L. et Horning E. C.: *Biochim. biophys. Acta* **115** (1966) 524-526.
- Prost M. et Maume B. F.: In *Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine* (Edited by A. Frigerio and N. Castagnoli). Raven Press, New York (1974) sous presse.
- Horning E. C. et Maume B. F.: *J. chrom. Sci.* **7** (1969) 411-418.
- McCloskey J. A., Stillwell R. N. et Lawson A. M.: *Analyt. Chem.* **40** (1968) 233-236.
- Horning E. C., VandenHeuvel W. J. A. et Creech B. G.: In *Methods of Biochemical Analysis* (Edited by G. Glick). Interscience, New York, Vol. 11 (1963) pp. 69-147.

13. Hammar C. G. et Hessling R.: *Analyt. Chem.* **43** (1971) 298-306.
14. Colby H. D. et Kitay J. I.: *Endocrinology* **91** (1972) 1523-1527.
15. Lantos C. P., Birmingham M. K. et Traikov H.: *Acta physiol. Lat. Am.* **16** (1966) 278-281.
16. Lantos C. P., Birmingham M. K. et Traikov H.: *Acta physiol. Lat. Am.* **17** (1967) 42-54.