

ANALYSE MODULAIRE DES STÉROÏDES URINAIRES PENDANT LA GESTATION HUMAINE

RENÉ-JEAN BEGUE, JEAN DESGRES, JAN-ÅKE GUSTAFSSON* et PRUDENT PADIEU

Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Université de Dijon, France;

* Département de Chimie I, Karolinska Institutet, Stockholm, Suede

(Received 19 December 1974)

SUMMARY

A systematic analysis by gas-liquid chromatography and by mass spectrometry of urinary steroids was carried out between the 8th and 41st week of human gestation in 14 normal pregnancies.

Forty-eight different steroids were studied, amongst which the $3\alpha,18$ -dihydroxy- 5β -androstan-17-one; 5α -androstane- $3\beta,16\beta,17\alpha$ -triol; $2\xi,3\xi$ -dihydroxy- 5ξ -pregnan-20-one; 5β -pregnane- $3\alpha,16\alpha,20\beta$ -triol; 5α -pregnane- $3\alpha,16\beta,20\alpha$ -triol and 5α -pregnane- $3\beta,16\alpha,20\alpha$ -triol were to our knowledge identified for the first time in pregnancy urine.

Some of the 48 steroids studied were evaluated at the beginning and end of pregnancy and the respective values obtained are as follows: 0.10 and 2.10 mg/24 h for 3α -hydroxy- $5\beta,17\alpha$ -pregnan-20-one; 0.40 and 6.70 mg/24 h for 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one; 1.10 and 11.10 mg/24 h for 3α -hydroxy- 5β -pregnan-20-one; 0.15 to 17.40 mg/24 h for $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one; 0.15 to 6.50 mg/24 h for $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one; 0.25 and 4.20 mg/24 h for 5β -pregnane- $3\alpha,16\alpha,20\beta$ -triol and 0.10 and 5.80 mg/24 h for 5α -pregnane- $3\alpha,16\alpha,20\alpha$ -triol.

The results obtained show that the $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one, $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one and 5β -pregnane- $3\alpha,16\alpha,20\beta$ -triol could be considered as new steroid indexes of foetal activities.

INTRODUCTION

En dehors de certains cas précis et limités à l'analyse quantitative simultanée de quelques métabolites, l'analyse immédiate en phase gazeuse des stéroïdes donne des résultats d'interprétation délicate lorsqu'on s'adresse aux milieux biologiques dans lesquels, et c'est la règle, la diversité des stéroïdes est à la fois qualitative et quantitative. Il devient alors indispensable d'effectuer préalablement aux analyses en phase gazeuse, le fractionnement des divers métabolites selon plusieurs groupes de stéroïdes bien définis par chromatographie gaz-liquide (g.l.c.), et par chromatographie gaz-liquide-spectrométrie de masse (GC-MS). Pour réaliser ce fractionnement préalable, nous avons retenu pour sa commodité, sa sélectivité et la reproductibilité des fractionnements obtenus la chromatographie sur Sephadex LH-20 déjà utilisée avec succès pour la séparation des stéroïdes conjugués par Vihko [1], par Tikkanen et Adlercreutz [2], comme pour la séparation des stéroïdes libres par Nyström et Sjöval [3] et plus récemment par Carr *et al.* [4].

L'étude des stéroïdes excrétés durant la gestation humaine nous a semblé être un bon exemple d'application biologique d'une méthode qui en conjugant deux processus chromatographiques complémentaires, autorise leur analyse spécifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les [7α - ^3H]-déhydroépiandrostérone (activité spécifique 22 Ci/mmol) et [$2,4$ - ^3H]-oestriol (activité spéci-

fique 48 Ci/mmol) proviennent de: Radiochemical Center, Amersham, Buckinghamshire, Angleterre.

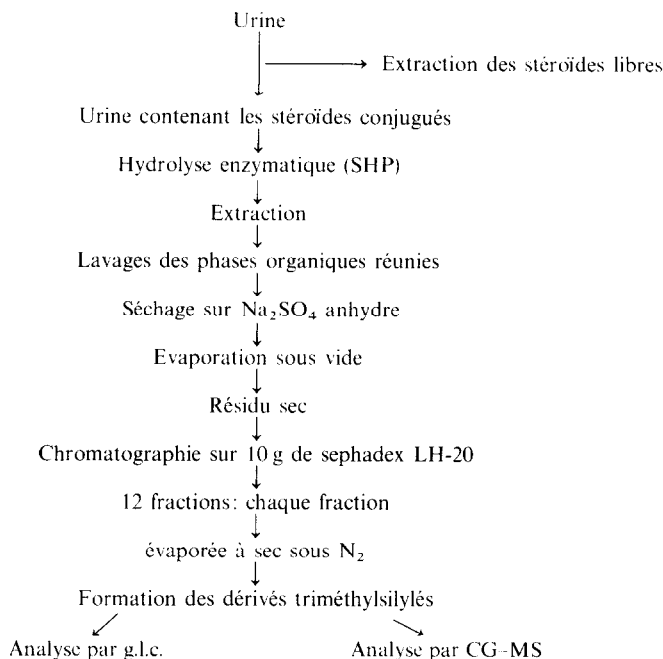
Les $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one, $3\alpha,6\beta$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one, $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one, $3\beta,16\alpha$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one, $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one, $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-one et $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5β -androstan-17-one nous ont été donnés par le Docteur J. A. Gustafsson. Les autres stéroïdes de référence proviennent des laboratoires Ikapharm, Ramat-Gan, Israël. Le 5β -cholestane- 3α -ol provient des laboratoires Sigma-Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis USA.

Le Sephadex LH-20 (granulométrie 25 à 100 μm) provient de Pharmacia France S.A., rue de Marly, Parly 2, 78150, Le Chesnay.

Les autres produits: solvants, réactifs silylants, suc digestif d'Hélix pomatia (SHP) comme l'ensemble du matériel utilisé: compteur à scintillation liquide, chromatographe en phase gazeuse et spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse ont été décrits précédemment [5].

I. Préparation des extraits urinaires (Tableau 1). Les urines de 24 h recueillies sur 1 ml de merseptil et conservées en chambre froide à -20°C ont été obtenues du deuxième au neuvième mois de femmes normales enceintes. La préparation des extraits urinaires s'effectue sur un volume d'urines homogénéisées correspondant respectivement au dixième (premier trimestre de la gestation), au quinzième (deuxième trimestre de la gestation) et au vingtième

Tableau 1. Schéma général de la méthode d'analyse utilisée



de la diurèse des 24 h (troisième trimestre de la gestation).

Après extraction des stéroïdes libres par l'acétate d'éthyle, les stéroïdes conjugués sont soumis à une hydrolyse enzymatique par le SHP en procédant comme suit.

Après évaporation de l'acétate d'éthyle résiduel, la phase aqueuse est ajustée à pH 5,20 avec de l'acide acétique à 20%. On ajoute 1/10 en vol. de tampon, acétate de sodium 0,1 M, acide acétique pH 5,20 et 2000 unités par ml de β -glucuronidase du SHP. Après 48 h à 37°C, les stéroïdes hydrolysés sont extraits 2 fois par l'acétate d'éthyle (1:2, v/v) et une fois par l'éther diéthylique (1:1, v/v). Les phases organiques réunies sont lavées une fois par 10 ml d'une solution molaire de bicarbonate de sodium et deux fois par 10 ml d'eau distillée chaque lavage étant effectué pendant 20 mn au tapis roulant, séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis évaporées à sec à 50°C sous vide partiel. Le résidu sec obtenu est repris par 2 ml d'un mélange chloroforme-heptane-éthanol (5:5:1, v/v). Après action des ultrasons, la solution obtenue est appliquée sur une colonne de 0,7 cm. dia. contenant 10 g de Sephadex LH-20 préparé dans le même système de solvant [3]. L'éluion des stéroïdes est réalisée avec 60 ml du mélange chloroforme-heptane-éthanol, puis avec 30 ml de mélange chloroforme-méthanol (3:1, v/v). Douze fractions de 7,5 ml chacune sont recueillies. Chaque fraction est évaporée à sec sous courant d'azote, et le résidu obtenu est dissout dans 0,15 ml d'un mélange de pyridine-N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (1:3, v/v). Après une heure à 60°C, les stéroïdes de chaque fraction sont analysés sous forme de leurs éthers de triméthylsilyles par g.l.c. et CG-MS.

II. *Analyse qualitative.* (1°) *Par g.l.c. et par CG-MS.* Les analyses par g.l.c. sont effectuées en programmation de température sur une colonne d'OV-1 et sur une colonne d'OV-17 [5] et en isotherme à 240°C sur une colonne de SE-30. Les analyses par CG-MS sont effectuées sur une colonne d'OV-1 en utilisant l'hélium comme gaz vecteur. L'énergie de bombardement des électrons était fixée à 22,5 eV et le courant d'ionisation à 60 μ A. Enfin, l'analyse systématique par CG-MS des échantillons provenant de trois urines différentes a pu être réalisée selon la méthode décrite par Gustafsson *et al.*[6], les spectres de masse étant enregistrés sur bande magnétique et traités par un ordinateur IBM 1800 selon les procédés de Hedfjäll *et al.*[7] et de Reimendal et Sjövall[8].

(2°) *Critères analytiques.* La détermination, en programmation de température des valeurs en unités méthylènes (UM) [9], et en isotherme celle de son indice de rétention par rapport aux 5 α -cholestane (Ir/5 α -cholestane) permet d'affecter à chaque pic chromatographique trois coefficients dont la correspondance avec ceux déterminés pour chacun des stéroïdes de référence constitue un critère analytique généralement suffisant pour affirmer par g.l.c. l'identité du produit chromatographié. Par CG-MS, les spectres de masse obtenus doivent être identiques à ceux des composés de référence.

III. *Analyse quantitative.* (1°) L'aspect quantitatif du fractionnement sur Sephadex LH-20 a été étudié en chromatographiant 1 ml d'une solution étalon contenant 100 μ g/ml d'androstérone, d'étiocolanolone, de déhydroépiandrostérone, de 11-oxoétiocolanolone, de 11 β -hydroxyandrostérone, de 5 β -prégnane-3 α ,20 α -diol, de 5 β -prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol, de 5 α -prégnane-3 β ,16 α ,20 α -triol, d'oestrone, d'oestriol et

de cholestérol. A chaque fraction recueillie, sont ajoutés 100 μg de 5 β -cholestane-3 α -ol (STD) de façon à pouvoir déterminer pour chaque stéroïde lors de l'analyse par g.l.c., le rapport de leur hauteur sur celle de l'étalon interne précité. La comparaison de ce rapport avec celui déterminé lors de l'analyse immédiate par g.l.c. d'une solution étalon identique (contenant 100 μg de 5 β -cholestane-3 α -ol) permet d'apprécier, au moins pour chacun des stéroïdes standards étudiés, le rendement de la chromatographie liquide.

(2°) Le rendement global de la manipulation a été étudié en ajoutant aux échantillons biologiques une quantité de radioactivité correspondant à environ $3,10^5$ d.p.m. de chacun des deux stéroïdes tritiés précités. Les comptages sont effectués sur des fractions aliquotes correspondant respectivement au 1/100 du volume urinaire initial, au 1/100 du volume de la solution obtenue avant la chromatographie sur Sephadex LH-20, et au 1/10 du volume de chaque fraction collectée.

(3°) Dans les diverses fractions LH-20 analysées, le dosage par g.l.c. des stéroïdes identifiés est effectué après détermination de leur coefficient de réponse [5].

RESULTATS

I. *Identification des stéroïdes.* Les composés 1 et 2 présentent des spectres de masse respectivement identiques à celui de l'androstérone et à celui de l'étiocolanolone sous forme de leur dérivé 3 α -triméthylsilyloxy [1] avec pour chacun de ces deux stéroïdes un pic moléculaire à $m/e = 362$ et un pic de base à $m/e = 272$ (M-90), la perte du fragment 90 correspondant au départ d'un groupement triméthylsilanol [10]. Les pics à $m/e = 347$ et à $m/e = 257$ correspondent respectivement à la perte d'un groupement méthyle (M-15) et à la perte d'un groupement triméthylsilyloxy et d'un groupement méthyle: M-(90 + 15). Les pics à $m/e = 306$ (M-56), 305 (M-57), caractéristiques des stéroïdes présentant un groupement oxo dans le cycle D [11], et 244, pic relativement abondant pour les composés ayant une configuration en 5 β [1], sont également retrouvés.

Le composé 3 avec un pic de base à $m/e = 129$ caractéristique des 3 β -triméthylsilyloxy-5-en-5-stéroïdes, un pic moléculaire à $m/e = 360$ et des fragmentations à M-15, M-56, M-90, M-(90 + 15) et M-129 est typique de la déhydroépiandrostérone [1].

Le composé 4 présente un spectre de masse caractéristique des éthers bis-triméthylsilyloxy des 5-androsten-3,17-diols [1]: pic moléculaire à $m/e = 434$ et séquence à $m/e = 129, 213, 215, 239, 254$ (M-(2 \times 90)) et 305 (M-129). Il est identifié par g.l.c. au 5-androstène-3 β ,17 β -diol.

Des deux composés 11-oxo-17-oxostéroïdes étudiés, seule la 11-oxoétiocolanolone (composé 5) a été identifiée, son spectre de masse indiquant qu'il s'agit de son dérivé 3 α -triméthylsilyloxy: pic moléculaire à $m/e = 376$ et pics caractéristiques à $m/e = 361$ (M-15), 286 (M-90), 271 (pic de base) et 232 (M-(15 = 129)) [5].

Pour ce qui concerne les 11 β -hydroxy-17-oxostéroïdes, seul le composé 6 a été identifié à la 11 β -hydroxyandrostérone. L'analyse de son spectre de masse montre qu'il s'agit de son dérivé 3 α -triméthylsilyloxy: pic moléculaire à $m/e = 376$, fragmentations classiques à M-15, M-90, M-(90 + 15) et enfin un pic à $m/e = 156$ caractéristique des 11 β -hydroxy-17-oxostéroïdes.

Les composés 7 et 8 présentent un spectre de masse caractéristique des dérivés 16 hydroxylés de la déhydroépiandrostérone, avec un pic moléculaire à $m/e = 448$, un pic de base à $m/e = 304$ (M-144) et des pics à $m/e = 196$ et $m/e = 199$, ces trois fragmentations étant caractéristiques des 16-hydroxy-17-oxostéroïdes. Les pics correspondants aux fragmentations classiques à M-15, M-90 sont également retrouvés, de même que le pic à $m/e = 129$. Ces deux composés sont identifiés par g.l.c. à la 16 α -hydroxydéhydroépiandrostérone [1] et à la 16 β -hydroxydéhydroépiandrostérone [12]. Le composé 9, avec un spectre de masse identique aux précédents, est identifié par g.l.c. à la 3 α ,16 α -dihydroxy-5-androsten-17-one.

Les composés 10 et 11 présentent des spectres de masse dont le pic moléculaire à $m/e = 450$ et la séquence à $m/e = 106, 117, 201$ et 216 (pic de base) les rapportent à des 3,16-dihydroxyandrostan-17-one. Les analyses par g.l.c. les identifient respectivement aux 3 α ,16 α -dihydroxy-5 α -androstan-17-one et 3 α ,16 α -dihydroxy-5 β -androstan-17-one.

Le composé 12 présente un spectre de masse indiquant qu'il s'agit d'un 3,18-bis-triméthylsilyloxy-androstan-17-one: pic moléculaire à $m/e = 450$ et pics prédominants à $m/e = 103, 169, 215, 360$ et 420 (pic de base). Il est identifié par g.l.c. à la 3 α ,18-dihydroxy-5 β -androstan-17-one [13].

Les composés 13, 14 et 15 présentent des spectres de masse indiquant qu'il s'agit de 3 α -triméthylsilyloxy-pregnan-20-one: pic moléculaire à $m/e = 390$ et pic de base à $m/e = 300$ (M-90) [14]. Leurs valeurs en UM indiquent qu'il s'agit respectivement des 3 α -hydroxy-5 β ,17 α -pregnan-20-one [14], 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one [15] et 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one [16].

A des différences quantitatives près, trois composés présentent des spectres de masse typiques des 20-hydroxy-21-désoxy-C-21-stéroïdes [15] avec un pic de base à $m/e = 117$ et un pic moléculaire à $m/e = 464$. Leurs coordonnées chromatographiques les identifient aux 5 α -pregnane-3 α ,20 α -diol (composé 16), 5 β -pregnane-3 α ,20 α -diol (composé 17) et 5 α -pregnane-3 β ,20 α -diol (composé 18).

Neuf composés séparés par g.l.c. présentent un pic moléculaire à $m/e = 478$ et des fragmentations caractéristiques permettant leur identification à des dérivés monohydroxylés de la 3-hydroxypregnan-20-one.

Le composé 19 avec un pic de base à $m/e = 255$ (M-(2 \times 90 + 43)) et un pic à $m/e = 435$ (M-43) caractéristique des 17-triméthylsilyloxy-20-oxo-21-désoxystéroïdes est identifié à la 3 α ,17 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one.

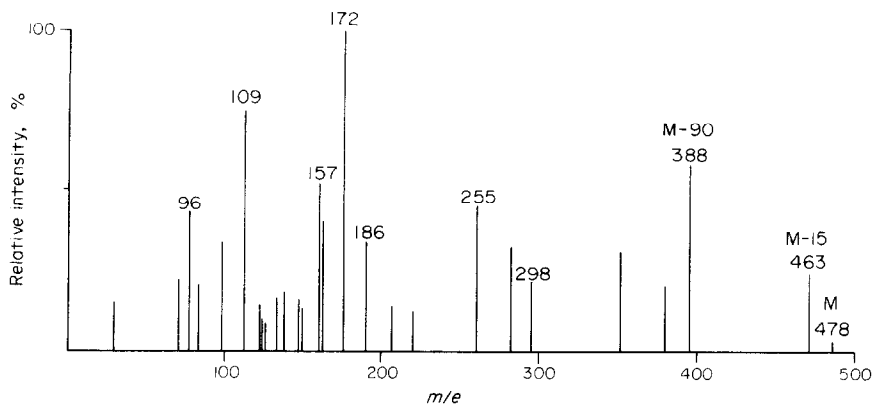


Fig. 1. Spectre de masse de l'éther bis-triméthylsilyl du composé 21 ($3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5β -prégnan-20-one).

Le composé 20 présente un spectre de masse dont la séquence $m/e = 129, 157, 172$ (pic de base), $298, 388, 478$ est caractéristique des composés $15\text{-triméthylsilyloxy-20-oxo-21-désoxystéroïdes}$ [16, 17]. Ce composé est rapporté à une $3\xi,15\xi$ -dihydroxy- 5ξ -prégnan-20-one.

Les spectres de masse des composés 21 et 22 présentent un pic moléculaire à $m/e = 478$ et une séquence à $m/e = 96, 109, 157, 172, 186$, caractéristique des 16α -hydroxy- $20\text{-oxo-C21-stéroïdes}$ [18]. Ces composés sont respectivement identifiés aux $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5β -prégnan-20-one (Fig. 1) et $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5α -prégnan-20-one.

Les spectres de masse des composés 23 et 24 présentent une fragmentation typique des composés $3, 6\alpha$ -dihydroxy-prégnan-20-one: ion moléculaire à $m/e = 478$ et pics prédominants à $m/e = 463$ (M-15), 388 (M-90), 373 (M-(90 + 15)), 299 (M-(90 + 89)) et 204 (pic de base). Les spectres de masse obtenus respectivement avec les isomères $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5α -prégnan-20-one, $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5α -prégnan-20-one et $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -prégnan-20-one étant pratiquement identiques [19] c'est l'analyse par g.l.c. qui permet d'identifier ces composés aux $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -prégnan-20-one [20] et $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5α -prégnan-20-one [19].

Le composé 25 présente un spectre de masse indiquant qu'il s'agit d'un dérivé $2,3\text{-bis-triméthylsilyloxy-prégnan-20-one}$ [21] avec un pic moléculaire à

$m/e = 478$, les fragmentations caractéristiques à $m/e = \text{M-90; M-(90 + 89)}$ et trois pics respectivement à $m/e = 129, 142, \text{et } 143$ (pic de base), cette dernière séquence s'observant pour les stéroïdes présentant un groupement triméthylsilyloxy en 2 [22]. Ce composé est rapporté à une $2\xi,3\xi$ -dihydroxy- 5ξ -prégnan-20-one.

Enfin les composés 26 et 27 présentent un spectre de masse caractéristique des $3,21$ -dihydroxy-prégnan-20-one: pic moléculaire à $m/e = 478$ et les fragmentations à $m/e = 375$ (M-103) [23] et $m/e = 257$ (M-(90 + 103 + 28)) caractéristiques des $20\text{-oxo-21-hydroxy-C21-stéroïdes}$. Leur indice de rétention sur SE-30 a permis d'identifier respectivement ces composés aux $3\beta,21$ -dihydroxy- 5α -prégnan-20-one [24] et $3\alpha,21$ -dihydroxy- 5β -prégnan-20-one [25].

Les composés 28–31 présentent des spectres de masse indiquant qu'il s'agit de 4 isomères du prégnane- $3,16,20$ -triol: pic moléculaire à $m/e = 552$ et séquence à $m/e = 117, 141, 156, 157, 462$ caractéristique de ces stéroïdes [26]. Ces stéroïdes sont identifiés par g.l.c. aux 5β -prégnane- $3\alpha,16\alpha,20\beta$ -triol, 5α -prégnane- $3\alpha,16\alpha,20\alpha$ -triol (Figure 2), 5α -prégnane- $3\alpha,16\beta,20\alpha$ -triol et 5α -prégnane- $3\beta,16\alpha,20\alpha$ -triol.

Des 4 isomères de référence étudiés, seul le 5β -prégnane- $3\alpha,17\alpha,20\alpha$ -triol (composé 32) a été identifié, sa valeur en UM comme son spectre de masse étant identiques à ceux obtenus avec le stéroïde de référence: pic de base à $m/e = 255$, pic moléculaire

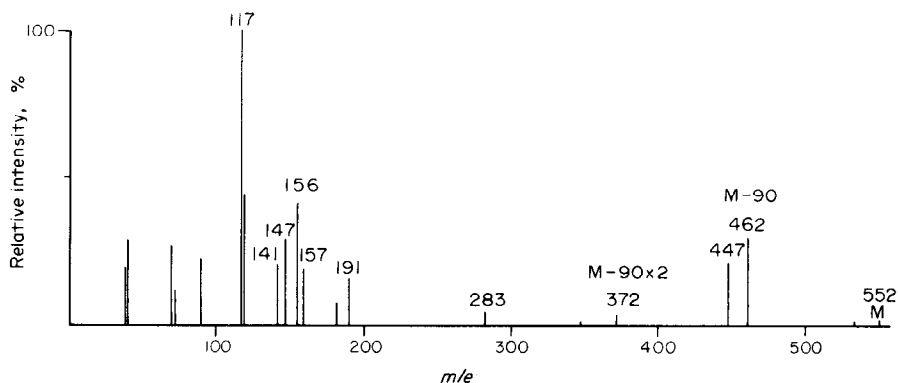


Fig. 2. Spectre de masse de l'éther Tris-triméthylsilyl du composé 29 (5α -prégnane- $3\alpha,16\alpha,20\alpha$ -triol).

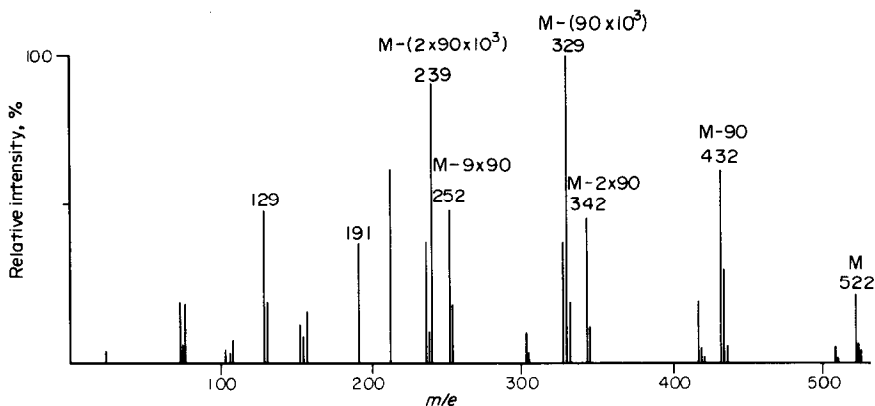


Fig. 3. Spectre de masse de l'éther Tris-triméthylsilyl du composé 35 (5-androstène-3 β ,16 α -17 β -triol).

à $m/e = 480$ et fragments $m/e = 462, 363, 362, 273, 255$ et 117 typiques des 17-hydroxy-20-triméthylsilyloxy-21-désoxystéroïdes [27].

L'ion moléculaire du composé 33 est trouvé à $m/e = 552$ indiquant qu'il s'agit d'un prégnane contenant 3 groupements triméthylsilyloxy. Le pic à $m/e = 449$ (M-103) indique qu'il s'agit d'un C21 stéroïde présentant une fonction alcool primaire en 21, la séquence à $m/e = 449, 359$ et 269 étant caractéristique des prégnanes-3,20,21-triols. Ce composé est identifié au 5 α -pregnane-3 α ,20 α ,21-triol [28].

Les composés 34 et 35 présentent des spectres de masse typiques des éthers tris-triméthylsilyloxy des 5-androstène-3,16,17-triols [29]. Ils présentent un pic moléculaire à $m/e = 522$ et les pics caractéristiques à $m/e = 432$ (M-90), 342 (M-2 \times 90), 329 (M-(90 + 103)) (pic de base), 252 (M-(3 \times 90)), 239 (M-(103 + 2 \times 90)), 191 et 129 . Ces deux composés ont été identifiés respectivement aux 5-androstène-3 β ,16 β ,17 α -triol et 5-androstène-3 β ,16 α ,17 β -triol [30] (Fig. 3).

Le composé 36 présente un spectre de masse indiquant qu'il s'agit d'un dérivé tris-triméthylsilyloxy d'un androstane-3,16,17-triol [22] avec un pic moléculaire à $m/e = 524$, un pic de base à $m/e = 191$ et les fragmentations typiques à $m/e = 434$ (M-90), 344 (M-(2 \times 90)) et 255 (M-(2 \times 90 + 89)). Ce composé est identifié par g.l.c. au 5 α -androstane-3 β ,16 β ,17 α -triol.

Le spectre de masse du composé 37 présente un pic moléculaire à $m/e = 450$ (pic de base) et une séquence à $m/e = 117, 129, 255, 270, 435$, indiquant qu'il s'agit d'une androsténiolone. L'analyse chromatographique rapporte ce composé au 3 β ,17 β -dihydroxy-5-androstén-16-one.

Le composé 38 présente un spectre de masse indiquant qu'il s'agit d'un 5-prégnéniol: pic de base à $m/e = 117$, pic moléculaire à $m/e = 462$ et la séquence caractéristique à $m/e = 129, 282$ (M-(2 \times 90)) et 372 (M-90). La valeur en UM de ce composé indique qu'il s'agit du 5-prégnène-3 β ,20 α -diol [1].

Le composé 39 est identifié au 5-prégnène-3 β ,16 α ,20 α -triol. Il présente en effet un spectre de masse avec un pic moléculaire à $m/e = 550$ et une séquence à $m/e = 117$ (pic de base), $129, 141, 156, 157$ caractéristique des 5-prégnène-3,16,20-triols. Les coordonnées chromatographiques de ce composé affirment son identité [30]. De même le composé 40 est identifié au 5-prégnène-3 α ,16 α ,20 α -triol.

Le composé 41 présente un spectre de masse identique à celui obtenu avec le dérivé 3-triméthylsilyloxy de l'oestrone: pic moléculaire à $m/e = 342$ (pic de base) et pics prédominants à $m/e = 218, 244$ et 257 [31].

Le composé 42 est identifié au 17 β -oestradiol: pic moléculaire à $m/e = 416$ (pic de base) et pics prédominants à $m/e = 129, 218, 232, 244, 285, 326$ et

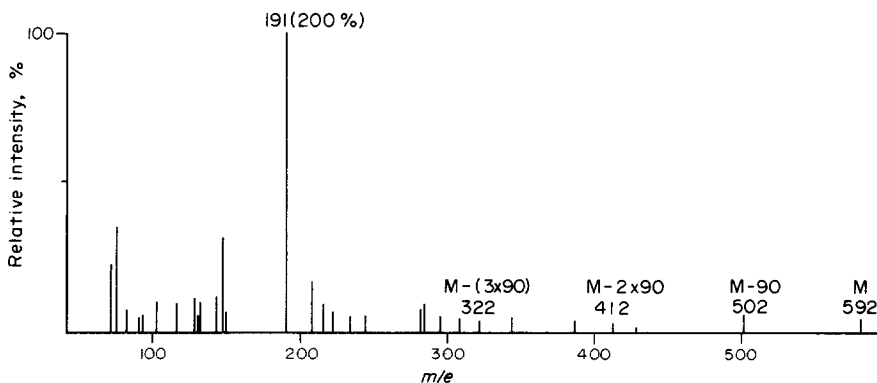


Fig. 4. Spectre de masse de l'éther tétra-triméthylsilyl du composé 47 (15 α -hydroxyoestriol).

401. Les coordonnées chromatographiques et le spectre de masse: pic moléculaire à $m/e = 430$ et séquence $m/e = 218, 244$ et 286 (pic de base), rapportent le composé 43 à la 16α -hydroxyestrone [31].

Le composé 44 présente un spectre de masse avec un pic moléculaire à $m/e = 430$ (pic de base), et une séquence à $m/e = 129, 286, 312$ et 402 l'identifiant à la 15α -hydroxyestrone.

Les composés 45 et 46 avec un spectre de masse dont le pic moléculaire à $m/e = 504$ (pic de base) et les pics à $m/e = 489, 414$ et 439 sont rapportés respectivement à l'oestriol [32] et au $16,17$ -epioestriol.

Le composé 47 présente un spectre de masse dont le pic moléculaire à $m/e = 592$, le pic de base à $m/e = 191$ indiquent qu'il s'agit du 15α -hydroxyoestriol [33] (Fig. 4).

Six composés analysés par g.l.c. et par GC-MS n'ont pu être identifiés. Trois de ces stéroïdes respectivement élués dans les fractions 4, 5 et 8 (valeur en UM = 27,17,29,23 et 28,83) présentent des spectres de masse indiquant qu'il s'agit de 5ζ -prégnane- $3\zeta, X, 20\zeta$ -Tris-triméthylsilyloxy. Un stéroïde élué dans la fraction n 5 (valeur en UM = 29,40) présente un spectre de masse indiquant qu'il s'agit d'un 5ζ -preg-

Tableau 2. Stéroïdes identifiés par CG-MS dans les extraits urinaires. La structure des composés n° 20 et 25 n'a pu être complètement établie

Composé	Analyse par g.l.c.			Stéroïdes identifiés par CG et CG-MS dans les extraits urinaires
	SE-30	OV-1	OV-17	
1	0,41	24,44	26,17	3α -hydroxy- 5α -androstan-17-one
2	0,42	24,62	26,45	3α -hydroxy- 5α -androstan-17-one
3	0,51	24,92	27,70	3β -hydroxy- 5α -androsten-17-one
4	0,62	25,60	—	5-androstene- 3β - 17β -diol
5	—	25,30	28,42	3α -hydroxy- 5β -androstan-11,17-dione
6	0,71	25,92	29,20	$3\alpha, 11\beta$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-one
7	0,62	27,06	28,85	$3\beta, 16\alpha$ -dihydroxy- 5α -androsten-17-one
8	0,75	27,66	28,90	$3\beta, 16\beta$ -dihydroxy- 5α -androsten-17-one
9	0,65	25,90	—	$3\alpha, 16\alpha$ -dihydroxy- 5α -androsten-17-one
10	0,72	26,12	—	$3\alpha, 16\alpha$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-one
11	0,78	26,16	—	$3\alpha, 16\alpha$ -dihydroxy- 5β -androstan-17-one
12	—	26,43	—	$3\alpha, 18$ -dihydroxy- 5β -androstan-17-one
13	0,53	25,32	26,90	3α -hydroxy- $5\beta, 17\alpha$ -pregnan-20-one
14	0,66	25,93	27,87	3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one
15	0,66	26,11	28,12	3α -hydroxy- 5β -pregnan-20-one
16	0,93	27,25	27,60	5α -pregnane- $3\alpha, 20\alpha$ -diol
17	0,94	27,48	27,71	5β -pregnane- $3\alpha, 20\alpha$ -diol
18	1,06	28,15	28,60	5α -pregnane- $3\beta, 20\alpha$ -diol
19	—	26,00	27,72	$3\alpha, 17\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one
20	—	26,92	—	$3\zeta, 15\zeta$ -dihydroxy- 5ζ -prégnan-20-one
21	0,99	27,66	28,78	$3\alpha, 16\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one
22	—	27,23	—	$3\alpha, 16\alpha$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one
23	0,89	27,15	29,00	$3\alpha, 6\alpha$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one
24	1,18	28,42	30,28	$3\beta, 6\alpha$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one
25	0,90	27,60	—	$2\zeta, 3\zeta$ -dihydroxy- 5ζ -pregnan-20-one
26	—	30,10	—	$3\beta, 21$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one
27	—	29,04	—	$3\alpha, 21$ -dihydroxy- 5β -pregnan-20-one
28	1,18	28,61	—	5β -pregnane- $3\alpha, 16\alpha, 20\beta$ -triol
29	1,26	28,81	—	5α -pregnane- $3\alpha, 16\alpha, 20\alpha$ -triol
30	1,41	29,17	—	5α -prégnane- $3\alpha, 16\beta, 20\alpha$ -triol
31	1,65	29,74	—	5α -pregnane- $3\beta, 16\alpha, 20\alpha$ -triol
32	1,37	28,92	28,96	5β -pregnane- $3\alpha, 17\alpha, 20\alpha$ -triol
33	1,77	29,87	—	5α -pregnan- $3\alpha, 20\alpha, 21$ -triol
34	1,02	27,69	—	5-androstene- $3\beta, 16\beta, 17\alpha$ -triol
35	1,20	28,29	28,43	5-androstene- $3\beta, 16\alpha, 17\beta$ -triol
36	—	27,25	—	5α -androstan- $3\beta, 16\beta, 17\alpha$ -triol
37	0,92	27,08	29,20	$3\beta, 17\beta$ -dihydroxy- 5α -androsten-16-one
38	1,10	27,71	—	5-pregnene- $3\beta, 20\alpha$ -diol
39	1,62	29,46	—	5-pregnene- $3\beta, 16\alpha, 20\alpha$ -triol
40	—	28,81	29,33	5-pregnene- $3\alpha, 16\alpha, 20\alpha$ -triol
41	—	25,39	29,45	3-hydroxy-1,3,5(10) estratrien-17-one
42	—	25,90	—	1,3,5(10)-estratriene- $3, 17\beta$ -diol
43	0,90	27,25	—	3,16 α -dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene-17-one
44	0,98	27,32	—	3,15 α -dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene-17-one
45	1,26	28,61	29,97	1,3,5(10)-estratriene- $3, 16\alpha, 17\beta$ -triol
46	1,34	28,91	30,42	1,3,5(10)-estratriene- $3, 16\beta, 17\alpha$ -triol
47	2,24	30,98	31,63	1,3,5(10)-estratriene- $3, 15\alpha, 16\alpha, 17\beta$ -tétrol
48	2,24	30,77	32,00	cholesterol

Tableau 3. Séparation par chromatographie sur Sephadex LH-20 des stéroïdes d'une solution de référence contenant 100 µg de chacun des stéroïdes standards utilisés pour tester l'efficacité des colonnes. Les détails de cette manipulation sont décrits dans "matériel et méthodes, chapitre III"

Numéro de la fraction LH-20 collectée	Stéroïdes élués
1	Cholesterol
2	11-deoxy-17-oxosteroides
3	11-oxoétiocholanolone
4	5β-pregnane-3α,17α,20α-triol
5	5β-pregnane-3α,17α,20α-triol
6	11β-hydroxyandrostérone et oestrone
7	5β-pregnane-3α,17α,20α-triol
8	5α-pregnane-3β,16α,20β-triol
9	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
10	5α-prégnane-3β,16α,20α-triol
	oestriol
	oestriol

nane-1ξ, X, 20ξ-triol, alors qu'un autre métabolite élué dans la fraction n° 6 (valeur en UM = 30, 69) présente un spectre de masse caractéristique des prégnanes-3,16,20-triol. Enfin, un composé élué dans la fraction n° 8 (valeur en UM = 29, 57) présente un spectre de masse indiquant qu'il s'agit d'un 3ξ, X, 16ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-20-one.

Le Tableau 2 résume l'ensemble des stéroïdes identifiés.

II. *Séparation des stéroïdes.* La chromatographie sur Sephadex LH-20 de la solution contenant les stéroïdes de référence utilisée pour tester l'efficacité

des colonnes (matériel et méthodes—chapitre III) donne le fractionnement indiqué dans le Tableau 3.

Réalisée dans les mêmes conditions, la chromatographie des extraits urinaires permet, après identification des stéroïdes de chaque fraction (Figs. 5-7 et 8) de distinguer cinq groupes de stéroïdes mentionnés dans le Tableau n° 4.

III. *Analyse quantitative.* Les rendements des manipulations précédant la chromatographie sur Sephadex LH-20 sont respectivement de 84% ± 8 pour celui correspondant à la DHEA tritiée et de 88% ± 6 pour celui de l'oestriol tritié (valeurs moyennes obtenues pour 8 analyses). Après chromatographie sur Sephadex LH-20, 82% de la radioactivité initiale due à la DHEA tritiée sont retrouvés dans les fractions 3 et 4, tandis que 86% de celle due à l'oestriol marqué sont retrouvés dans les fractions 9 et 10.

Les rendements spécifiques obtenus lors de l'éluion des stéroïdes de la solution standard sont compris entre 63% ± 8 pour la 11-oxoétiocholanolone et 87% pour le 5β-prégnane-3α,20α-triol.

Au total, le rendement global des diverses manipulations précédant les analyses en phase gazeuse, est de 78% ± 6 (valeur moyenne pour 8 déterminations).

L'application de cette technique au dosage des 3α-hydroxypregnan-20-one (Tableau 5) montre que leur excretion quotidienne est régulièrement croissante pour atteindre un maximum situé vers la 36ème semaine de la gestation. Des trois métabolites considérés, c'est l'excretion de la 3α-hydroxy-5β-pregnan-20-one qui est quantitativement prépondérante et les résultats obtenus (1,25 à 11,10 mg/24 h) sont en

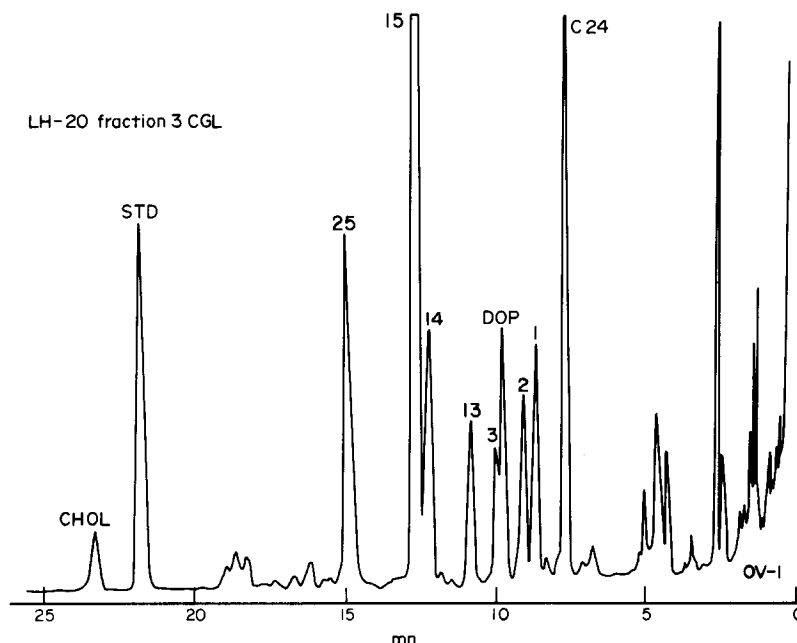


Fig. 5. Analyse par g.l.c. sur OV-1 des stéroïdes de la fraction LH-20 3 provenant de l'hydrolysate urinaire d'une femme enceinte de 6 mois.

Les stéroïdes identifiés sont: l'androstérone [1], l'étiocholanolone [2], la déhydroépiandrostérone [3], la 3α-hydroxy-5β,17α-prégnan-20-one [13], la 3α-hydroxy-5α-prégnan-20-one [14], la 3α-hydroxy-5β-prégnan-20-one [15], la 2ξ,3ξ-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one [25] et le cholestérol [48].

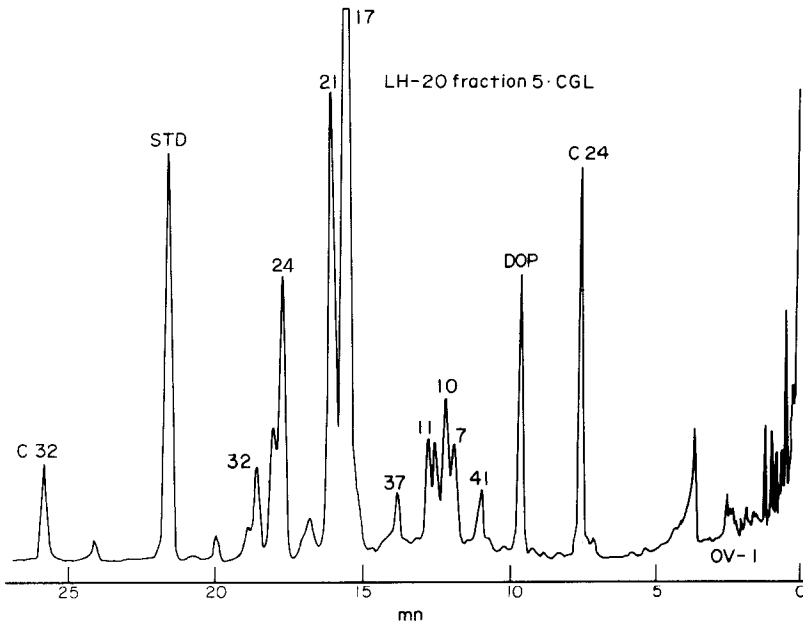


Fig. 6. Analyse par g.l.c. sur OV-1 des stéroïdes de la fraction LH-20 n° 5 provenant de l'hydrolysate urinaire d'une femme enceinte de 6 mois.

Les stéroïdes identifiés sont: l'oestrone [41], la 16 α -hydroxydéhédroépiandrosterone [7], la 16 α -hydroxyandrosterone [10], la 16 α -hydroxyétiocholanolone [11], le 5 β -prégnane-3 α ,20 α -diol [17], la 16 α -hydroxyprégnanolone [21], la 3 β ,6 α -dihydroxy-5 α -prégnan-20-one [24], le 5-prégnène-3 α ,16 α ,20 α -triol [40] et le 5 α -prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol [32].

bon accord avec ceux publiés par Van der Molen [34] et Acevedo *et al.* [35]. Provenant du catabolisme réductif essentiellement hépatique du noyau A de la progestérone placentaire, l'excrétion de ce composé semble être au même titre que celle du 5 β -prégnane-3 α ,20 α -diol, le reflet le plus sûr du catabolisme direct de la progestérone dans le compartiment

maternel, d'autant que pour chacune des urines étudiées, le rapport du 5 β -prégnane-3 α ,20 α -diol à la 3 α -hydroxy-5 β -prégnan-20-one ne présente pas de variations significatives au cours de la gestation (valeur moyenne: 6.10 ± 1.15 pour 13 déterminations). L'excrétion quotidienne de la 3 α ,16 α -dihydroxy-5 β -prégnan-20-one (Tableau 5) inférieure à

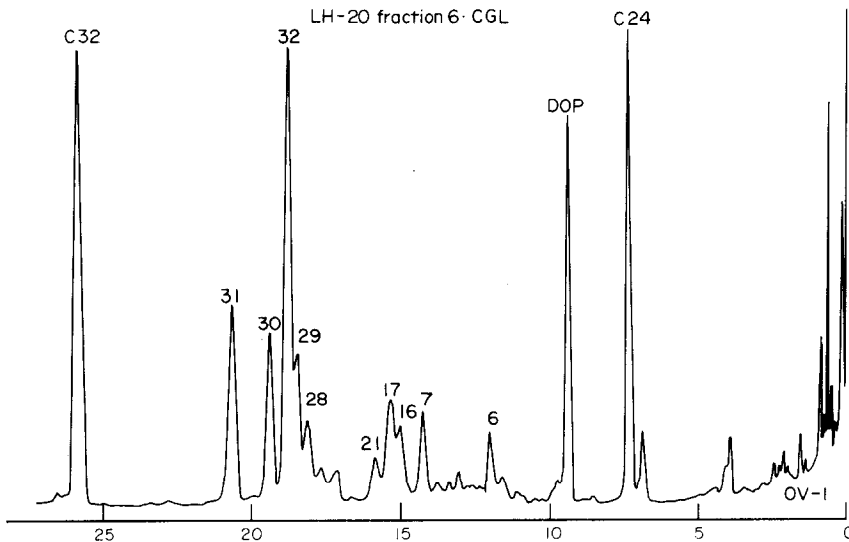


Fig. 7. Analyse par g.l.c. sur OV-1 des stéroïdes de la fraction LH-20 n° 6 provenant de l'hydrolysate urinaire d'une femme enceinte de 6 mois.

Les stéroïdes identifiés sont: la 11 β -hydroxyandrosterone [6], la 16 α -hydroxydéhédroépiandrosterone [7], le 5 α -prégnane-3 α ,20 α -diol [16], le 5 β -prégnane-3 α ,20 α -diol [17], la 3 α ,16 α -dihydroxy-5 β -prégnan-20-one [21], le 5 β -prégnane-3 α ,16 α ,20 β -triol [28], le 5 α -prégnane-3 α ,16 β ,20 α -triol [30], et le 5 α -prégnane-3 β -16 α ,20 α -triol [31].

Tableau 4. Stéroïdes identifiés par CG-MS dans chacune des fractions obtenues par chromatographie sur séphadex LH-20 des extraits urinaires; le dosage des stéroïdes du groupe 1 (fraction n° 3), du groupe 2 (fraction n° 4) et du groupe 3 (fraction n° 5) ne peut être effectué que par l'analyse séparée des fractions LH-20 correspondantes, tandis que celui des stéroïdes des groupes 4 et 5 est réalisé en rassemblant respectivement les fractions LH-20 n° 6 et 7 (groupe 4) et 8, 9, 10 et 11 (groupe 5)

Groupe	Numéro de la fraction LH-20	Stéroïdes urinaires identifiés
	1	
	2	cholesterol
1	3	11-deoxy-17-oxosteroides et pregnanolones
2	4	2-hydroxypregnanolone pregnandiols 16 α -hydroxypregnanolone 6 α -hydroxypregnanolone oestrone
3	5	11-oxy-17-oxosteroides 11-deoxy-16-hydroxy-17-oxosteroides et pregnandiol 16-hydroxypregnanolone 6-hydroxypregnanolone
	6	5 β -prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
4	7	pregnanes-3,16,20-triol 5 β -pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol 5 α -pregnane-3 α ,20 α ,21-triol androstanetriols
	8	androstetriols
	9	oestriol
5	10	16-epioestriol
	11	15 α -hydroxyoestriol

1 mg/24 h jusqu'à la 19ème semaine, s'infléchit brusquement vers la 22ème semaine pour atteindre un maximum vers la 37ème semaine de la gestation. Son excrétion est alors constamment supérieure à celle de la 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one. Celle de la 3 β ,6 α -

dihydroxy-5 α -pregnan-20-one (Tableau 5) augmente jusqu'à la 36ème semaine et devient supérieure à 1 mg/24 h dès la 22ème semaine de la gestation.

Pour ce qui concerne l'excrétion des pregnanetriols, le Tableau 5 montre que celle du 5 β -pregnane-3 α ,

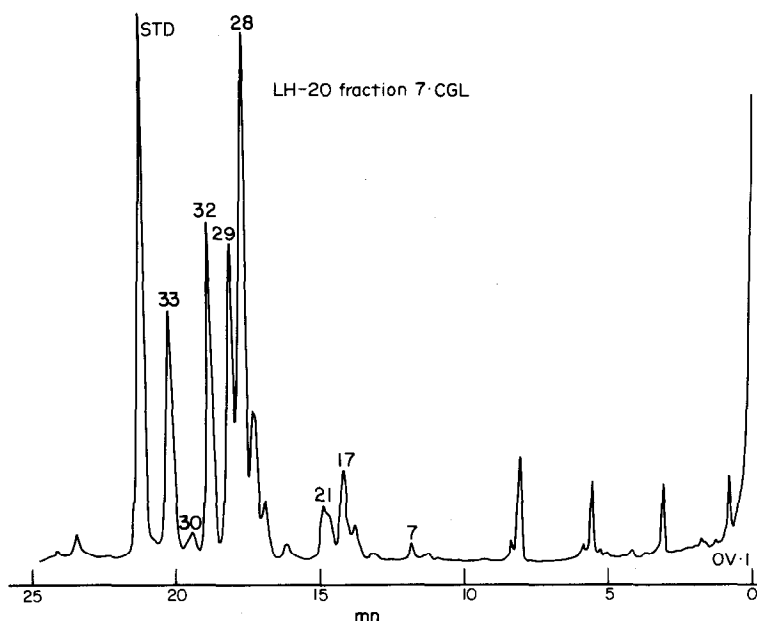


Fig. 8. Analyse par g.l.c. sur OV-1 des stéroïdes de la fraction LH-20 n° 7 provenant de l'hydrolysate urinaire d'une femme enceinte de 8 mois.

Les stéroïdes identifiés sont: la 3 β ,17 β -dihydroxy-5-androsten-16-one [37], le 5 β -prégnane-3 α ,20 α -diol [17], la 3 α ,16 α -dihydroxy-5 β -prégnan-20-one [21], le 5 β -prégnane-3 α ,16 α ,20 β -triol [28], 5 α -prégnane-3 α ,16 α ,20 α -triol [29], le 5 β -prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol [32], le 5 α -prégnane-3 α ,16 β ,20 α -triol [30] et le 5 α -prégnane-3 α ,20 α ,21-triol [33].

Tableau 5. * Nom abrégé de la patiente; ** âge de la gestation en semaines. Dosage des 3 α -hydroxyprégnanes-20-one, 3 α ,16 α -dihydroxy-5 β -prégnan-20-one, 3 β ,6 α -dihydroxy-5 α -prégnan-20-one, des prégnanes-3 α ,20 α -diols de l'oestriol, des prégnanes-3,16,20-triol et du 5 β -prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol

Steréoides dosés par g.l.c. (mg/24 h)	*RUM. **8	ROM. 8	BRU. 12	REN. 19	SEG. 19	TROU. 22	MEL. 26	ROU. 31	ROD. 36	NOL. 36	SUB. 37	PAR. 38	JAR. 40	GRI. 41
3 α -Hydroxy-5 β ,17 α -prégnan-20-one (composé 13)			0,10	0,20	0,25	0,40	0,65	0,85	0,90	1,10	2,10	0,85	1,60	2,65
3 α -Hydroxy-5 α -prégnan-20-one (composé 14)	0,40	0,55	0,65	0,85	0,75	0,95	1,20	2,25	3,00	6,70	4,10	1,35	3,70	4,65
3 α -Hydroxy-5 β -prégnan-20-one (composé 15)	1,10	1,25	2,35	2,60	3,00	4,70	5,70	10,20	7,40	10,40	11,10	5,15	9,65	8,20
3 α ,16 α -Dihydroxy-5 β -prégnan-20-one (composé 21)	0,15	0,25	0,45	0,65	0,85	2,60	3,50	6,00	8,15	15,90	17,40	7,65	10,20	5,40
3 β ,6 α -Dihydroxy-5 α -prégnan-20-one (composé 24)		0,15	0,30	0,45	0,70	1,25	1,70	2,10	4,70	6,50	2,65	3,10	2,65	2,60
5 α -Prégnane-3 α ,20 α -diol (composé 16)	1,00	1,20	1,50	2,00	2,40	3,60	4,20	5,00	8,90	6,20	9,20	5,60	4,70	6,75
5 β -Prégnane-3 α ,20 α -diol (composé 17)	5,60	6,80	17,30	19,20	20,85	36,10	41,50	49,80	39,10	42,50	54,50	36,25	38,80	55,30
Oestriol (composé 45)	0,50	1,60	8,95	10,20	9,40	14,20	17,30	19,20	27,30	29,20	34,30	35,40	44,50	43,20
5 α -Prégnane-3 α ,16 β ,20 α -triol (composé 30)		0,10	0,15	0,20	0,40	0,60	0,20	1,50	2,00	1,00	0,60	0,80	1,20	2,20
5 β -Prégnane-3 α ,16 α ,20 β -triol (composé 28)			0,25	0,30	0,25	0,40	0,60	0,45	3,10	2,20	3,50	2,80	4,20	3,50
5 α -Prégnane-3 α ,16 α ,20 α -triol (composé 29)	0,10	0,20	0,50	0,35	0,40	0,70	0,90	1,20	2,10	3,30	5,80	4,60	3,90	3,15
5 β -Prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol (composé 32)	0,10	0,15	0,20	0,25	1,20	1,30	2,10	1,70	1,20	2,50	1,75	2,20	3,40	2,10
5 α -Prégnane-3 β ,16 α ,20 α -triol (composé 31)			traces	0,15	0,20	0,60	0,80	0,90	0,55	1,30	0,60	1,10	1,20	0,90

17 α ,20 α -triol n'est significativement augmentée qu'après la 26^{ème} semaine, et représente de ces métabolites le composé quantitativement prépondérant jusqu'à la 31^{ème} semaine. Après ce délai, celle des 5 α -pregnane-3 α ,16 α ,20 α -triol et 5 β -pregnane-3 α ,16 α ,20 β -triol devient significativement supérieure à celle du 5 β -à celle du 5 β -prégnane-3 α ,17 α ,20 α -triol.

DISCUSSION

C'est dans le but d'effectuer par chromatographie gaz-liquide l'analyse quantitative des stéroïdes provenant des divers milieux biologiques que nous avons mis au point une technique conjugant la chromatographie liquide sur Sephadex LH-20 à la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse. La chromatographie sur Sephadex LH-20 des stéroïdes réalise leur fractionnement préalable en cinq groupes, ce qui permet de résoudre les difficultés analytiques liées à l'analyse en phase gazeuse. En effet, avec les mélanges éluants utilisés et dans les conditions décrites, les stéroïdes ayant les mêmes coordonnées en chromatographie en phase gazeuse, sont séparés lors du fractionnement préalable ce qui autorise leur analyse quantitative spécifique. C'est le cas par exemple de la 11 β -hydroxyétiocholanolone et de la 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one, du 5 β -pregnane-3 α ,20 α -diol, de la 3 α ,6 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one et de la 16 α -hydroxyoestronone qui ne peuvent être dosés par g.l.c. qu'après avoir été séparés par chromatogra-

phie sur Sephadex LH-20. Indépendamment de la complémentarité obtenue dans l'utilisation de ces deux techniques, la méthode de séparation par chromatographie sur Sephadex LH-20 des stéroïdes libres proposée est simple, réalise des fractionnements reproductible tout en étant quantitative. L'identification des stéroïdes de chaque groupe est réalisée par CG-MS et l'analyse quantitative des stéroïdes identifiés est alors réalisable par g.l.c. selon la méthode de l'étalonnage interne.

La méthode décrite permet ainsi l'étude simultanée de tout un ensemble de métabolites urinaires parmi lesquels nous retiendrons, indépendamment de ceux mentionnés dans le Tableau 5 celle de l'oestronone et de ses dérivés 15 α et 16 α -hydroxylés, de l'oestradiol et du 15 α -hydroxyoestriol dont les taux d'excrétion au vu des résultats obtenus dans ce travail, peuvent être dosés par g.l.c. dès le début du second trimestre de la gestation.

Enfin, compte tenu des potentialités enzymatiques des divers tissus considérés, on peut être tenté de rapporter certains métabolites de la progestérone à un compartiment déterminé de l'unité foetoplacentaire. Ce peut être le cas:

De la 3 α ,16 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one en considérant que l'hydroxylation en 16 α de la progestérone s'effectue essentiellement dans le compartiment foetal qu'il s'agisse des surrénales [36-38] ou du foie foetal [39].

Des prégnanes-3,16,20 β -triol en rapportant la réduction en 20 β de la progestérone au compartiment foetal [40, 41]. Dans cette hypothèse, le dosage du 5 β -prégnane-3 α ,16 α ,20 β -triol, pourrait rendre compte de l'activité surrénalo-hépatofœtale.

Et de la 3 β ,6 α -dihydroxy-5 α -prégnan-20-one, précédemment identifiée par Shackleton [12] dans les urines de nouveau-nés, par Eneroth *et al.* [19] dans celle provenant d'un enfant anencéphalique, par Desgres *et al.* [42] comme étant l'un des catabolites synthétisés à partir de la progestérone dans des cultures de cellules isolées de foie foetal de rat [43] et par nous dans le présent travail. Cet ensemble de faits suggère que ce composé peut être assimilé à un marqueur hépatofœtal.

Remerciements—Nous remercions Monsieur le Professeur Jan Sjövall (Karolinska Institutet, Stockholm) pour nous avoir reçu dans son laboratoire et pour les fructueuses discussions que nous avons pu avoir avec lui.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Mesdames M. Morinière et N. Pitoizet et financé par le V^o et VI^o Plan (Direction de l'Enseignement Supérieur), par des contrats de recherche avec "l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", actions thématiques programmées, 71.1.433.2 et 73.1.519, avec le "Centre National de la Recherche Scientifique, équipe de recherche associée 267" et avec la "Délégation Générale de la Recherche Scientifique et Technique, action complémentaire coordonnée, biologie du développement, 72.704.75".

BIBLIOGRAPHIE

- Vikko R.: *Acta endocr., Copenh. Suppl.* 109 (1966).
- Tikkanen M. J. and Adlercreutz H.: *Acta chem. Scand.* **24** (1970) 3755–3757.
- Nyström E. and Sjövall J.: *Arkiv. Kemi.* **29** (1968) 107–115.
- Carr B. R., Mikhail G. and Flickinger G. L.: *J. clin. Endocr. Metab.* **33** (1971) 358–360.
- Desgres J., Begue R. J. and Padieu P.: *Clin. chim. Acta* **52** (1974) 381–405.
- Gustafsson J. Å., Shackleton C. H. L. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **10** (1969) 302–311.
- Hedfjäll B., Jansson F. A., Mardi Y., Ryhage R. and Wikström S.: *J. Sec. Instr.* **2** (1969) 1031–1035.
- Reimendal R. and Sjövall J.: *Analyt. Chem.* **44** (1972) 21–29.
- Horning E. C., Ikekawa N., Chambaz E. M., Jaakonmaki P. I. and Brooks C. J. W.: *J. Gas. Chromatog.* **5** (1967) 283–292.
- Eneroth P., Hellström K. and Ryhage R.: *Steroids* **6** (1965) 707–720.
- Budzikiewicz H. and Djerassi C.: *J. Am. chem. Soc.* **84** (1962) 1430–1436.
- Schackleton C. H. L. and Gustafsson J. Å.: *Steroids* **18** (1971) 175–186.
- Gustafsson J. Å. and Lisboa B. P.: *Steroids* **15** (1970) 723–735.
- Eriksson H., Gustafsson J. Å. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **6** (1968) 219–226.
- Sjövall J. and Vikko R.: *Steroids* **7** (1966) 447.
- Eriksson H. and Gustafsson J. Å.: *Eur. J. Biochem.* **16** (1970) 268–277.
- Janne O. A. and Vikko R. K.: *Eur. J. Biochem.* **17** (1970) 134–140.
- Gustafsson B. E., Gustafsson J. Å. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **4** (1968) 568–573.
- Eneroth P., Ferngren H., Gustafsson J. Å., Ivemarck B. and Stenberg A.: *Acta endocr., Copenh.* **70** (1972) 113–131.
- Liebermann S., Dobriner K., Hill B. R., Fieser L. and Rhoads C. P.: *J. biol. Chem.* **172** (1948) 263–295.
- Eriksson H. and Gustafsson J. Å.: *Eur. J. Biochem.* **16** (1970) 252–260.
- Gustafsson J. Å., Lisboa B. P. and Sjövall J.: *Eur. J. Biochem.* **6** (1968) 317–324.
- Scharkey A. G., Friedel R. A. and Langer S. H.: *Analyt. Chem.* **29** (1957) 770–777.
- Pasqualini J. R. and Bedrak E.: *J. clin. Endocr. Metab.* **38** (1974) 298–304.
- Richardson E. M., Touchstone J. C. and Dohan F. C.: *J. Clin. Invest.* **34** (1955) 285–301.
- Gustafsson J. Å.: *Eur. J. Biochem.* **14** (1970) 560–566.
- Laatikainen T.: *Eur. J. Biochem.* **14** (1970) 372–378.
- Sjövall J. and Sjövall K.: *Steroids* **12** (1968) 359–366.
- Laatikainen T.: *Steroids* **15** (1970) 139–150.
- Jänne O.: *J. steroid Biochem.* **2** (1971) 33–41.
- Adlercreutz H. and Luukkainen T.: *Acta endocr., Copenh. Suppl.* **124** (1967) 101–140.
- Luukkainen T. and Adlercreutz H.: *Ann. med. exp. Fenn.* **45** (1967) 264–268.
- Zucconi G., Lisboa B. P., Simonitsch E., Roth L., Hagen A. A. and Diczfaluzi E.: *Acta endocr., Copenh.* **56** (1967) 413–423.
- van der Molen H. J.: *Acta endocr., Copenh.* **41** (1962) 247–258.
- Acevedo H. F., Strickler H. S., Gilmore J., Vela B. A., Campbell E. A. and Arras B. J.: *Am. J. Obstet. Gynec.* **102** (1968) 867–879.
- Villee D. B., Engel L. L., Loring J. M. and Villee C. A.: *Endocrinology* **69** (1961) 354–372.
- Solomon S., Bird C. E., Ligng W., Iwamiya M. and Yong P. C. M.: *Recent Prog. Horm. Res.* **23** (1967) 297–347.
- Yamasaki H. and Shimizu K.: *Steroids* **22** (1973) 637–654.
- Lisboa B. P. and Gustafsson J. Å.: *Steroids* **12** (1968) 249–260.
- Bird C. E., Wiqvist N., Diczfaluzi E. and Solomon S.: *J. clin. Endocr. Metab.* **26** (1966) 1144–1154.
- Greig M., MacNaughton M. C.: *J. Endocr.* **39** (1967) 153–162.
- Desgres J., Guiguet M., Begue R. J. and Padieu P.: *Advances in Mass Spectrometry Biochemistry and Medicine* (Edited by A. Frigerio and N. Castagnoli Jr.), Spectrum Publications, New York (1975).
- Chessebeuf M., Olsson A., Bournot P., Desgres J., Guiguet M., Maume G., Maume B. F., Perissel B. and Padieu P.: *Biochimie* **56** (1974) 1365–1379.