

## Le dosage chimique des corticostéroïdes urinaires\*

Par R. BORTH

Laboratoire d'Endocrinologie de la Clinique universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique

(Professeur H. DE WATTEVILLE), Genève

### I. Introduction

S'il y a eu une période, dans l'histoire de la médecine, où l'endocrinologie clinique se bornait à décrire les monstres, aussi rares que spectaculaires, qu'engendre la dysfonction grave ou l'absence totale d'une glande endocrine, cette période appartient au passé. Nous savons aujourd'hui que la plupart des hormones exercent leurs effets subtiles et continus non seulement sur quelques organes récepteurs proprement dits mais partout dans l'organisme. On s'est rendu compte que les troubles endocriniens accompagnent, ou même provoquent, souvent des affections dont l'aspect clinique, à première vue, ne fait pas nécessairement supposer une composante hormonale. C'est pourquoi le clinicien ressent de plus en plus le besoin de pouvoir disposer de moyens qui lui permettent d'explorer les fonctions hormonales, que ce soit pour aider le diagnostic, pour guider une thérapeutique hormonale ou encore pour contribuer à la recherche scientifique dans le domaine de l'endocrinologie humaine.

L'exploration hormonale en clinique peut se faire selon trois principes différents :

1. par l'étude clinique en observant dans l'organisme d'un malade les réactions à une hormone endogène ou administrée ;
2. par le dosage biologique en observant et, de préférence, en mesurant les effets qu'exercent sur les animaux de laboratoire les substances actives contenues dans les urines ou le sang des patients ;
3. par le dosage chimique qui donne directement le taux d'une hormone ou de ses métabolites dans l'humeur analysée.

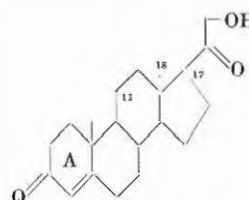
Chacun de ces trois principes a ses mérites et ses défaillances et il ne peut être question d'abandonner entièrement l'un en faveur des autres. Notons cependant, sans entrer dans les détails, que seuls le deuxième et le troisième principe peuvent fournir une réponse quantitative. D'une manière générale, on peut dire que les méthodes chimiques sont souvent moins coûteuses, plus simples, plus rapides et plus précises que les méthodes biologiques, tandis que celles-ci possèdent une spécificité et une sensibilité remarquables. La plupart des hormones sont éliminées dans les urines sous forme de métabolites inactifs ou à activité biologique réduite : c'est là la plus importante des raisons qui nous obligent à avoir

recours aux méthodes chimiques. Ces dernières ne seront pourtant applicables qu'à condition d'avoir pu établir au préalable l'existence d'une corrélation constante entre les hormones en question et les substances chimiques dosées. Nous pensons qu'il faut exiger de cette corrélation qu'elle soit prouvée par des observations cliniques aussi bien que par des études métaboliques.

### II. Principes du dosage chimique

En voulant définir le groupe de substances auquel nous avons affaire, nous remarquons que le terme « corticostéroïdes », bien qu'employé universellement, n'a pas une signification très précise. Il est certain qu'il comprend, outre les huit stéroïdes à activité corticale (tableau 1) que l'on a isolés à partir de la surrénale de

Tableau 1. - Hormones surrénaliennes



Nom usuel	Groupement en			Substance de REICHSTEIN	Compound de KENDALL
	C-11	C-17	C-18		
Cortexone . . .				Q	-
Corticostérone .	CHOH			II	B
Aldostérone . .	CHOH		CHO	-	-
11-Déhydrocorticostérone .	CO			-	A
17-Hydroxycortexone . . .		COH		S	-
Cortisol . . . .	CHOH	COH		M	F
«Allo-tétrahydrocortisol»*	CHOH	COH		C	C
Cortisone . . . .	CO	COH		Fa	E

\* Saturé au cycle A

bœuf<sup>1,2</sup>, encore d'autres stéroïdes trouvés dans cette glande ainsi que leurs métabolites urinaires. D'autre part, on ne voudrait inclure dans la définition ni des substances comme la progestérone ou l'œstrone (trouvées dans la surrénale) et leurs métabolites urinaires, ni les

\* Travail d'habilitation présenté à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève (novembre 1955).

<sup>1</sup> T. REICHSTEIN, *Chimia* 4 (1950) 21, 47.

<sup>2</sup> T. REICHSTEIN, *Acta Endocr.* (Copenhague) 17 (1954) 375.

17-cétostéroïdes neutres, groupe de stéroïdes en C<sub>10</sub> dont une partie représente également des métabolites surrénaliens<sup>3</sup>.

Le biochimiste au laboratoire clinique trouvera pratique d'appeler *corticostéroïdes* les stéroïdes en C<sub>21</sub> que l'on n'a trouvés que dans la surrénale et, en même temps, éventuellement dans l'urine, ainsi que leurs dérivés hydrogénés. Il est, en plus, utile de distinguer clairement les termes suivants : *stéroïdes surrénaliens* (tous les stéroïdes isolés à partir des surrénales), *hormones surréna-liennes* (les huit stéroïdes à activité corticale) et *corticoïdes* (substances ressemblant aux corticostéroïdes par une propriété biologique ou chimique et contenues dans les tissus et les humeurs) (cf. NORZYMBERSKI et coll.<sup>4</sup>).

Même en limitant ainsi les «corticostéroïdes» à certains dérivés du prégnane et de l'allopégnane, un simple dosage chimique de l'ensemble de ces substances ne sera jamais possible. Toute réaction spécifique étant liée aux groupements fonctionnels de la molécule et à leurs positions, ces propriétés varient trop d'un corticostéroïde à l'autre pour permettre de les caractériser par une seule réaction chimique. Les quantités d'urine disponibles au laboratoire clinique et les concentrations présentes ne permettent pas non plus l'isolement des substances individuelles, leur pesée et leur identification par les méthodes classiques de la chimie organique. (Le prégnandiol, en tant que métabolite principal de la progestérone, est la seule exception à cette règle qui soit réalisable en pratique.) Par les *réactions colorées* servant actuellement au dosage des corticostéroïdes urinaires, on ne dose que l'un ou l'autre sous-groupe de ces métabolites, caractérisé par un arrangement semblable des groupements fonctionnels qui les fait réagir de façon identique aux mêmes réactifs et dans des conditions d'essai données.

Ce dosage colorimétrique qui représente la mesure finale sera toujours précédé d'une *extraction* et d'un *fractionnement* qui ont pour but de concentrer suffisamment les corticostéroïdes dans l'extrait et d'éliminer le plus possible les substances urinaires dites non spécifiques qui pourraient gêner, inhiber ou même imiter la réaction colorée utilisée. La concentration des stéroïdes dans les urines est minime par rapport à beaucoup d'autres substances et ne permet évidemment pas leur dosage direct comme on le pratique p. ex. pour la créatinine ou l'urée. L'extraction commencera toujours par un partage entre la phase aqueuse qu'est l'urine et un solvant approprié, non miscible à l'eau. On se débarrasse ainsi d'un seul coup de la presque totalité des substances inorganiques et les stades suivants de l'extraction viseront à l'élimination, plus difficile, des substances organiques non désirables.

Lors du premier partage, on peut extraire les stéroïdes soit comme glucuro- ou sulfo-conjugués (c'est-à-dire, liés à l'acide glucuronique ou sulfurique), soit comme sté-

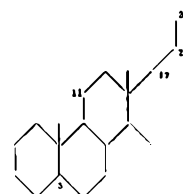
roïdes libres. La plupart des stéroïdes étant excrétés sous forme conjuguée, l'extraction à l'état libre doit être précédé d'une *hydrolyse* pour rompre la liaison estérique avec l'acide sulfurique ou la liaison glucosidique avec l'acide glucuronique\*, modifiant ainsi le coefficient de partage en faveur des solvants organiques peu polaires qui seront employés pour l'extraction.

*Hydrolyse, extraction et réaction colorimétrique* sont les stades essentiels du dosage des corticostéroïdes urinaires. Ce schéma classique a été modifié par la mise au point de *méthodes sans hydrolyse* et par l'emploi de réactifs à action spécifique qui *transforment, avant l'hydrolyse*, une partie des corticostéroïdes en 17-cétostéroïdes dosables, eux, par la réaction de ZIMMERMANN<sup>6</sup> ou une de ses modifications<sup>7-10</sup>.

Notre travail traite de plusieurs aspects choisis du dosage des corticostéroïdes urinaires. L'ordre des sujets présentés correspondra au bref exposé qui précède.

### III. Réactions colorimétriques

A quelques exceptions près non utilisées dans la routine, toutes les réactions colorimétriques des corticostéroïdes sont des réactions de la chaîne latérale et de l'éventuel groupe hydroxyle en position 17. Il est important de noter que les réactions colorimétriques n'indiquent aucune des autres différences de constitution,



telles que l'absence ou la présence d'un groupe hydroxyle ou cétonique en C-11 ou la formule spciale, p. ex. 5 $\alpha$  (allopégnane) ou 5 $\beta$  (prégnane). (Pour la nomenclature des stéroïdes, voir *Helv. Chim. Acta* 34 [1951] 1680.) Pour mettre en évidence toutes ces importantes différences structurales et pour savoir même si, oui ou non, nous avons affaire à des stéroïdes, nous devons employer d'autres critères. Nous répétons que les réactions colorimétriques dites des corticostéroïdes ne font intervenir que les groupements fonctionnels en positions 17, 20 et 21.

Conformément à la définition que nous avons donnée, les corticostéroïdes possèdent deux ou trois atomes d'o-

\* La grande majorité des corticostéroïdes semble être présente sous ces deux formes. Nous ne parlerons pas ici de la possibilité, encore peu étudiée, d'autres formes de conjugaison<sup>5</sup>.

<sup>3</sup> S. LIEBERMAN et K. DOBRINER, *Recent Progr. Hormone Res.* 3 (1948) 71.

<sup>4</sup> W. ZIMMERMANN, *Schweiz. med. Wschr.* 76 (1946) 805.

<sup>7</sup> MRC Committee on Clinical Endocrinology, *Lancet* 2 (1951) 585.

<sup>8</sup> P. L. MUNSON et A. D. KENNY, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 135.

<sup>9</sup> H. L. MASON, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 443.

<sup>10</sup> H. L. MASON, *J. Clin. Endocr.* 13 (1953) 1009.

<sup>3</sup> R. I. DOBMAN, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 5.

<sup>4</sup> J. K. NORZYMBERSKI, R. D. STUBBS et H. F. WEST, *Lancet* 1 (1953) 1276.

xygènes en position 17, 20 ou 21; l'un, toujours présent (sous forme d'un groupe hydroxyle ou cétonique) se trouve en C-20; le ou les autres se fixent en C-21, en C-17 ou simultanément à ces deux endroits. Il existe donc six différentes constitutions de cette partie de la

molécule\*. Nous les reproduisons ici schématiquement et nous en citons quelques représentants typiques parmi les stéroïdes urinaires<sup>12</sup>. Il n'est pas inutile de souligner qu'il s'agit d'exemples et de rappeler que le nombre des stéroïdes urinaires s'élève au moins à une centaine<sup>13</sup>.

Tableau 2. — Réactions colorimétriques des corticostéroïdes

Réactifs	Nom donné au groupe dosé	Chaîne latérale					
		I	II	III	IV	V	VI
		$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Ion cuprique ou Acide phospho-molybdique ou Dérivés du tétrazolium	Stéroïdes réducteurs <sup>14-22</sup>	+		+			
Phénylhydrazine en milieu acide	17,21-Dihydroxy-20-cétostéroïdes <sup>23,21</sup>	+					
2,4-Dinitrophénylhydrazine en milieu alcalin	Cétostéroïdes <sup>25</sup>	-		+		(+)	
Periodate; <i>m</i> -dinitrobenzène	17,20-Dihydroxystéroïdes <sup>26,27</sup>		+				+
Periodate; acide chromotrope	Stéroïdes formaldéhydogènes <sup>28-30</sup>	+	+	+	+		
Periodate; 4-hydroxydiphényle	Stéroïdes acétaldéhydogènes <sup>31</sup>						+
Bismuthate; <i>m</i> -dinitrobenzène	Stéroïdes 17-cétogènes <sup>4,32</sup>	+	+				+
Borohydrure sodique; bismuthate; <i>m</i> -dinitrobenzène	17-Hydroxycorticostéroïdes totaux <sup>33,34</sup>	+	+			+	+
Bismuthate; borohydrure sodique; bismuthate; <i>m</i> -dinitrobenzène	21-Désoxy-17-hydroxy-20-cétostéroïdes <sup>35</sup>					+	
Acide chromique; <i>m</i> -dinitrobenzène	17-Hydroxy- et 17-cétostéroïdes totaux <sup>36</sup>	+	+			+	+

\* LIEBERMAN et coll.<sup>11</sup> ont isolé deux stéroïdes d'origine surrénalienne probable qui ne portent qu'une fonction oxygène à la chaîne latérale: la 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol-11-one et la 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ -ol-11,20-dione. Des substances de ce type échapperont à toutes les techniques colorimétriques employées à présent dans ce domaine.

<sup>11</sup> S. LIEBERMAN, D. K. FUKUSHIMA et K. UODINER, *J. Biol. Chem.* 182 (1950) 299.

<sup>12</sup> L. T. SAMUELS et C. D. WEST, *Vitamins & Horm.* 10 (1952) 286.

<sup>13</sup> S. LIEBERMAN et S. TEICH, *Pharmacol. Rev.* 5 (1953) 340.

<sup>14</sup> N. B. TALBOT, A. H. SALTZMAN, R. L. WIXOM et J. K. WOLFE, *J. Biol. Chem.* 160 (1945) 535.

<sup>15</sup> R. D. H. HEARD et H. SOBEL, *J. Biol. Chem.* 165 (1946) 687, 699.

<sup>16</sup> R. D. H. HEARD, H. SOBEL et E. H. VENNING, *J. Biol. Chem.* 165 (1946) 699.

<sup>17</sup> H. STAUDINGER et M. SCHMEISSER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 283 (1948) 54.

<sup>18</sup> H. STAUDINGER et M. SCHMEISSER, *Biochem. Z.* 321 (1950) 83.

<sup>19</sup> C. CHEN et H. E. TEWELL, *Fed. Proc.* 10 (1951) 377.

<sup>20</sup> R. B. BURTON, A. ZAFFARONI et E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.* 188 (1951) 763.

<sup>21</sup> A. A. HENLY, *Nature (London)* 169 (1952) 877.

<sup>22</sup> G. OERTEL, *Acta Endocr. (Copenhague)* 16 (1954) 267.

<sup>23</sup> C. C. PORTER et R. H. SILBER, *J. Biol. Chem.* 185 (1950) 201.

<sup>24</sup> R. H. SILBER et C. C. PORTER, *J. Biol. Chem.* 210 (1954) 923.

<sup>25</sup> A. G. GORNALL et M. P. MACDONALD, *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 279.

<sup>26</sup> N. B. TALBOT et I. V. EITINGTON, *J. Biol. Chem.* 154 (1944) 605.

<sup>27</sup> L. F. FIESER, M. FIELDS et S. LIEBERMAN, *J. Biol. Chem.* 156 (1944) 191.

<sup>28</sup> W. H. DAUGHADAY, H. JAFFE et R. H. WILLIAMS, *J. Clin. Endocr.* 8 (1948) 166.

<sup>29</sup> A. C. CORCORAN et I. H. PAGE, *J. Lab. Clin. Med.* 33 (1948) 1326.

<sup>30</sup> H. L. MASON, *J. Clin. Endocr.* 11 (1951) 743.

<sup>31</sup> R. I. COX, *Biochem. J.* 52 (1952) 339.

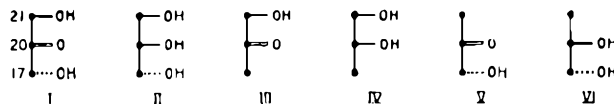
<sup>32</sup> J. K. NORBYMERSKI et R. D. STUBBS, *Lancet* 2 (1954) 386.

<sup>33</sup> J. I. APPLEBY, G. GIBSON, J. K. NORBYMERSKI et R. D. STUBBS, *Biochem. J.* 57 (1954) xiv.

<sup>34</sup> J. I. APPLEBY, G. GIBSON, J. K. NORBYMERSKI et R. D. STUBBS, *Biochem. J.* 60 (1955) 453.

<sup>35</sup> J. I. APPLEBY et J. K. NORBYMERSKI, *Biochem. J.* 60 (1955) 460.

<sup>36</sup> H. WILSON et R. FAIRDANKS, *Arch. Biochem. Biophysics* 53 (1954) 71.

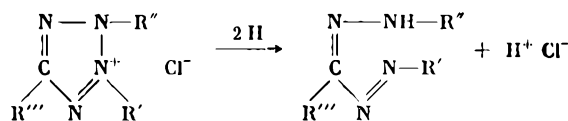


- I «Tétrahydrocortisone» (5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-11,20-dione)  
 II «Héxahydrocortisol» (5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20,21-pentol)\*  
 III  $\Delta^4$ -prégnén-3 $\beta$ ,21-diol-20-one  
 V 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-one  
 VI 5 $\beta$ -prégnane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20-triol

A notre connaissance, des substances possédant une chaîne latérale du type IV n'ont pas encore été isolées à partir de l'urine; probablement parce qu'elles se trouvent dans la fraction non cétonique, encore relativement peu explorée.

Il est évident que les six types de chaîne latérale ne réagissent pas tous de la même façon avec les réactifs tels qu'ils sont employés pour le dosage colorimétrique de ces stéroïdes (tableau 2).

Le groupement cétonique (types I et III) confère à la molécule un pouvoir réducteur semblable à celui de certains saccharides (p.ex. fructose) et c'est en effet au moyen des réactifs des sucres réducteurs ou encore des dérivés du tétrazolium



que l'on dose les corticostéroïdes réducteurs. Soulignons que la substance colorée qui permet de faire la mesure colorimétrique ne renferme aucun atome de carbone provenant des stéroïdes dosés; ces derniers ne fournissent que les électrons et atomes d'hydrogène nécessaires à la réduction de l'ion cuprique et de l'acide phosphomolybdique\*\* ou à la transformation du chlorure de tétrazolium en formazane.

La réaction du groupement dihydroxy-acétonique (type I) avec la phénylhydrazine en milieu sulfurique correspond à la formation des osazones des cétoles et cétoles et permet le dosage colorimétrique des 17,21-dihydroxy-20-céto-stéroïdes; leur squelette de 21 atomes de carbone semble participer intégralement à la constitution des produits colorés qui paraissent être des bisphénylhydrazones<sup>24</sup>. La réaction est employée dans deux méthodes qui ont rapidement acquis une grande importance clinique: le dosage des corticostéroïdes du sang<sup>27</sup>, dont nous parlons dans un autre travail<sup>28</sup>, et le dosage des chromogènes PORTER-SILBER butylosolubles de l'urine<sup>29</sup>, méthode sans hydrolyse qui sera traitée au chapitre VI.

\* Réemment isolé par BUSH (communication personnelle).

\*\* L'acide phospho-molybdique est réduit aussi par le groupement  $\Delta^4$ -3-cétonique; des stéroïdes avec ce groupement se trouvent dans les urines en quantité très faible.

<sup>27</sup> D. H. NELSON et L. T. SANUELS, *J. Clin. Endocr.* 12 (1952) 519.

<sup>28</sup> E. ENGEL, M. L. HELMREICH, J. HERTOEGHE et R. BORTH, *Sem. Hôp. Paris* 31 (1955) 70.

<sup>29</sup> W. J. REDDY, D. JENKINS et G. W. THORN, *Metabolism* 1 (1952) 511.

Les 2,4-dinitro-phénylhydrazones se forment facilement à partir de beaucoup de groupes cétoniques et leur couleur foncée en milieu alcalin sert depuis longtemps au dosage de l'acétone, de l'acide pyruvique, etc. Appliquée aux *cétostéroïdes* (type I, III et V), la réaction manque évidemment de spécificité, mais elle est remarquable par le fait que chacun des groupements fonctionnels contribue pour une part fixe à l'absorption globale de l'hydrazone. L'extinction due aux groupements  $\Delta^4$ -3-cétonique et 17-dihydroxy-acétonique (type I) dépasse de loin celle de toutes les autres fonctions étudiées; il existe donc, dans ce sens, une certaine spécificité d'ordre quantitatif, sinon qualitatif, pour les hormones surrénales.

Les ions periodate et bismuthate attaquent d'une façon très spécifique le groupement  $\alpha$ -cétonique ou glycolique, c'est-à-dire tous les types de chaîne latérale à l'exception du type V. La réaction est une oxydation avec dégradation, la liaison entre les deux atomes de carbones voisins étant rompue en même temps. Les deux réactifs diffèrent quant à leur action sur le type I; contrairement au periodate, le bismuthate attaque également les  $\alpha$ -hydroxy-acides qui sont formés au premier stade de l'oxydation et, par conséquent, la réaction ne s'arrête pas à ce stade. Les produits de la réaction qui se prêtent au dosage colorimétrique sont le formaldéhyde (réaction à l'acide chromotropique) ou l'acétaldéhyde (réaction au 4-hydroxy-diphényle), d'une part, et les 17-cétostéroïdes (réaction de ZIMMERMANN), d'autre part. Les groupes correspondants de stéroïdes dosés sont appelés *stéroïdes formaldéhydrogènes* (type I, II, III et IV), *acétaldéhydrogènes* (type VI) ou *17-cétogènes* (type I, II et VI), *17,20-dihydroxystéroïdes* (type II et VI), *17-hydroxy-corticostéroïdes totaux* (type I, II, V et VI) et *21-désoxy-17-hydroxy-20-céto-stéroïdes* (type V). Le type V est compris dans les deux derniers groupes grâce à l'hydrogénisation préalable des groupes cétoniques par le borohydride sodique ou potassique qui transforme le type V en type VI, attaquant, lui, par le bismuthate. Ces réactions étant faites avant l'hydrolyse, nous en parlerons au chapitre VI.

L'acide chromique transforme en 17-cétostéroïdes beaucoup de stéroïdes ayant un groupe hydroxyle en C-17. Sur ce fait bien connu dans la chimie des stéroïdes est basée une méthode pour le dosage global des *stéroïdes porteurs d'un oxygène en C-17*, y compris les stéroïdes à 19 atomes de carbone. Mais l'acide chromique, par l'oxydation d'autres groupes de la molécule, transforme les 17-cétostéroïdes vrais (c'est-à-dire, ceux qui sont déjà excrétés sous cette forme par l'organisme) en dérivés plus chromogènes. De ce fait, la méthode ne permet pas de distinguer la part d'absorption due uniquement aux 17-cétostéroïdes formés à partir de corticostéroïdes par le réactif. Ce manque de spécificité est à notre avis un désavantage qui n'est pas compensé par la simplicité et la précision, indéniables, de cette technique.

Tableau 3. - Pouvoir chromogène comparé de quelques corticostéroïdes dans plusieurs réactions colorées

Les chiffres indiquent les densités optiques, par rapport à celle de la cortisone posée égale à 100, provoquées par des quantités pondérales égales et mesurées au maximum de la courbe d'absorption

Groupe dosé	Corti- sone	Cortisol	17- Hydroxy- cortexone	«Tétrahydro- cortisone»	«Tétrahydro- cortisol»	«Tétrahydro- 17-hydroxy- cortexone»	Auteurs
<i>17,21-Dihydroxy- 20-cétostéroïdes</i>							
Méthode de 1950 . . . . .	100	32	34	79	2 3*	4	BROOKS et NORYMBERSKI <sup>40</sup> WILSON et FAIRBANKS <sup>30</sup>
Méthode de 1954 . . . . .	100	94	98	91	69		SILBER et PORTER <sup>24</sup>
<i>Stéroïdes 17-cétogènes</i>							
Colorimétric selon CALLOW et coll. <sup>41</sup> . . . . .	100	77	119	111	85 58**	104	WILSON <sup>42</sup>
Colorimétrie selon WILSON	100		107	103	57 40**	82	WILSON <sup>42</sup>
<i>Cétostéroïdes</i> . . . . .	100	104***	92	56**			GORNALL et MACDONALD <sup>25</sup>

\* Stéréo-isomère 5 $\alpha$ , 3 $\beta$  \*\* Stéréo-isomère 5 $\alpha$  \*\*\* Acétate

On voit, résumé par le tableau 2, que de ces dix groupes de corticostéroïdes dosables, aucun ne comprend exactement les mêmes types de stéroïdes. Il est donc évident que les taux trouvés varieront selon la méthode employée.

Dans la plupart de ces groupes, un autre fait vient encore compliquer l'aspect quantitatif. Le dosage colorimétrique est une comparaison des absorptions de deux solutions : l'une contient un corticostéroïde pur servant d'étalon ; l'autre contient l'extrait, c'est-à-dire, un mélange renfermant, dans le cas particulier, un nombre inconnu de différents corticostéroïdes en proportion inconnue et variable (sans parler des substances urinaires non stéroïdiques présentes). Or, on a démontré que le pouvoir chromogène peut varier énormément d'un stéroïde à l'autre. Nous en donnons quelques exemples, calculés d'après des indications de la littérature, dans le tableau 3.

Il en ressort que l'on n'obtient souvent qu'une approximation plus ou moins grossière des quantités recherchées, lorsqu'on exprime le résultat du dosage en équivalents pondéraux de l'étalon employé. Le tableau montre également que, heureusement, les équivalents chromogènes peuvent être modifiés par les changements de technique et qu'un certain progrès a été réalisé récemment dans ce domaine. Mais il s'agit malgré tout d'une difficulté inhérente, inévitable tant qu'on a affaire

à des mélanges et non à un seul stéroïde à la fois. C'est donc aux procédés d'extraction et de fractionnement qu'incombe la tâche de trancher cette difficulté.

Lors du dosage des stéroïdes acét- ou formaldéhydogènes, cette complication n'existe pas. Dans ces groupes, la substance dans l'extrait réagissant avec le réactif pour donner la couleur spécifique, est rigoureusement identique à celle de l'étalon, une molécule d'aldéhyde HCHO ou CH<sub>3</sub>CHO étant formée pour chaque molécule de stéroïde ; la constitution du noyau n'importe pas puisque seulement la partie scindée prend part à la réaction.

Nous ne parlerons pas ici de la technique et théorie colorimétriques. Soulignons, cependant, qu'il sera souvent utile, même indispensable, d'éliminer l'absorption due aux chromogènes non spécifiques des extraits au moyen d'une équation de correction d'après GIBSON et EVELYN<sup>43</sup> (lectures à deux longueurs d'ondes) ou, mieux, d'après ALLEN<sup>44</sup> (trois longueurs d'ondes).

#### IV. Extraction et fractionnement

L'extraction et la purification des corticostéroïdes urinaires se font en premier lieu au moyen de l'ampoule à décanter, c'est-à-dire par partage entre deux phases liquides. Pour pouvoir adopter une technique appropriée, il est utile d'examiner les lois physico-chimiques qui gouvernent ce simple procédé classique.

Lorsqu'un volume d'une solution, contenant la quantité  $Q$  d'une certaine substance, a été extrait  $n$  fois avec

<sup>40</sup> C. J. W. BROOKS et J. K. NORYMBERSKI, *Biochem. J.* 55 (1953) 371.

<sup>41</sup> N. H. CALLOW, R. K. CALLOW et C. W. EMMENS, *Biochem. J.* 32 (1938) 1312.

<sup>42</sup> H. WILSON, *Arch. Biochem. Biophysics* 52 (1954) 217.

<sup>43</sup> J. G. GIBSON et K. A. EVELYN, *J. Clin. Invest.* 17 (1938) 153.

<sup>44</sup> W. M. ALLEN, *J. Clin. Endocr.* 10 (1950) 71.

chaque fois  $\frac{1}{p}$  volume\* d'un solvant non miscible, la quantité de substance restant encore dans la solution est égale à

$$Q \cdot \left( \frac{K \cdot p}{K \cdot p + 1} \right)^n,$$

$K$  étant le coefficient de partage de la substance entre les deux solvants. Ce coefficient est le quotient des concentrations dans les deux phases à l'état d'équilibre :

$$K = \frac{\text{concentration dans la solution extraite}^{**}}{\text{concentration dans le solvant d'extraction}}$$

Soulignons que c'est le produit  $K \cdot p$  qui est déterminant ; on ne peut considérer le seul coefficient de partage sans tenir compte de la quantité de solvant en même temps.

La fraction  $P_n$  de la substance récupérée dans les portions réunies de solvant est, par conséquent,

$$P_n = \frac{Q - Q \left( \frac{Kp}{Kp + 1} \right)^n}{Q} = 1 - \left( \frac{Kp}{Kp + 1} \right)^n = 100 P_n \%$$

La figure 1 montre la relation entre le nombre d'extractions successives ( $n$ ) et la récupération totale ( $100 P_n \%$ ) pour quelques valeurs typiques de  $K$  et du volume  $\frac{1}{p}$ .

Après quatre extractions avec 200 cm<sup>3</sup> par litre ( $p = 5$ ), on récupérera au moins 99 % des substances dont la valeur de  $K$  ne dépasse pas 0,10 ; deux extractions avec  $\frac{1}{2}$  volume auront presque le même effet. Même des substances ayant un coefficient de partage peu favorable ( $K = 1,00$ ) seront extraites presque totalement (97 %) par cinq extractions avec un volume égal à celui de la solution à extraire ( $p = 1$ ).

Il est évident que la récupération s'améliore si le nombre d'extractions augmente. Nous nous sommes demandé quel sera le gain obtenu en faisant deux ou plusieurs extractions au lieu d'une. On peut facilement démontrer que la récupération additionnelle

$$\Delta P_n = P_n - P_1 = \frac{Kp}{Kp + 1} - \left( \frac{Kp}{Kp + 1} \right)^n$$

ne peut dépasser des valeurs maxima  $(\Delta P_n)_{\max}$  qui ne seront atteintes que pour certaines valeurs du produit  $K \cdot p$  :

$$(\Delta P_n)_{\max} = \frac{n-1}{n \cdot \sqrt[n]{n}} \quad \text{et} \quad (K \cdot p)_{\max} = \frac{1}{\sqrt[n]{n-1}}$$

\* En parlant de « volume de solvant » nous entendons, dans la discussion qui suit, toujours le volume relatif, par rapport au volume de la solution à extraire, ce dernier étant considéré comme égal à l'unité.

\*\* Selon la définition usuelle,

$$K = \frac{\text{concentration dans la couche supérieure}}{\text{concentration dans la couche inférieure}}$$

Nous ne l'avons pas adoptée dans ce travail pour simplifier la comparaison entre les solvants plus légers ou plus lourds que l'eau.

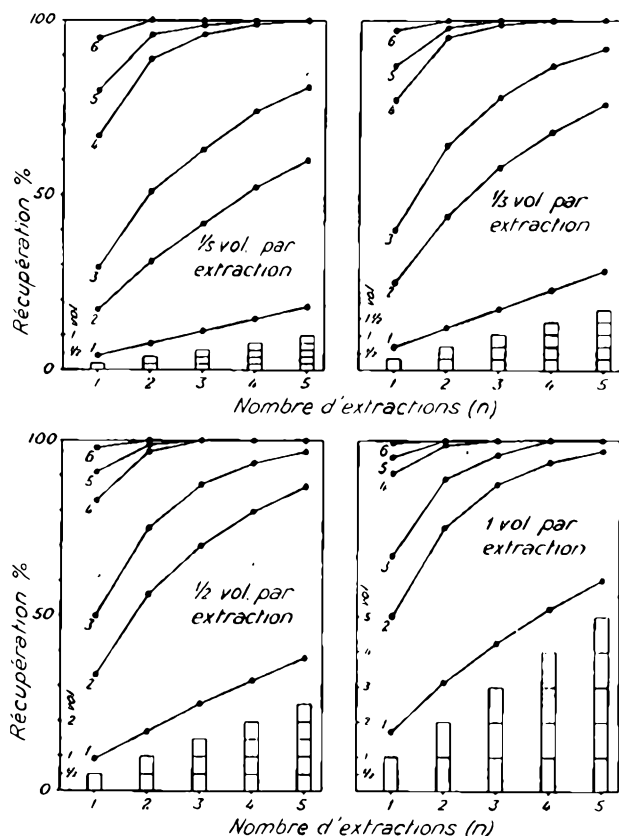


Fig. 1. - Effet du nombre d'extractions et de la quantité de solvant sur l'efficacité de l'extraction par partage entre deux phases liquides

Courbes: Récupération de substances avec le même coefficient de partage ( $K$ )

Colonnes: Quantité totale de solvant par rapport à la solution à extraire

Chaque extraction est faite avec, respectivement,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$  ou  $\frac{1}{1}$  du volume de la solution à extraire

Courbe n°	1	2	3	4	5	6
Valeur de $K$ :	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01

Les valeurs numériques sont données dans le tableau 4. Nous en retenons que les extractions à partir de la deuxième seront le plus efficace dans des conditions relativement peu favorables ( $K \cdot p > 1$ ), c'est-à-dire, lorsque la première extraction n'aura abouti qu'à une récupération de 50 % ou moins.

Tout le monde sait que « trois extractions avec 100 cm<sup>3</sup> valent mieux qu'une avec 300 cm<sup>3</sup> ». Si cela est incontestable, l'analyse mathématique du problème donne néanmoins des résultats assez surprenants et fournit des précisions utiles.

Nous nous demandons quelle est la récupération obtenue après  $n$  extractions avec  $n$  portions égales de volume  $\frac{v}{n}$ , le volume total ( $v$ ) du solvant étant fixe.

Comme  $v = n \cdot \left( \frac{1}{p} \right) = \frac{n}{p}$  et  $p = \frac{n}{v}$ , on obtient

$$P_n = 1 - \left( \frac{K \cdot \frac{n}{v}}{K \cdot \frac{n}{v} + 1} \right)^n = 1 - \left( \frac{Kn}{Kn + v} \right)^n$$

Tableau 4. - Récupération additionnelle réalisable au maximum par plusieurs extractions au lieu d'une, avec des volumes égaux de solvant par extraction

Nombre total d'ex-tractions <i>n</i>	Récupération additionnelle maximum ( $\Delta P_n$ ) <sub>max</sub> % *	(K·p) <sub>max</sub>	Volume de solvant par extraction, l/p **				Récupération après la première extraction *** % *
			1/5	1/3	1/2	1/1	
			Coefficient de partage, K				
2	25	1,000	0,20	0,33	0,50	1,00	50
3	38	1,366	0,27	0,46	0,68	1,37	42
4	47	1,702	0,34	0,57	0,85	1,70	37
5	53	2,020	0,40	0,67	1,01	2,02	33

\* pour cent de la quantité totale présente dans la solution à extraire

\*\*  $p = \frac{\text{cm}^3 \text{ de solution à extraire}}{\text{cm}^3 \text{ de solvant d'extraction}}$

\*\*\* Dans les mêmes conditions (même valeur du produit K·p) qui permettent d'obtenir le maximum de récupération par l'ensemble des extractions suivantes

Nous représentons la relation entre le nombre (*n*) de portions du solvant d'extraction et la récupération obtenue (100 P<sub>n</sub> %) dans la figure 2, en choisissant, comme pour la figure 1, quelques valeurs typiques de *v* et K. Là aussi, coefficient de partage et volume de solvant ne peuvent être considérés indépendamment l'un de l'autre ; c'est le quotient  $\frac{v}{K}$  qui compte. On voit que l'effet de la sousdivision (et du travail supplémentaire qui en résulte) est pratiquement nul dans les conditions peu favorables ( $\frac{v}{K} < 0,5$ ) ou très favorables ( $\frac{v}{K} > 20$ ) et qu'il est relativement modeste dans les conditions intermédiaires. C'est la division en deux qui est la plus efficace, le rendement des sousdivisions suivantes (de 2 à 3, de 3 à 4, etc.) allant en diminuant.

On peut calculer la récupération additionnelle ( $\Delta P_n$ ) obtenue en employant une quantité donnée (*v*) de solvant en deux ou plusieurs (*n*) portions égales au lieu d'une portion :

$$\Delta P_n = P_n - P_1 = \frac{K}{K+v} - \left(\frac{Kn}{Kn+v}\right)^n$$

La maximum ( $\Delta P_n$ )<sub>max</sub> de ce gain est réalisé pour les valeurs de  $\frac{v}{K}$  qui remplissent la condition suivante :

$$\left(1 + \frac{v}{Kn}\right)^{n+1} - \left(1 + \frac{v}{K}\right)^2 = 0$$

ce que l'on peut aussi écrire ainsi :

$$\sum_{r=0}^{n-2} \left| \binom{n+1}{r} n^r \left(\frac{v}{K}\right)^{n-r} \right| - \frac{n^n (n-1)}{2} \frac{v}{K} - n^n (n-1) = 0$$

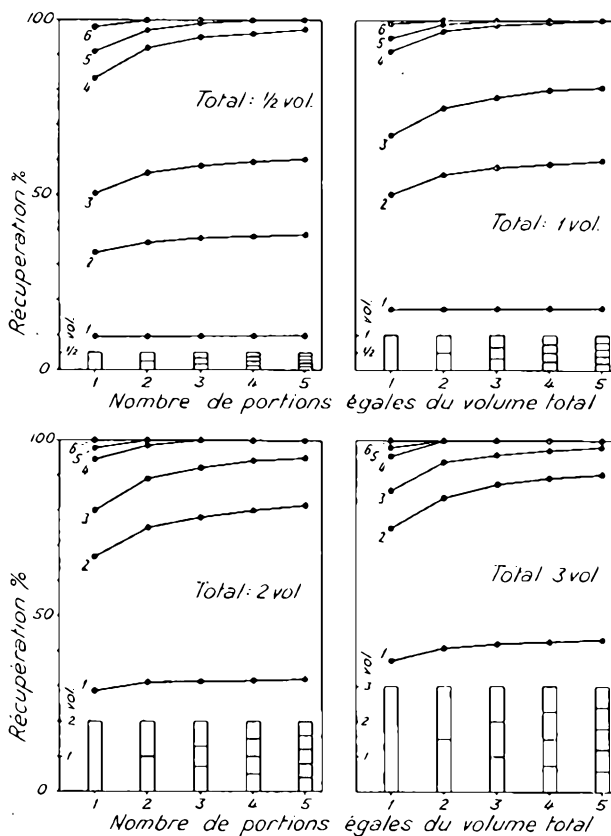


Fig. 2. - Effet de la sousdivision d'une quantité fixe du solvant en plusieurs portions sur l'efficacité de l'extraction par partage entre deux phases liquides

Courbes: Récupération de substances avec le même coefficient de partage (K)

Colonnes: Quantité totale de solvant par rapport à la solution à extraire

Courbe n°	1	2	3	4	5	6
Valeur de K:	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01

Ce sont des équations du *n*<sup>ème</sup> degré en  $\frac{v}{K}$ . On peut obtenir les valeurs numériques de  $\frac{v}{K}$  par approximation itérative ; en les insérant dans l'expression pour  $\Delta P_n$ , on obtient les maxima des récupérations additionnelles réalisables (tableau 5). Il est intéressant de noter que même en augmentant indéfiniment le nombre de portions (*n* → ∞), la récupération additionnelle maximum tend rapidement vers une limite déterminée par la condition

$$\frac{v}{K} - 2 \ln \left(1 + \frac{v}{K}\right) = 0$$

Contrairement au tableau 4, les valeurs optimales de  $\frac{v}{K}$

se situent dans une région intermédiaire, plutôt favorable, permettant déjà une récupération de 75 % avec une seule extraction.

Il va de soi que toutes ces considérations théoriques se basent sur quelques suppositions qui en pratique ne sont pas remplies rigoureusement (non miscibilité des phases, indépendance entre coefficient de partage et concentration, etc.) ; mais l'approximation est suffisam-

Tableau 5. — Récupération additionnelle réalisable au maximum par sousdivision d'un volume fixe de solvant d'extraction en plusieurs portions égales, au lieu d'une seule extraction avec le même volume

Nombre de portions <i>n</i>	Récupération additionnelle maximum ( $P_n$ ) <sub>max</sub> % *	$\left(\frac{v}{K}\right)_{max}$	Volume total de solvant $v^{**}$				Récupération par une extraction <sup>***</sup> % *
			$\frac{1}{2}$	1	2	3	
			Coefficient de partage, <i>K</i>				
2	9	3,236	0,15	0,31	0,62	0,93	76
3	12	3,000	0,17	0,33	0,67	1,00	75
4	14	2,880	0,17	0,35	0,69	1,04	74
5	15	2,808	0,18	0,36	0,71	1,07	74
∞	20	2,513	0,20	0,40	0,80	1,19	72

\* pour cent de la quantité totale présente dans la solution à extraire

\*\*  $v = \frac{\text{cm}^3 \text{ de solvant d'extraction}}{\text{cm}^3 \text{ de solution à extraire}}$

\*\*\* Dans les mêmes conditions (même valeur du quotient  $\frac{v}{K}$ ) qui permettent d'obtenir le maximum de récupération additionnelle par sousdivision en plusieurs portions égales

ment proche de la réalité pour se demander quelles sont les conclusions pratiques se dégageant de cette analyse.

Dans des conditions très favorables ( $K \cdot p < 0,05$ ) où l'on récupère 95 % ou plus par la première extraction, toutes les subtilités discutées n'auront aucune importance pratique. Une ou deux extractions suffiront à réaliser une récupération pratiquement complète; on extraira, par exemple, avec deux fois  $\frac{1}{5}$  volume les substances dont  $K < 0,01$ .

Le choix judicieux du solvant permettra souvent d'éviter les conditions nettement défavorables. Mais si elles sont inévitables, il faut abandonner l'ampoule à décantier et avoir recours à un dispositif à extraction continue, puisque même après dix extractions avec chaque fois un volume, il restera encore 16 % non extraits si le coefficient de partage est de 5,00, en faveur de la solution à extraire.

Dans les conditions intermédiaires, disons pour les valeurs de  $K$  entre 0,1 et 1,0, nous recommandons de fixer d'abord la quantité totale ( $v$ ) de solvant que l'on veut employer. Elle sera la plus grande encore manipulable sans difficulté et ne s'opposant pas à d'autres considérations d'ordre technique, et elle dépassera rarement un ou deux volumes. Pour l'extraction, elle sera divisée en trois portions égales.

Les coefficients de partage des corticostéroïdes urinaires (dans les systèmes eau/solvant employés pour l'extraction et le fractionnement) n'ont pas été publiés dans la littérature. Cependant, il existe des indications qui nous permettent de supposer que l'on se trouve en présence, pour la plupart des corticostéroïdes, de valeurs intermédiaires, en partie même favorables, si une phase aqueuse est extraite par l'acétate éthylique ou par un solvant chloruré. D'après une remarque de SILBER et

PORTER<sup>24</sup>, on peut calculer que, pour le système eau/chloroforme (qui serait pratiquement identique au système urine/chloroforme), les coefficients de partage de la cortisone, du cortisol, de leurs acétates et dérivés tétrahydrogénés se situent entre 0,02 et 0,3, mais il est probable que la valeur la plus favorable correspond à un acétate et ne peut être prise en considération ici. Selon un calcul basé sur une remarque de BAGGETT<sup>45</sup>, la tétrahydro-cortisone aurait un coefficient de partage de 0,7 dans le système urine/chloroforme. Quelques valeurs plus exactes, déterminées par L. L. ENGEL et par H. CARSTENSEN (communications personnelles) au moyen de distributions à contre-courant, sont données dans le tableau 6.

Tableau 6. — Coefficients de partage de quelques corticostéroïdes

Phase aqueuse	H <sub>2</sub> O	Tampon pH 5,1	H <sub>2</sub> O	Tampon pH 5,1	NaHCO <sub>3</sub> 8 %	Tampon pH 5,1	H <sub>2</sub> O
Solvant	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>
Cortisone	0,06*		0,07*				0*
Corticostérone							0,10**
17-Hydroxycortisone							0,11**
Cortisone							1,09**
Cortisol	0,11* 0,19*		0,13* 0,12*	0*		0,59*	2,86* 3,12**
5 $\alpha$ -Prégnane-3 $\beta$ , 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -20, 21-pentol			5,4* 4,6*	1,5*			

\* Communiqué par L. L. ENGEL, Huntington Laboratories, Massachusetts General Hospital, Boston

\*\* Déterminé à 22° et communiqué par H. CARSTENSEN, Institut de Physiologie de l'Université d'Upsal

Des solvants comme le benzène ou l'éther semblent se prêter moins bien à l'extraction des stéroïdes relativement polaires que sont les corticostéroïdes urinaires. HEARD et coll.<sup>15, 16, 40</sup> ont recommandé le mélange chloroforme-éther 1 : 4 ou 1 : 5 qui est un moyen d'extraction très efficace, tout en conservant l'avantage d'une couche organique plus légère que l'eau.

Le *n*-butanol est le solvant classique pour l'extraction des stéroïdes conjugués de l'urine<sup>47, 48</sup>. Son pouvoir d'extraction varie selon le pH de l'urine et il est peu volatil (p. d'é. 118°). Le mélange éther-éthanol 3:1 récemment introduit par EDWARDS et coll.<sup>40</sup> semble posséder plusieurs avantages et sera probablement appelé à remplacer le *n*-butanol.

La loi de partage n'est pas le seul point à considérer dans l'extraction des corticostéroïdes urinaires.

<sup>45</sup> B. BAGGETT, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 297.

<sup>46</sup> R. D. H. HEARD, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 441.

<sup>47</sup> S. L. COHEN et G. F. MARRIAN, *Biochem. J.* 30 (1936) 57.

<sup>48</sup> E. H. VENNING et J. S. L. BROWNE, *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.) 34 (1936) 792.

<sup>40</sup> R. W. H. EDWARDS, A. E. KELLIE et A. P. WADE, *Mem. Soc. Endocr.* (London) 2 (1953) 53.



Si l'on veut, à tout prix, éviter les émulsions et les centrifugations emuycuses qu'elles nécessitent, on sera parfois tenté d'extraire en agitant doucement, sans mouvements brusques. Cette manière de faire pourra invalider toutes nos conclusions précédentes parce qu'elle risque d'abolir la condition essentielle du raisonnement en empêchant que l'équilibre entre les deux phases soit établi à chaque extraction. Nous croyons que c'est une erreur de vouloir éviter les émulsions de cette façon. Il est préférable de se servir d'un dispositif d'extraction mécanique qui permet l'établissement rapide de l'état d'équilibre sans formation d'émulsion, comme p.ex. l'extracteur de COHEN<sup>50</sup> ou le tapis roulant de JAYLE et CRÉPY<sup>51</sup>.

Si l'emploi d'une grande quantité de solvant assure une extraction complète et aide à éviter les émulsions, il prolonge aussi la durée de la distillation qui doit suivre pour obtenir l'extrait concentré. On a discuté (p.ex.<sup>52</sup>) la possibilité de pertes appréciables que pourrait entraîner une distillation prolongée, même sous vide partiel dans un bain-marie de 40 ou 50°. Il est évident que cela limiterait le volume utile de solvant pour les extraits préparés en vue d'un dosage quantitatif.

L'extrait brut contient encore plus de substances indésirables, empêchant une réaction colorimétrique valable. Après des lavages alcalins et aqueux, suivis de l'évaporation du solvant, on obtient ce que l'on appelle couramment l'extrait des stéroïdes neutres bien que son poids dépasse, bien entendu, encore de beaucoup sa teneur en stéroïdes. Pour la majorité des analyses courantes au laboratoire clinique, la purification se termine à ce stade. Le résultat obtenu au moyen du dosage colorimétrique donnera une valeur globale.

Mais la purification et le fractionnement de l'extrait peuvent être poussés beaucoup plus loin, voir même jusqu'à la séparation en stéroïdes individuels, à l'aide d'un ou de plusieurs des procédés suivants :

- (a) partage entre benzène et eau<sup>14, 28, 53, 54</sup>;
- (b) séparation en substances cétoniques et non cétoniques moyennant la transformation en hydrazones hydrosolubles avec le réactif T de GIRARD (SPRECHLER<sup>55</sup>);
- (c) séparation en substances hydroxyliques et non hydroxyliques au moyen des héli-esters hydrosolubles formés avec l'acide succinique<sup>56</sup>;
- (d) séparation en 3 $\alpha$ - et 3 $\beta$ -hydroxy-stéroïdes par précipitation de ces derniers à l'aide de la digitonine<sup>57</sup>;
- (e) chromatographie sur silicagel<sup>58</sup>;
- (f) chromatographie sur papier dans un système à imprégnation (p.ex.<sup>20</sup>);

(g) chromatographie sur papier dans un système équilibré en phase vapeur (p.ex.<sup>60</sup>).

Grâce à des combinaisons judicieuses de ces techniques, nos connaissances sur le taux normal ou pathologique des corticostéroïdes urinaires individuels sont en plein développement.

Une méthode remarquable, publiée par ROMANOFF et coll.<sup>58</sup>, combine les techniques (a), (e) et toute une série de chromatogrammes selon (f) pour déterminer, dans un extrait correspondant à l'excrétion de 48 heures, 35 substances pour la plupart non encore identifiées, mais apparaissant avec une régularité étonnante dans les urines d'hommes et femmes de tous les âges; selon leurs propriétés connues jusqu'à présent, il s'agit probablement à quelques exceptions près de stéroïdes. — La méthode, moins complexe, décrite par DE COURCY et coll.<sup>51</sup> utilise les techniques (a) et (g) et permet de déceler, dans un extrait correspondant à  $\frac{1}{10}$  ou  $\frac{1}{4}$  de l'excrétion de 24 heures, environ 14 stéroïdes soit  $\alpha$ -cétoniques (donc réducteurs), soit  $\Delta^4$ -3-cétoniques (donc montrant une fluorescence jaune après traitement avec NaOH<sup>59</sup>), dans des quantités allant de 5 à 4000  $\mu$ g/24 h. — Grâce aux méthodes de NEHER et WETTSTEIN<sup>60</sup> et DE COURCY et GRAY<sup>53</sup>, nous avons pu réaliser le dosage semiquantitatif de l'aldostérone dans un extrait correspondant à l'excrétion de 24 heures<sup>61</sup>, en appliquant les techniques (a), (e), (f) et (g).

Nous nous bornons à citer ces trois exemples qui mettent en relief toute l'importance qu'a prise aujourd'hui la chromatographie sur papier dans l'analyse des stéroïdes urinaires comme dans beaucoup d'autres domaines. Si la chimie organique classique, pour identifier une substance inconnue avec un stéroïde donné au moyen des points de fusion simples et mixte et des rotations optiques, avait besoin de quelques milligrammes de cristaux, le centième, parfois même le millième de cette quantité sera suffisant, sous forme d'une tache sur papier, pour l'identification chromatographique. Celle-ci se fera au moyen des valeurs  $R_F$  (ou d'autres mesures du déplacement chromatographique) dans plusieurs systèmes de solvants, à l'aide d'une série de réactions colorées spécifiques et de la spectrophotométrie dans l'ultraviolet, le visible ou l'infrarouge. Pour les détails techniques, nous renvoyons aux publications de DENT<sup>62</sup>, BLOCK et coll.<sup>63</sup>, CRAMER<sup>64</sup>.

Il est cependant nécessaire de formuler ici une restriction importante : la chromatographie sur papier est

<sup>50</sup> S. L. COHEN, *J. Lab. Clin. Med.* 36 (1950) 769.

<sup>51</sup> M. F. JAYLE et O. CRÉPY, *Bull. Soc. Chim. Biol.* (Paris) 34 (1952) 435.

<sup>52</sup> A. M. ROBINSON, H. L. MASON et G. F. MARRIAN, *Recent Progr. Hormone Res.* 9 (1954) 279, 281.

<sup>53</sup> C. DE COURCY et C. H. GRAY, *J. Endocr.* 9 (1953) 391.

<sup>54</sup> C. DE COURCY, I. E. BUSH, C. H. GRAY et J. B. LUNNON, *J. Endocr.* 9 (1953) 401.

<sup>55</sup> M. SPRECHLER, *Acta Endocr.* (Copenhague) 4 (1950) 205.

<sup>56</sup> G. PINCUS et W. H. PEARLMAN, *Endocrinology* 29 (1941) 413.

<sup>57</sup> R. M. HASLAM et W. KLYNE, *Lancet* 1 (1952) 285.

<sup>58</sup> L. P. ROMANOFF, R. S. WOLF, M. CONSTANCE et G. PINCUS, *J. Clin. Endocr.* 13 (1953) 928.

<sup>59</sup> I. E. BUSH, *Biochem. J.* 50 (1952) 370.

<sup>60</sup> R. NEHER et A. WETTSTEIN, *Acta Endocr.* (Copenhague) 18 (1955) 386.

<sup>61</sup> M. L. HELMREICH, A. RIONDEL et R. BORTH, Communication présentée à la réunion de la Société suisse d'Endocrinologie du 26 février 1955 à Bâle, *Schweiz. med. Wschr.* 85 (1955) 660.

<sup>62</sup> C. E. DENT (Edit.), *Chromatography*, in *Brit. Med. Bull.* 10 (1954) 161-252 (numéro spécial).

<sup>63</sup> R. J. BLOCK, E. L. DURRUM et G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York 1955.

<sup>64</sup> F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1954.

avant tout une technique de séparation (comme l'ampoule à décanter), basée (comme celle-ci) sur les différences des coefficients de partage qui se reflètent dans les valeurs  $R_f$ . Elle facilite l'identification, mais à elle seule ne suffit pas. En effet, il est utile de se rappeler que, même après une purification poussée, un extrait dit stéroïdique contient encore d'autres substances et que parmi celles-ci il peut y en avoir qui ressemblent par plusieurs points à l'un ou l'autre stéroïde. La caféine,

par exemple, est éliminée dans les urines et reste avec la corticostérone jusqu'au dernier chromatogramme<sup>65</sup>. ZANDER et SIMMER<sup>65</sup> ont vu une impureté inconnue provenant des solvants, qui se déplaçait sur le chromatogramme comme la progestérone. Seul l'emploi des moyens d'identification les plus divers pourra nous mettre à l'abri d'erreurs pénibles.

<sup>65</sup> J. ZANDER et H. SIMMER, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 529.

(A suivre)