

COMMUNICATIONS

Identification et dosage des constituants hormonaux des implants par chromatographie en phase gazeuse

1^{re} Note

G. CUMONT (*), L. RICHOU-BAC (*), J. PANTALÉON (*)

L'usage zootechnique des hormones était jusqu'à ces derniers temps très répandu. Le but recherché en utilisant les effets physiologiques produits par ces substances était de réaliser une mise en sommeil de l'évolution des gonades et de favoriser l'accroissement et l'engraissement du bétail : on a montré que l'utilisation alimentaire était nettement améliorée et pouvait se traduire par des gains de 10 p. 100, et que l'effet sur l'état sanitaire était en général positif.

Le développement excessif de cette pratique, appliquée parfois abusivement, a entraîné une réaction des hygiénistes en particulier à la suite de la suspicion de troubles ou d'incidents apparus chez les consommateurs et aussi dans le souci d'éviter tous risques d'effets cancérogènes à long terme. Cette crainte est méritée pour toutes les substances hormonales de nature artificielle.

Notre pays a promulgué une législation interdisant l'emploi des œstrogènes en élevage. Le décret le plus récent du 30 juillet 1971 met l'accent sur une notion nouvelle de « résidus » de ces substances pouvant exister dans les denrées alimentaires à destination humaine et animale, présentant un danger pour la santé

(*) Laboratoire central de Recherches vétérinaires, 22, rue Pierre-Curie, 94 - Maisons-Alfort.

humaine ; il proscriit l'utilisation des denrées pouvant contenir ces dites substances et entraîner ces résidus.

Malgré cette réglementation, dont l'origine remonte à la loi du 1^{er} août 1905 et au décret d'application du 13 août 1965, il n'est pas rare qu'à l'abattoir, le boucher, au moment de l'habillage des animaux de boucherie, ou le vétérinaire inspecteur, au moment de l'inspection, ne trouve sur certaines parties de la carcasse, soit des traces suspectes d'injection de produits, soit des résidus d'implants dans le tissu conjonctif ou musculaire, principalement au niveau de la base de l'oreille, du collier ou du gros bout de poitrine.

I. — MODE D'ADMINISTRATION DES HORMONES

Les hormones naturelles sont rapidement résorbées par voie digestive ou par voie intramusculaire.

— Absorbées par voie digestive, elles sont transformées par le foie en métabolites moins actifs ou inactifs avant d'avoir pu agir sur le métabolisme de l'animal traité.

-- Utilisées par voie intramusculaire, elles peuvent agir mais la durée d'action est limitée et dépend de la durée de résorption du produit inclus dans le muscle.

Pour obtenir un effet prolongé de l'action des hormones on réalise, soit :

— des injections intramusculaires de ces substances sous la forme d'esters : acétate, propionate, benzoate, en général en solution huileuse résorbés plus lentement que les bases ;

— des injections intramusculaires de suspensions aqueuses de microcristaux de produits actifs ;

— des implantations sous-cutanées de pellets dans lesquels le produit actif est combiné à un excipient naturel : le cholestérol en général ou bien contenu dans une capsule de polydiméthylsiloxane très perméable au passage du principe actif (1).

L'action de ces spécialités s'exerce sur plusieurs semaines.

L'administration peut aussi être réalisée *per os* au moyen des esters d'hormones naturelles ou à partir d'hormones artificielles ajoutés à l'alimentation du bétail : ces substances artificielles ont en général une structure très proche de celle des hormones naturelles mais comportent dans leur formule un groupement, un radical ou une fonction qui retarde leur dégradation dans le foie.

II. — NATURE DES HORMONES CONTENUES DANS LES IMPLANTS

Citons les plus couramment rencontrées :

Hormones naturelles : Progestérone pour le veau mâle, Testostérone pour le veau femelle, Œstradiol et Testostérone, Œstradiol et Progestérone, Œstradiol sous la forme d'esters variés.

Hormones artificielles : Diéthylstilbœstrol, Hexœstrol, Diénoestrol (tels que, ou sous la forme d'esters variés).

A côté de ces produits possédant une activité hormonale œstrogène, gestagène ou androgène évidente, existent des composés à action anabolisante de formule très proche des hormones androgènes ou gestagènes mais sans action œstrogène ; ce sont :

Acétate de Trenbolone (Finaplix Finaject), Zéranol (Ralgro-Ralabol), Trienolone (ou méthyl-trenbolone synthétisé par Velluz en 1966).

III. — MISE EN ÉVIDENCE ET MÉTHODE DE DOSAGE DES HORMONES

Des méthodes maintenant classiques permettent de mettre en évidence les composés hormonaux variés : androgènes, gestagènes, œstrogènes.

Les plus anciennes et les plus répandues sont encore les méthodes biologiques qui s'appuient sur des tests physiologiques :

— pour les œstrogènes : le test d'Allen et Doisy de modification de la structure de l'épithélium vaginal et le test d'Atwood de l'accroissement pondéral de l'utérus du rongeur impubère ;

— pour les androgènes : test de la Crête du chapon, test de l'accroissement du système prostatovésiculaire du rongeur castré.

La chimie analytique apporte ses techniques avec des réactions colorées et des dosages en colorimétrie, en fluorimétrie ou en lumière ultra-violette.

Mais ces techniques ne permettent pas, en général, lorsqu'il y a un mélange d'hormones, d'identifier les divers constituants et de différencier les hormones naturelles des hormones artificielles, à moins de pratiquer des méthodes de séparation et d'isolement souvent délicates. Ceci peut être maintenant résolu soit par résonance magnétique nucléaire (2) ou par chromatographie en phase gazeuse.

IV. — IDENTIFICATION ET DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE
EN PHASE GAZEUSE

4-1. *Présentation des hormones pour leur analyse par chromatographie en phase gazeuse :*

Suivant la présentation des prélèvements qui nous sont adressés :

— Les pellets recueillis sont débarrassés des lambeaux de viande, écrasés dans un tube à essai au contact de solvants appropriés : acétone, méthanol, chloroforme. La solution obtenue est filtrée sur laine de verre et concentrée sous azote.

— La zone infiltrée suspecte est finement hachée, broyée et mise en contact de solvants. Après macération au réfrigérateur durant 2 à 3 heures, la solution est filtrée sur laine de verre, puis concentrée sous azote.

Le résidu obtenu dans l'un ou l'autre cas a un aspect poudreux ou visqueux. Une partie du résidu est reprise en solution alcoolique ou acétonique afin de réaliser une solution de concentration définie, proche de 1 p. 1.000, le reste est pesé et sert à préparer des composés dérivés.

L'analyse des hormones peut se faire de deux façons :

- soit avec leur structure naturelle ;
- soit avec une structure dérivée.

L'analyse sans modification de la structure naturelle, est réalisable immédiatement, mais certaines substances donnent sous cette forme une réponse faible de la part du détecteur.

L'analyse par la structure dérivée permet d'améliorer par un facteur parfois supérieur à 10 la réponse du détecteur et de modifier la polarité.

Les dérivés pour le détecteur à ionisation de flamme se font :

- soit par acétylation : on ajoute des groupements acétyles, ces dérivés sont très stables ;
- soit par silanisation : on ajoute des groupements triméthylsilyles ou TMSi. Ces dérivés sont fragiles, facilement hydrolysables au contact de l'humidité.

Nous réalisons couramment des dérivés TMSi, en ajoutant au résidu pesé une quantité déterminée d'Hexaméthyl-disilazane donneur de radicaux $(\text{CH}_3)_3 \equiv \text{Si}$, en présence d'un catalyseur,

le Triméthylchlorosilane dans de la Pyridine. Le mélange laissé à réagir quelques minutes à 60° dans un tube à vis étanche peut être utilisé rapidement. Actuellement, il existe des mélanges type TRI-SIL-BSA qui permettent une manipulation plus rapide.

Ces dérivés sont réalisables sur les fonctions alcools, phénols, énols, donc particulièrement sur les œstrogènes naturels ou artificiels, certains androgènes et les anabolisants.

D'autres dérivés pourraient être réalisés sur les fonctions cétones de manière identique.

Le problème est différent pour le détecteur à capture d'électrons. Il s'agit, en effet, d'obtenir des dérivés comportant des groupements électrophiles, généralement halogènes, doués d'une très grande sensibilité.

Les réactifs fluorés sont actuellement les plus employés parmi ces réactifs, essentiellement l'anhydride heptachlorobutyrique.

Les méthodes de dérivation les plus rapides et les plus sensibles sont celles qui ont été étudiées, d'une part par EXLEY et CHAMBERLAIN (4), d'autre part par DHENNIN et SCHOLLER (5).

La formation des dérivés s'effectue par estérification sur le groupement 4-énol-3-one (production de 3-énol-esters) ou sur les groupements hydroxyl en position 3 ou 17 — en milieu benzénique ou acétonique, dans un tube à vis étanche — sans catalyseur. Durée des réactions : 30 minutes (70 °C) en milieu benzénique — 1 heure (25 °C) en milieu acétonique.

4-2. Définition des paramètres d'analyse.

Pour le détecteur à ionisation de flamme, nous utilisons deux types de phases stationnaires :

- OV 17 qui est un méthyl-phényl-silicone polaire.
- SE 52 qui est un phényl-silicone peu polaire.

Ces phases sont imprégnées sur du chromosorb WAW silanisé.
Paramètres d'utilisation :

Le four est chauffé à 250°, l'injecteur et le détecteur à 270°, le débit d'azote est fixé à 20 ml/mn, les débits de l'hydrogène et de l'air respectivement à 20 ml et 300 ml/mn.

Pour le détecteur à capture d'électrons, nous recommandons les phases stationnaires suivantes :

- QF 1 ou OV 210 — 1 à 3 %.
- ou XE 60 ou OV 225 — 1 à 3 %.

Paramètres d'utilisation : injecteur 270°-four (colonnes) 240°-détecteur 300° (Ni 63). Débit d'azote : 40 à 50 ml/min.

4-3. Analyse qualitative.

La réalisation est très rapide pour des constituants habituellement rencontrés (20 minutes suffisent pour les identifier).

— L'injection du produit à analyser est réalisée ; en général, le volume injecté est de 1 μ l de solution d'implant à 1/1000. Les constituants sont élués et apparaissent sous la forme de pics sur le chromatogramme.

— Une 2^e injection est réalisée ensuite avec un mélange de 1 μ l de la solution d'implant et 1 μ l d'une solution de cholestane de concentration déterminée à 1 pour 10.000. Les constituants sont élués, ils donnent une série de pics auxquels s'ajoute celui du cholestane (fig. 1).

On peut alors définir le temps de rétention relatif : T_{RR} des différents constituants par rapport au cholestane en mesurant le temps d'élué de chaque pic et en faisant le rapport entre ces temps et celui du cholestane.

Le temps de rétention seul du produit serait insuffisant pour le caractériser, car bien que les conditions opératoires soient bien fixées, des variations faibles de température ou de débit peuvent survenir et modifier cet indice. Si ces variations surviennent à la fois sur le temps de rétention du produit et sur celui du cholestane, le rapport entre les 2 temps de rétention annule ces variations.

Le temps de rétention relatif peut être considéré comme une valeur reproductible. Il existe d'ailleurs des tables de T_{RR} calculés avec des paramètres opératoires bien définis. Nous avons établi une table de T_{RR} pour les produits hormonaux rencontrés en thérapeutique vétérinaire.

Remarque :

Le T_{RR} varie pour une même substance suivant la longueur de la chaîne latérale qui lui a été greffée pour modifier ses propriétés pharmacologiques et ses propriétés de résorption.

Exemple :

Le T_{RR} augmente du DES silylé (0,25), au DES (0,50) au DES diacétate (0,60), au DES dipropionate (1,15), sur OV 17.

4-4. Analyse quantitative.

La surface du pic du chromatogramme représente la quantité du constituant élué dans la colonne. Cette quantité peut être cal-

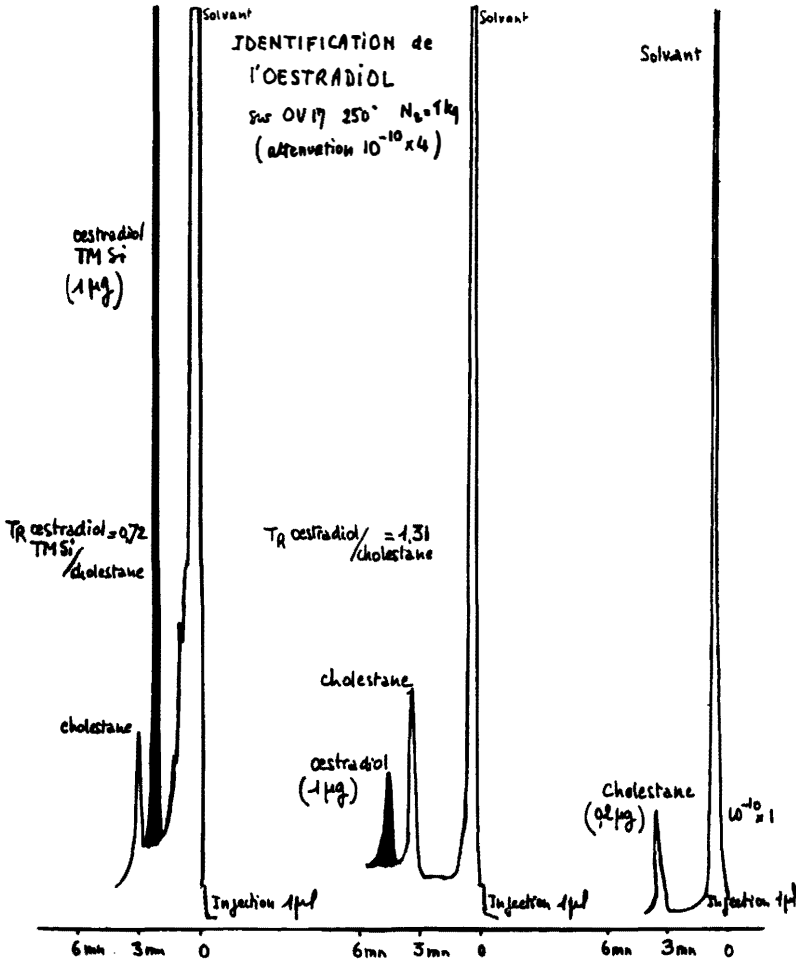


Fig 1

culée si on se réfère à un étalonnage, mais cette pratique n'est pas précise. Il convient mieux de se reporter à un élément de comparaison qu'on appelle étalon interne, qui a été utilisé au moment de l'injection du standard et de la substance à étudier. En général, pour les stéroïdes on utilise le cholestane. Dans les cas simples la hauteur du pic peut remplacer la surface. Les quantités décelables au détecteur à ionisation de flamme sont de l'ordre de 10 ng à 100 ng.

Mode opératoire :

1. A un certain volume de solution étalon (ex. : œstradiol), on ajoute un volume défini de solution de cholestane, de telle façon que pour une injection du mélange, les deux pics soient dans la même gamme de réponse du détecteur, donc dans la même gamme d'atténuation.

Ex. : A 1 ml de solution d'œstradiol 1 pour 1.000, on ajoute 1 ml de solution de cholestane 1 pour 10.000, et on injecte 2 µl. On obtient pour le pic du cholestane une hauteur H_c et pour celui de l'œstradiol une hauteur H_o.

2. A un certain volume de la solution à doser, on ajoute le même volume de solution de cholestane que précédemment.

Ex. : A 1 ml de solution à doser d'œstradiol, on ajoute 1 ml de solution de cholestane, on injecte 2 µl et on obtient H'_c pour le cholestane et H_{oX} pour l'œstradiol.

La concentration de l'œstradiol dans la solution à doser est

$$= \frac{H_{ox}}{H'_c} \times \frac{H_c}{H_o} \times \frac{1}{1000}$$

Les composés hormonaux suivants ont été étudiés au détecteur à capture d'électron :

1) *Sous forme de 3 enol esters* (mono ou disubstitué)

Progestérone	<i>Sensibilité</i>
Testostérone	jusqu'à 10 pg
Testostérone propionate	moyenne 100 pg

2) *Sous forme d'Hydroxyl esters* (mono- ou disubstitué)

Androstérone	
Oestradiol	
Oestradiol diacétate	
Oestradiol dipropionate	<i>Sensibilité plus faible :</i>
Oestrone	de l'ordre du ng
DES	
Hexestrol	
Dienestrol	

Il faut remarquer le niveau du seuil de sensibilité qui est très bas. Ces résultats postulent donc en faveur de l'emploi des détecteurs à capture d'électrons dans la recherche des résidus dans les viandes, notamment d'animaux traités.

4-5. Résultats.

La rigueur des résultats obtenus par l'analyse qualitative et quantitative par chromatographie en phase gazeuse est d'autant

plus grande qu'on a la possibilité de tester les solutions à analyser sur différents types de colonnes. C'est la raison pour laquelle nous utilisons deux types de colonnes de polarité différente.

La réalisation de l'analyse sur le produit naturel puis sur le produit dérivé TMSi apporte une garantie supplémentaire et permet de réduire les risques d'erreur sur l'identification de ces constituants. Nous possédons ainsi pour chaque hormone 4 indices qui sont en général de grandeur différente.

Voici quelques valeurs :

	à 250° TRR/OV 17	à 260° TRR/SE 52
Oestradiol	1,31	0,62
Oestradiol TMSi	0,74	0,68
Testostérone	1,32	0,64
Testostérone TMSi	1	0,71
Progestérone	1,97	1
Diéthylstilboestrol	0,50	0,25
Diéthylstilboestrol TMSi	0,25	0,29
Triénolone	pic informe	pic informe
Triénolone TMSi	1	1,06

Cette technique nous a permis jusqu'à maintenant d'identifier les constituants de 42 implants. La plus grande partie des implants sont du type œstradiol + progestérone + cholestérol ; acétate de trenbolone ; propionate de testostérone ; dipropionate de diéthylstilboestrol ; d'autres sels de DES sont en voie d'identification.

CONCLUSION

La chromatographie en phase gazeuse permet l'analyse qualitative et quantitative des hormones dans d'excellentes conditions :

- à partir des implants, le mode opératoire est très rapide ;
- à partir des produits biologiques le temps le plus long sera celui de l'extraction du principe actif.

L'utilisation d'un étalon interne permet l'identification rigoureuse des composés naturels ou des composés artificiels ainsi que de leurs dérivés et le calcul de leur concentration.

Les résultats obtenus montrent la grande maniabilité du détecteur à ionisation de flamme, et la grande sensibilité du détecteur à capture d'électrons.

Si les exigences de l'élevage imposent le recours à l'administration d'hormones, la méthode des implants mériterait d'être prise

en considération en raison de la facilité des contrôles qu'elle offre avec la détection possible de composés absolument indésirables du point de vue santé publique : diéthylstilbœstrol et la détection de composés moins critiquables : hormones stéroïdiques naturelles.

Nous nous efforçons d'appliquer cette technique à la détection des composés hormonaux dans les produits d'origine animale. Théoriquement ce problème est soluble, mais il pose des difficultés d'extraction et de concentration qui ne peuvent être abordées qu'avec des moyens de recherche amplifiés. Malgré les difficultés de prélèvement au moment de l'abattage, l'urine des animaux suspects de traitement hormonal pourrait sans doute représenter un milieu choisi pour faire cette recherche.

BIBLIOGRAPHIE

1. KINEL (F. A.), RUDEL (H. W.). — *Acta endocr.* 1971, supplémen. vol. 66 (1-30).
2. DELATOUR (P.) et LORGUE (G.). — *Revue Méd. Vét.* 1972, 123, 4 (495-503).
3. EIK-NES (K. B.), HORNING (E. C.). — *Gas. Phase Chromatography of steroids*, 1968 (Heidelberg Ed.) (80-85).
4. EXLEY (D.), CHAMBERLAIN (J.). — *Steroids* 1967, 10, p. 509.
5. DEHENNIN (L. A.), SCHOLLER (R.). — *Steroids* 1969, 13, p. 739.

Le Gérant : C. BRESSOU