

# DETERMINATION SIMULTANEE D'ANDROGENES PLASMATIQUES CHEZ LE RAT PAR FRAGMENTOGRAPHIE DE MASSE ET DILUTION ISOTOPIQUE

J. F. JEANNIN, P. BOURNOT, G. MAUME et B. F. MAUME\*

Groupe de Recherche: "Differenciation Biochimique et Cancerogénèse Experimentale de Cellules Eucaryotes en Culture", (P. PADIEU), ERA 267 du CNRS, FRA 9 de l'INSERM, Laboratoire de Biochimie des Interactions Cellulaires, Université de Dijon, B.P. 138, 21004 Dijon Cedex, France

(Received 11 July 1977)

## SUMMARY

Unconjugated and conjugated androgens were determined in rat plasma by a method combining mass fragmentography and isotopic dilution. Two internal standards were used: [4-<sup>14</sup>C]-testosterone added to plasma and 5 $\alpha$ -cholestane added to the reagent mixture for gas phase analysis. The testosterone concentration in plasma can be computed directly from the ratio between the peaks at *m/e* 389 ( $M^+$ ) and 391 ( $M + 2$ ), the number of d.p.m. added to the plasma sample and the volume of the plasma sample. This method is compared to previously established radioimmunoassay techniques. In plasma from 5-month-old male rats, this method showed the presence of testosterone:  $3.55 \pm 0.33$  ng/ml and androsterone:  $3.56 \pm 0.44$  ng/ml. In addition four conjugated isomers of androstane-3, 17 $\beta$ -diol were identified.

## INTRODUCTION

Les dosages de testostérone et d'androstérone plasmatiques peuvent être faits, de façon simple et rapide par radioimmunologie. D'autres méthodes ont été proposées: dosage enzymatique, dosages par capture d'électrons, par double dilution isotopique, par liaison compétitive avec les protéines. Néanmoins, la grande variabilité des résultats obtenus pour le dosage de la testostérone plasmatique du rat mâle adulte fait apparaître la nécessité d'une méthode de référence. La fragmentographie de masse (FM) qui est une méthode très spécifique, reproductible et sensible, répond à ce besoin. Le dosage des androgènes plasmatiques peut être rendu rigoureux par l'utilisation d'isotopes marqués au <sup>14</sup>C ou au <sup>3</sup>H comme étalons internes primaires. Une détermination simultanée d'androgènes plasmatiques par FM et dilution isotopique est proposée. Elle dérive d'une méthode mise au point dans ce laboratoire pour la mesure du rapport isotopique <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C de la [4-<sup>14</sup>C]-testostérone et de ses métabolites-<sup>14</sup>C par fragmentographie de masse, dans des cellules isolées de foie maintenues en cultures réplicatives [1]. Notre méthode diffère des autres déterminations de la testostérone par FM [2-6], par l'utilisation de dérivés méthoxime-triméthylsilylés (MO-TMS), dont les avantages majeurs sont la grande stabilité, la formation quantitative et la présence dans le spectre de masse d'ions  $M^+$  et  $M-31$  dont l'enregistrement alternatif à haute

fréquence, augmente la spécificité de la détection. Par ailleurs elle permet l'analyse dans la même expérience de plusieurs androgènes plasmatiques libres et conjugués du rat mâle adulte.

## MATERIEL ET METHODES

Le sang est prélevé sur des rats mâles de race Wistar (US Commodity Institut de la Recherche Agronomique, Dijon, France) âgés de 5 à 10 mois. Le schéma des différentes étapes de la méthode est donné par la fig. 1.

**Préparation de l'extrait.** La préparation de l'extrait est un aménagement d'un protocole précédemment décrit [7]. Les étalons internes primaires (introduits au départ avant l'extraction): [4-<sup>14</sup>C]-testostérone (59 Ci/mol; Radiochemical Center, Amersham, Angleterre) et sulfate de [7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-déhydroépiandrostérone (800 à 1000 Ci/mol; Radiochemical Center, Amersham, Angleterre) sont ajoutés à un volume connu de plasma (30 ml) à raison de 80.000 d.p.m. et 360.000 d.p.m. respectivement. Le plasma est soumis aux ultra-sons puis versé goutte à goutte dans du méthanol. La proportion finale méthanol-plasma est de 7:3, v/v. Le précipité obtenu est centrifugé à -15°C. Le méthanol est évaporé et les androgènes non conjugués sont extraits deux fois par un volume d'éther diéthylique. La phase étherée est lavée par 1:10, v/v d'eau distillée. Du sulfate d'ammonium est dissous dans la phase aqueuse 5:10, p/v et les androgènes conjugués sont extraits deux fois par un volume de mélange éther-éthanol (3:1, v/v). Cet

\* A qui la correspondance et les demandes de tirés à part doivent être adressées.

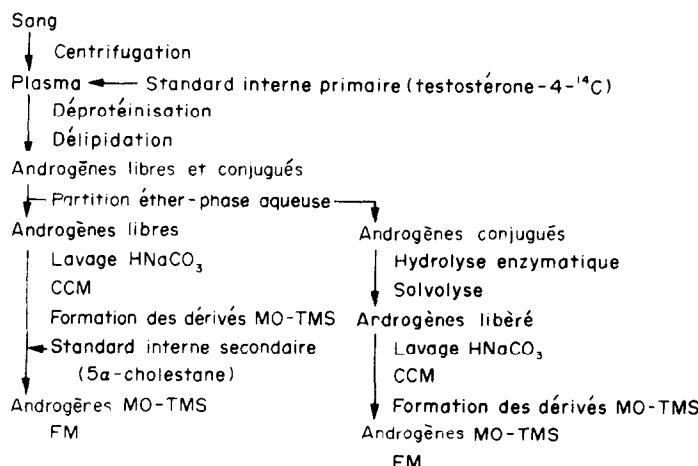


Fig. 1. Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse d'androgènes libres et conjugués dans le sang.

extrait est évaporé à sec et repris par du tampon acétate 0,5 M à pH 5. Du suc d'*Helix pomatia* (Industrie Biologique Française, Gennevilliers, France) est ajouté pour obtenir une concentration finale de 5.000 U/ml de sulfatasées et le mélange est laissé 48 h à 37°C. Les androgènes libérés sont extraits deux fois par un volume d'acétate d'éthyle. Les androgènes non hydrolysés sont extraits comme précédemment, évaporés à sec, repris par de l'acétate d'éthyle acidifié et laissés 16 h à 39°C. La solution est alors lavée par du bicarbonate de sodium 1 M puis par de l'eau distillée.

*Purification par chromatographie sur couche mince (CCM).* L'extrait contenant les androgènes non conjugués ou l'extrait contenant les androgènes libérés, est évaporé à sec et repris par 200 à 300 µl d'éthanol puis déposé sur une couche mince de gel de silice F 254 de 0,5 mm d'épaisseur (Merck, Darmstadt, Allemagne). Ce dépôt est encadré par deux dépôts d'androgènes de référence (Ikapharm, Ramat-Gan, Israel et Searle, Naucalpan, Mexico). Deux développements successifs sont effectués, le premier par de l'éther diisopropylique, le second par le mélange acétone-éther

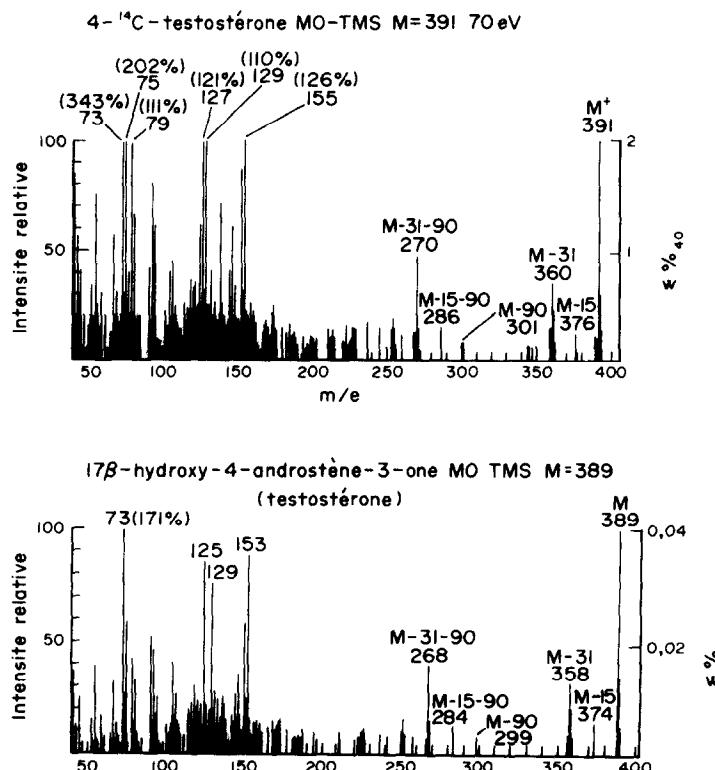


Fig. 2. Spectres de masse à 70 eV de la testostérone MO-TMS et de la [4-<sup>14</sup>C]-testostérone MO-TMS.

di-isopropylique (4:6, v/v). Les parties latérales de la plaque sont vaporisées par un mélange acide sulfure-méthanol (2:8, v/v), et révélées. Les androgènes d'origine plasmatique sont extraits des bandes de gel par du méthanol pendant douze heures à 40°C, puis une deuxième fois après exposition aux ultra-sons.

*Chromatographie gaz-liquide (CGL) et fragmentographie de masse.* L'extrait mis à sec est repris par 200 µl d'une solution de chlorhydrate d'O-méthoxyamine (Pierce Chemical Co, Rockford, U.S.A.) à 16 mg/ml dans de la pyridine anhydre et laissé 3 h à 65°C; la pyridine est évaporée et l'extrait est repris par 200 µl de bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide, (BSTFA), (Supelco, Bellefonte, U.S.A.) contenant 15 ng/µl de 5α-cholestane servant d'étalon interne secondaire (introduit après l'extraction avant l'analyse en phase gazeuse). La solution est laissée 12 h à 65°C. Les extraits sont analysés en fragmentographie de masse au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (LKB-9000, Bromma, Suède). La température de l'injecteur est de 260°C, celle du séparateur de 280°C, celle de la source ionique de 290°C. La tension d'accélération est de 3500 V et le courant recueilli par le collecteur d'électrons de 60 µA. Les fragmentogrammes sont enregistrés pour une énergie d'ionisation de 28 eV. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est de 30 ml/mn à 180°C. Le dosage des androstanolones et celui des androsténolones est effectué au moyen d'une colonne en verre silanisé de 3 m de longueur et de 3 mm de diamètre intérieur; le remplissage est effectué par du Gas Chrom P lavé aux acides silanisé et imprégné de phase stationnaire OV-1 à 1%; la température est programmée au taux de 1°C/min à partir de 200°C. On détecte les ions à *m/e* 391 et *m/e* 360 ( $M^+$ ) et  $M-31$ ) pour les androstanolones et la testostérone-4-<sup>14</sup>C, *m/e* 389 et *m/e* 358 ( $M^+$  et  $M-31$ ) pour les androsténolones et *m/e* 372 ( $M^+$ ) pour le 5α-cholestane. L'analyse des androstanediols est effectuée au moyen d'une colonne en verre silanisé de 4 m × 3 mm et remplie de phase stationnaire OV-210 à 3% sur Gas Chrom P silanisé, en programmant la température de 1°C/mm à partir de 190°C et en détectant les ions à *m/e* 436 et *m/e* 421 ( $M^+$  et  $M-15$  respectivement).

*Mesure de la radioactivité et évaluation des rendements.* Les composés radioactifs ont été comptés par compteur à scintillation liquide Tri-Carb (Modèle 2275, Packard Instrument Co, Downersgroves, U.S.A.). Trois comptages ont été faits sur trois aliquotes à différents stades de l'analyse. Le rendement global de l'analyse est déterminé après chromatographie sur couche mince, en faisant le rapport du nombre de d.p.m. récupéré dans l'extrait au nombre de d.p.m. ajouté, en <sup>14</sup>C pour la testostérone et en <sup>3</sup>H pour le sulfate de DHEA. Ce rendement est de l'ordre de 70%.

*Identification et dosage.* Les androgènes identifiés l'ont été au moyen des quatre données suivantes: le  $R_f$  de la fraction de couche mince contenant le

composé; l'indice de méthylène (IM) du composé en chromatographie gaz-liquide; la détection par fragmentographie de masse de deux ions caractéristiques: le rapport de l'intensité de ces réponses entre elles. La testostérone a été dosée par addition dans le plasma d'une quantité connue de [4-<sup>14</sup>C]-testostérone servant d'étalon interne primaire. Ces deux composés ayant le même  $R_f$  et le même indice de méthylène sont différenciés par la détection des ions  $M^+$  et  $M-31$  à *m/e* 389 et 358 pour la testostérone non marquée et des ions correspondant à *m/e* 391 et 360 pour la [<sup>14</sup>C]-testostérone (Fig. 2).

Nous avons établi une équation donnant directement la concentration de testostérone plasmatique à partir de l'abondance des ions à *m/e* 389 ( $M^+$ ) et 391 ( $M + 2$ ), du nombre de d.p.m. ajouté et du volume de l'échantillon. Le rapport des abondances des ions à *m/e* 391 et à *m/e* 389 pour la testostérone non marquée est de 9%. Donc une masse *p* de testostérone plasmatique donne des ions à *m/e* 389 et 391 dont les abondances relatives sont respectivement  $i_p$  et 0,09  $i_p$ . Nous avons mesuré en FM la pureté isotopique de la [4-<sup>14</sup>C]-testostérone dans l'échantillon utilisé comme étalon interne: elle est de 90%. Donc une masse *a* de [4-<sup>14</sup>C]-testostérone ajoutée au plasma donne des ions 391 et 389 dont les abondances relatives sont respectivement ( $i_a + 0,009 i_a$ ) et 0,1  $i_a$  où 0,009  $i_a$  est la contribution isotopique des 10% de testostérone non marquée de la solution de [4-<sup>14</sup>C]-testostérone ajoutée que nous négligerons dans le calcul. Dans un mélange de testostérone non marquée et de [4-<sup>14</sup>C]-testostérone les intensités mesurées sont:

$$\begin{aligned} i_{389} &= i_p + 0,1 i_a \\ i_{391} &= i_a + 0,09 i_p \end{aligned}$$

nous déduisons  $i_p$  et  $i_a$  de ce système d'équation. Or  $i_p$  et  $i_a$  sont proportionnelles à *p* et à *a* donc

$$p = a \frac{i_{389} - 0,1 i_{391}}{i_{391} - 0,09 i_{389}}$$

Nous déduisons *a*, masse de [4-<sup>14</sup>C]-testostérone ajouté, du nombre *y* de d.p.m. ajouté, de l'activité spécifique de la [4-<sup>14</sup>C]-testostérone et de la masse moléculaire de la testostérone.

$$a = 2,2 \cdot 10^{-12} y \text{ (en g)}$$

$$a = \frac{y}{131} \cdot 10^{-12} \text{ (en mole)}$$

L'échantillon de plasma mesurant *v* ml, la concentration de testostérone plasmatique est

$$c = 2,2 \frac{y}{v} \frac{i_{389} - 0,1 i_{391}}{i_{391} - 0,09 i_{389}} \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$$

$$c = 7,64 \frac{y}{v} \frac{i_{389} - 0,1 i_{391}}{i_{391} - 0,09 i_{389}} 10^{-12} \text{ M}$$

L'androstérone a été dosée en utilisant le 5α-cholestane, ajouté au réactif silylant, comme étalon interne

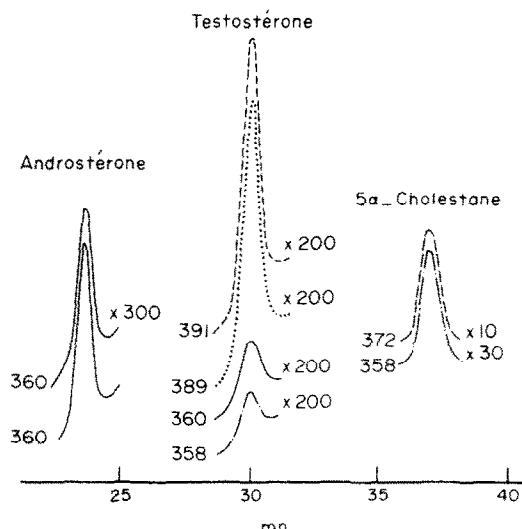


Fig. 3. Fragmentogramme montrant l'analyse quantitative simultanée de la testostérone et de l'androstérone libres du plasma de rat mâle adulte. L'analyse quantitative de la testostérone est faite par la détection des ions à  $m/e$  389 et 358 ( $M^+$  et  $M-31$ ) pour la testostérone,  $m/e$  391 et 360 ( $M^+$  et  $M-31$ ) pour la [ $4^{-14}\text{C}$ ]-testostérone introduite comme étalon interne primaire. Celle de l'androstérone est faite par détection de l'ion à  $m/e$  360 ( $M-31$ ). Le 5 $\alpha$ -cholestane utilisé comme étalon interne secondaire est détecté par l'ion à  $m/e$  372 ( $M^+$ ). Colonne de 3m, phase OV-1 1%, température programmée à 1°C/mn à partir de 200°C. Energie de bombardement des électrons 28 eV. L'échantillon correspond au lot no. 3 (Tableau 2) de 45 ml de plasma de rat mâle âgé de 3 mois. On ajoute au départ 77400 d.p.m. de [ $4^{-14}\text{C}$ ]-testostérone. Le rendement d'extraction est de 57%. L'injection correspond au 3/200 de l'extrait et la quantité de 5 $\alpha$ -cholestane par injection est de 45 ng.

secondaire. Le 5 $\alpha$ -cholestane est détecté par l'ion à  $m/e$  372 ( $M^+$ ) et l'androstérone par l'ion à  $m/e$  360 ( $M-31$ ). La masse d'androstérone injectée  $m_i$  est déduite de la masse de 5 $\alpha$ -cholestane injectée  $m_e$ , de l'abondance  $H_i$  de l'ion à  $m/e$  360, de l'abondance  $H_e$  de l'ion à  $m/e$  372 et du coefficient de réponse  $K_i$  de l'androstérone par rapport au 5 $\alpha$ -cholestane (0,64).

$$m_i = m_e K_i \frac{H_i}{H_e}.$$

Cette relation a été vérifiée pour  $m_i$  variant de 0,5 à 10 ng,  $m_e$  étant constant à 15 ng. La masse d'androstérone  $m_i$  dosée par injection doit être ramenée au volume de l'extrait et corrigée par le rendement de l'extraction ce qui donne la masse d'androstérone dans l'échantillon de départ.

## RESULTATS

### Mise en évidence d'androgènes plasmatiques conjugués et non conjugués

Dans la fraction des androgènes non conjugués nous avons identifié la testostérone et l'androstérone dans cinq lots différents de plasma, comme le montre la Fig. 3 qui représente le fragmentogramme de masse

d'un extrait, avec le 5 $\alpha$ -cholestane comme étalon interne secondaire et la [ $^{14}\text{C}$ ]-testostérone comme étalon interne primaire (ions à  $m/e$  391 et 360).

Le Tableau 1 résume les données qui ont permis cette identification:  $R_f$  en CCM, indices de méthylène, ions caractéristiques et rapport de leurs intensités.

Dans la fraction des androgènes conjugués nous avons identifié les quatre isomères de l'androstane-3, 17 $\beta$ -diol. Le tableau 1 indique les données permettant cette identification, en particulier la bonne séparation chromatographique obtenue avec une colonne OV-210. La Fig. 4 représente le fragmentogramme de masse d'un extrait d'androgènes conjugués plasmatiques. Il révèle la présence du 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol pic I, du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diol pic II, du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol pic III, du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol pic IV.

### Dosages de la testostérone et de l'androstérone non conjuguées

Nous avons dosé la testostérone non conjuguée sur cinq lots de plasma. Les résultats se situent entre  $3,14 \pm 0,56$  et  $5,23 \pm 0,61$  ng/ml et figurent au Tableau 2. Un dosage radioimmunologique sur un sixième lot, provenant de rat mâle âgé de cinq mois, a donné une concentration de 2,88 ng/ml.

L'androstérone a été dosée sur trois lots de plasma: les résultats se situent entre  $2,06 \pm 0,35$  et  $3,56 \pm 0,40$  ng/ml et figurent au Tableau 2.

### Reproductibilité des deux dosages

Pour la méthode utilisant la [ $4^{-14}\text{C}$ ]-testostérone comme étalon interne primaire, l'écart type pour la concentration de testostérone du lot 3, calculé sur six mesures, est de 0,32 ng/ml, soit 9% de la valeur moyenne.

Pour la méthode utilisant le 5 $\alpha$ -cholestane comme étalon interne secondaire, l'écart type pour la concentration d'androstérone du lot 3, calculé sur six mesures, est 0,42 ng/ml soit 14% de la valeur moyenne.

### Sensibilité des deux dosages

Le fragmentogramme de la Fig. 3 a été obtenu à partir de 3  $\mu\text{l}$  d'extrait dans lequel on a trouvé 2,5 ng de testostérone. Le pic fragmentographique donne un rapport signal sur bruit de fond de 48 pour l'ion à  $m/e$  389 et de 8 pour l'ion à  $m/e$  358. La limite de détection (10 fois le bruit de fond) est de 500 pg de testostérone par injection soit 3,5 ng par échantillon représentant 1 ml de plasma pour le lot no. 3. Dans ces conditions le volume maximum injecté est de 7,5  $\mu\text{l}$  de l'extrait repris dans le volume minimum de 50  $\mu\text{l}$ .

La Fig. 3 montre que sur le même fragmentogramme, on détecte 1,3 ng d'androstérone avec un rapport signal sur bruit de fond de 42 pour l'ion à  $m/e$  360 et de 2 pour l'ion à  $m/e$  391. La limite de

détection est de 750 pg par injection, soit 5 ng par échantillon représentant 1,4 ml de plasma.

#### DISCUSSION

La dilution isotopique de la testostérone plasmatique par la [ $4^{-14}\text{C}$ ]-testostérone non seulement confirme l'identification de la testostérone plasmatique par l'identité de leur  $R_F$  et de leur IM, mais de plus permet un dosage rigoureux. En effet, l'utilisation de cet étalon interne primaire donne directement la quantité de testostérone par comparaison, sur le même fragmentogramme, des réponses de l'étalon et de la testostérone plasmatique. Toutes les variations intervenant au niveau de la détermination du rendement d'extraction, au niveau de l'injection, de l'adsorption sur la colonne et de la détection sont ainsi éliminées. Le dosage au moyen d'un étalon interne secondaire nécessite le choix d'une substance n'interférant pas chromatographiquement avec les autres composés étudiés et donnant un ion caractéristique dont la masse est voisine de celle des ions du composé dosé. Cette méthode implique un étalonnage de l'appareil pour chaque stéroïde dosé et la détermination du rendement d'extraction. Sa reproductibilité est un peu moins bonne que celle de la méthode précédente, mais elle reste du même ordre de grandeur.

L'avantage majeur de la FM est sa haute spécificité. L'identification d'un stéroïde est établie grâce à un faisceau d'informations:  $R_F$ , IM, abondance relative de fragments caractéristiques [8]. Cette méthode permet d'identifier des épimères comme les isomères de l'androstane-3,  $17\beta$ -diol. Cette spécificité élimine toute interférence au cours du dosage, ce qui n'est pas le cas de la radioimmunologie puisque la  $5\alpha$ -DHT entre en compétition avec la testostérone pour tous les antisérum antitestostérone et donne 30 à 100% de réaction croisée [9-13]. La progestérone également donne de 20 à 60% de réaction croisée selon les antisérum [9-10], ainsi que l'androstenedione, 0 à 60% [9-10] et que les deux  $5\alpha$ -androstane-3,  $17\beta$ -diols, 0 à 17% [9-12]. Les androstane-3,  $17\beta$ -diols entrent en compétition avec l'androstérone pour les antisérum antiandrostérone et donnent 27% de réaction croisée [13].

Les étapes de purification nécessaires à la FM diminuent sa sensibilité par rapport à la radioimmunologie. Pour la testostérone et l'androstérone les limites de détection sont respectivement de 15 pg [10-14] et 25 pg [13] par échantillon en radioimmunologie contre 3,5 et 5 ng en FM.

La FM permet de rechercher un très grand nombre de composés dans un échantillon. Non seulement différentes injections permettent l'analyse de différents androgènes dans le même extrait, mais de plus en une seule injection plusieurs androgènes d'IM différents peuvent être identifiés et dosés. Ce type d'exploration est impossible en radioimmunologie où sur un seul échantillon seul un androgène peut être dosé.

Tableau I. Identification des androgènes plasmatiques par CCM et FM

	Molécules de référence						Composés plasmatiques					
	$R_F^*$	rapport d'intensité des ions†			$R_F$	rapport d'intensité des ions†			IM‡	rapport d'intensité des ions†		
		IM†	$M^{+} \ddagger$	391 360		389 358	436 421			IM†	$M^{+} \ddagger$	391 360
$3\alpha$ -Hydroxy- $5\alpha$ -androstane- $17$ -one (androstérone)	0,82	25,20‡	391	0,07		0,65 à 0,85	25,20	391	0,08			
$17\beta$ -Hydroxy-4-androstene-3-one (testostérone)	0,72	26,64‡	389	4,8		0,65 à 0,85	26,60	389	4,7	4,6		
$5\beta$ -Androstan- $3\beta$ , $17\beta$ -diol	0,78	25,10§	436		1,54	0,50 à 0,80	25,10	436				
$5\alpha$ -Androstan- $3\alpha$ , $17\beta$ -diol	0,75	26,22§	436		1,13	0,50 à 0,80	26,27	436				
$5\beta$ -Androstan- $3\alpha$ , $17\beta$ -diol	0,64	26,46§	436		0,42	0,50 à 0,80	26,51	436				
$5\alpha$ -Androstan- $3\beta$ , $17\beta$ -diol	0,72	27,63§	436	0,53	0,50 à 0,80	27,57	436					

\* CCM des stéroïdes non dérivés: deux migrations successives par l'éther di-isopropylique puis par le mélange acétone éther di-isopropylique (4:6, v/v). † Les dérivés sont MO-TMS ou TMS. ‡ Phase stationnaire OV-1. § Phase stationnaire OV-210. || Rapport  $\frac{M^{+}}{M_{-31}}$  pour la [ $4^{-14}\text{C}$ ]-testostérone.

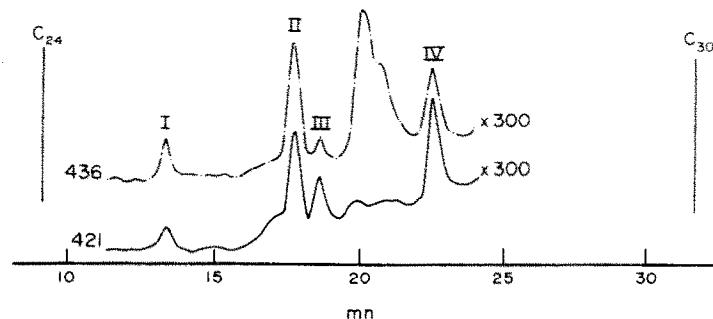


Fig. 4. Fragmentogramme montrant l'analyse simultanée des androstanediols de la fraction des stéroïdes conjugués du plasma de rat mâle adulte. Les ions à  $m/e$  436,  $m/e$  421 correspondent aux fragments  $M^+$  et  $M-15$ . Colonne de 4 m, phase OV-210 3%, température programmée à 1 °C/mm à partir de 190°C. Energie de bombardement des électrons de 28 eV. Pic I: 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol; pic II: 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol; pic III: 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol; pic IV: 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol.

en revanche il peut l'être sur un très grand nombre d'échantillons.

Il semble donc intéressant d'exploiter la spécificité et les possibilités d'analyse de la FM en utilisant cette dernière comme méthode de référence.

Les méthodes publiées proposent comme dérivés de la testostérone pour l'analyse en phase gazeuse, soit des diheptafluorobutyrates (diHFB) [4-5], soit des éthers de ditriméthylsilyle (diTMS) [3]. Ces dérivés donnent un ion moléculaire qui est le pic de base et qui se situe dans une zone de masse supérieure à 400: les interférences éventuelles avec le bruit de fond de la colonne ou le bruit de fond biologique sont donc diminuées. Les dérivés *t*-butyldiméthylsilylés (tBDMS) de la testostérone se fragmentent peu [6], l'ion M-57 qui est le pic de base, est très intense. Tous ces dérivés ont donc l'avantage d'améliorer la sensibilité de détection. En revanche les avantages majeurs des dérivés MO-TMS sont: 1°) leur grande stabilité, plusieurs mois, alors que les dérivés d'énols sont très instables, quelques heures d'après leurs utilisateurs eux-mêmes [3]; 2°) le rendement quantitatif de leur formation alors que celui de la formation des dérivés diTMS est inférieur à 50% [3]. 3°) leur spécificité élevée grâce à l'utilisation possible de deux ions à  $m/e$  389 ( $M^+$ ) et 358 ( $M-31$ ) en FM alors que les dérivés diHFB, diTMS ou tBDMS ne sont détectables en FM que par un ion.

La testostérone plasmatique non conjuguée est le seul androgène circulant du rat mâle qui ait été l'objet

de plusieurs analyses. Les concentrations que nous avons déterminées sont comparables aux résultats obtenus par capture d'électrons [15-16], par double dilution isotopique [17], par liaisons compétitives avec des protéines [10], ou par radioimmunologie [10, 11, 13, 18, 20, 22]. Néanmoins certains auteurs rapportent des concentrations supérieures à 7 ng/ml [21], ou inférieures à 2 ng/ml [10-18] mesurées par radioimmunologie. D'autre part les études de la variation du taux de testostérone au cours du développement du rat mâle aboutissent à des résultats contradictoires [15, 19, 21] qui peuvent être dûs au fait que différentes méthodes sont utilisées et/ou aux variations biologiques.

Les taux d'androstérone non conjuguée que nous rapportons, sont de six à huit fois supérieurs à ceux que Moger [13] a déterminés sur des rats mâles Sprague Dawley de trois mois. Une étude de la variation de la concentration de l'androstènone non conjuguée au cours du développement du rat mâle, et un dosage chez l'adulte donnent des résultats qui diffèrent [15-17]. En revanche six analyses de la 5 $\alpha$ -DHT plasmatique non conjuguée du rat mâle adulte concordent et révèlent des concentrations allant de 0,15-0,6 ng/ml [10, 11, 16, 19, 20, 22]. Dans l'état actuel de notre technique nous n'avons pas mis en évidence ces deux androgènes en raison de leur trop faible concentration (environ 10 fois plus faible que celle de la testostérone). Par contre l'utilisation de colonne capillaire en fragmentographie de masse,

Tableau 2. Taux plasmatiques de testostérone et d'androstérone libres déterminés chez des rats mâles adultes par FM

Lot	Age des rats donneurs en mois	Concentration de testostérone			Concentration d'androstérone		
		en nM ± écart maximum	en ng/ml ± écart maximum	en nM ± écart maximum	en ng/ml ± écart maximum		
1	5 à 10	11 ± 2 (3)*	3,14 ± 0,56			non dosé	
2	5 à 12	18 ± 2 (3)	5,23 ± 0,61			non dosé	
3	2 à 4	12 ± 1 (6)	3,55 ± 0,41	12,3 ± 1,4 (6)	3,56 ± 0,44		
4	5	11 ± 1 (5)	3,35 ± 0,22	11,9 ± 1,4 (4)	3,44 ± 0,49		
5	5	14 ± 1 (4)	4,16 ± 0,16	7,1 ± 1,1 (3)	2,06 ± 0,35		

\* Le nombre d'injections en CGL/SM figure entre parenthèses.

développée dans ce laboratoire permet de gagner un facteur supérieur à 10 en sensibilité [23]. Cette technique devrait donner accès à la mesure en FM des faibles taux d'androgènes non accessibles avec les techniques classiques utilisant les colonnes remplies.

Podesta et Rivarola ont rapporté la présence de  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol non conjugué dans le plasma du rat mâle sans être certains de son identification [20]. Moger identifie également cet androstanediol par radioimmunologie [13] et tout récemment Corpechot [22] dose par radioimmunologie le  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol (0,28 ng/ml) et le  $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol (0,22 ng/ml) non conjugués dans le plasma de rat mâle de 3 mois. Dans l'état actuel de notre technique, sans utilisation de colonne capillaire, nous n'avons pas trouvé d'androstanediol dans la fraction des androgènes non conjugués. En revanche c'est la première fois à notre connaissance que les quatre isomères de l'androstane- $3$ ,  $17\beta$ -diol sous forme conjuguée sont identifiés dans le sang du rat mâle.

**Remerciement**—Nous remercions Mme N. Pitoizet pour son excellente assistance technique et Mme D. Le Dissez pour la préparation du manuscrit.

Nous sommes redevables d'aides à la recherche, auprès du Centre National de la Recherche Scientifique (ERA 267), de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (ATP 76-1-356-AU et 24-75-47), du Secrétariat d'Etat aux Universités pour l'équipement en CGL-SM.

#### REFERENCES

- a. Maume G., Maume B. F. and Padieu P.: Isotopic ratio measurement of steroid metabolites in cell culture by mass fragmentography. *IXth International Symposium Advances in Chromatography*, Nov. 4-7 1974, Houston. b. Bournot P., Chessebeuf M., Maume G., Olsson A., Maume B. F. and Padieu P.: Application of mass fragmentography to the study of sex-linked metabolites of testosterone and corticosterone in liver organ and in liver cells in culture. In *Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine* (Edited by A. Frierio and N. Castagnoli Jr). Raven Press, New York (1974) p. 151, pp. 159-161.
- Aldercreutz H., Martin F., Whalroos O. and Soini E.: Mass spectrometric and mass fragmentographic determination of natural and synthetic steroids in biological fluids. *J. steroid Biochem.* **6** (1975) 247-259.
- Bjorkhem I., Lantto O. and Svensson L.: Serum testosterone determination by mass fragmentography. *Clin. Chim. Acta* **60** (1975) 59-66.
- Breuer H. and Sikemann L.: Mass fragmentography as reference method in clinical steroid assay. *J. steroid Biochem.* **6** (1975) 685-688.
- Dehennin L., Reiffsteck and Scholler R.: A quantitative method for the estimation of testosterone and progesterone in human plasma, using the gas chromatograph-mass spectrometer combination with single ion monitoring. *J. steroid Biochem.* **6** (1975) 81-86.
- Millington D. S.: Determination of hormonal steroid concentration in biological extracts by high resolution mass fragmentography. *J. steroid Biochem.* **6** (1975) 239-245.
- Prost M. and Maume B. F.: Hormones stéroïdes de la surrénaïde de rat: analyse des 18-hydroxy-cortico-stéroïdes par chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse et par fragmentographie de masse. *J. steroid Biochem.* **5** (1974) 133-144.
- Maume B. F., Bournot P., Lhuguenot J. C., Baron C., Barbier F., Maume G., Prost M. and Padieu P.: Mass fragmentographic analysis of steroids, catecholamines and amino acids in biological materials. *Analyt. Chem.* **45** (1973) 1073-1082.
- Bosch A. M. G., Den Hollander F. C. and Woods G. F.: Specificities of antisera against testosterone linked to albumin at different positions ( $C_3, C_{11}, C_{17}$ ). *Steroids* **23** (1974) 699-711.
- Frankel A. I., Mock E. J., Wright W. W. and Kammel F.: Characterization and physiological validation of radioimmunoassay for plasma testosterone in the male rat. *Steroids* **25** (1975) 73-98.
- Ghanadian B., Lewis J. G. and Chisholm G. D.: Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age in rat. *Steroids* **25** (1975) 753-762.
- Jones C. D. and Masson N. R.: The use of  $6\alpha$  and  $6\beta$ -carboxymethyltestosterone-bovine serum albumin conjugates in radioimmunoassay for testosterone. *Steroids* **25** (1975) 23-32.
- Moger W. H.: Serum  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol, androsterone, and testosterone concentrations in the male rat. Influence of age and gonadotropin stimulation. *Endocrinology* **100** (1977) 1027-1032.
- Louvet J. P., Smilovici W. and Bayard F.: Dosage radioimmunologique de testosterone plasmatique. *Ann. Biol. Clin.* **31** (1973) 305-311.
- Resko J. A., Feder H. H. and Goy R. W.: Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. *J. Endocr.* **40** (1968) 485-491.
- Robel P., Corpechot C. and Baulieu E. E.: Testosterone and androstanolone in rat plasma and tissues. *FEBS Lett.* **33** (1973) 218-220.
- Bardin C. W. and Peterson B. E.: Studies of androgen production by the rat: testosterone and androstenedione content of blood. *Endocrinology* **80** (1967) 38-44.
- Dohler K. D. and Wuttke W.: Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* **97** (1975) 898-907.
- Gupta D., Zarzycki J. and Rager K.: Plasma testosterone and dihydrotestosterone in male rats during sexual maturation and following orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism. *Steroids* **25** (1975) 33-42.
- Podesta E. J. and Rivarola M. A.: Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. *Endocrinology* **95** (1974) 455-461.
- Miyachi Y., Nieschlag E. and Lipsett M. B.: The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat. *Endocrinology* **92** (1973) 1-5.
- Corpechot C., Eychenne B. and Robel P.: Simultaneous radioimmunoassay of testosterone, dihydrotestosterone,  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol and  $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol in the plasma of adult male rats. *Steroids* **29** (1977) 503-516.
- Maume B. F. and Maume G. (unpublished data).