

CONTAMINATIONS EN CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE D'ESTERS D'ACIDES GRAS RADIOACTIFS SUR PHASE STATIONNAIRE POLYESTER

MARC PASCAUD

Laboratoire de Biochimie-Zoologie, École Normale Supérieure, Paris, et
Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Cancéreuse**,
Villejuif, Seine (France)*

(Reçu le 20 juillet 1962)

L'étude du métabolisme des lipides par marquage isotopique au ^{14}C nécessite la mesure de la radioactivité spécifique des acides gras ou de leurs dérivés. Diverses techniques ont été décrites concernant la mesure de la radioactivité des esters méthyliques d'acides gras fractionnés par chromatographie gaz-liquide. Des deux types de méthodes, d'une part mesure continue automatique de l'activité des vapeurs émergentes, cumulative¹ ou différentielle², d'autre part mesure discontinue de l'activité de fractions collectées individuellement³⁻⁵, seule cette dernière s'applique au cas d'acides gras très faiblement radioactifs.

Les esters méthyliques d'acides gras séparés sur phase polyester, même quand ils sont parfaitement séparés, sont légèrement contaminés par suite de la nature même du polyester⁶. Les phénomènes de transestérification qui se produisent au cours de l'analyse entre les esters d'acides gras et le polyester font que chaque ester est contaminé par une fraction des esters émergeant avant lui. Cette contamination est en général négligeable, mais, si le contaminant est un ester très radioactif, elle peut conduire à des erreurs d'interprétation concernant l'ester contaminé (par exemple, dans une expérience d'incorporation d'acétate ^{14}C dans les acides gras d'un animal, linoléate contaminé par du palmitate très marqué). Il est donc important, si l'on n'a pas effectué l'isolement et la purification des fractions par d'autres moyens analytiques, de connaître l'ordre de grandeur de ces contaminations.

Le présent travail décrit une méthode simple de collecte et de mesure de radioactivité ^{14}C d'esters méthyliques d'acides gras fractionnés par chromatographie gaz-liquide sur polyester, la détermination des contaminations d'une fraction par une autre fraction et le principe de leur correction.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Le fractionnement est effectué sur phase polyéthylène glycol adipate, préparé avec la quantité minimum du catalyseur acide *p*-toluène-sulfonique. Les colonnes (diamètre 4 mm, longueur 1.10 m, 1 g de polyester/3 g de support Chromosorb W 80-100 mesh) sont conditionnées pendant 3 jours à la température d'analyse, 180°, afin de

* 24 rue Lhomond, Paris.

** 16 bis avenue P. V. Couturier, Villejuif, Seine.

réduire l'émission continue de polyesters volatils. Le détecteur est la balance à densité de gaz de MARTIN. Les quantités totales d'esters d'acides gras fractionnés varient de 0.5 à 2.5 mg.

A l'émergence de la colonne, les vapeurs sont collectées par condensation sur cristaux d'antracène qualité scintillation selon la méthode de KARMEN *et al.*⁷ (Fig. 1).

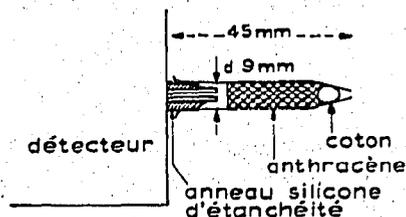


Fig. 1. Collecteur antracène.

Dans les conditions d'analyse, débit du gaz porteur azote de 40 ml/min, la collecte est presque totale (mieux que 90 %) pour le méthyl-palmitate et les esters à chaîne plus longue, avec des cristaux d'antracène purs, non enduits de graisse apiezon ou silicone. Les esters condensés sur la partie antérieure du tube sont entraînés par quelques gouttes de toluène qualité scintillation. On complète ensuite le remplissage du tube par l'antracène. L'intervalle de temps entre l'instant de détection des vapeurs et celui de leur émergence étant négligeable, le repérage sur le chromatogramme des fractions collectées est pratiquement concomitant de leur émergence.

Les mesures de radioactivité ^{14}C sont effectuées en scintillation solide dans le spectromètre Packard "Tricarb" modèle 314 EX. Le tube est logé dans le flacon en verre de 20 ml d'usage courant. Les conditions de mesure ont été déterminées pour donner à la fois un rendement acceptable pour le ^{14}C et un très bas bruit de fond, condition absolue de mesure convenable des très faibles radioactivités:

- tension aux bornes des phototubes 980 V,
- chenal spectral de mesure défini par la fenêtre 10-50,
- amplification A' 10 gain 100.

Dans ces conditions, le rendement de mesure ^{14}C est de 31 % et le bruit de fond d'environ 4.5 impulsions/min seulement.

EXAMEN DES CONTAMINATIONS

L'observation des contaminations est rendue possible par le marquage isotopique des contaminants. Nous avons examiné le bruit de fond de collecte et étudié la contamination par du méthyl-palmitate $1\text{-}^{14}\text{C}$, injecté seul ou ajouté à un mélange d'esters méthyliques d'acides gras non radioactifs.

(1) Bruit de fond de collecte

Après analyse d'esters et autres composés radioactifs, une colonne polyester émet continuellement des vapeurs radioactives constituant le bruit de fond de collecte. L'excès du bruit de fond de collecte (mesure directe) sur le blanc (dispositif collecteur et flacon de mesure) est proportionnel à la durée de la collecte. À titre indicatif, cette contamination, variable avec le passé de la colonne, est de l'ordre de 1 à 2 imp/min

pour une durée de collecte égale aux $2/10$ du temps d'émergence du méthyl-palmitate, de l'ordre de 30 min dans nos analyses.

(2) Traînées du pic contaminant

On peut suspecter comme causes de contamination les traînées, antérieure et postérieure, d'un pic, traînées invisibles sur la ligne de base. Pour apprécier ce facteur, nous avons injecté du méthyl-palmitate $1-^{14}\text{C}$ et mesuré l'activité ^{14}C présente dans les collectes effectuées à divers niveaux avant et après le pic. Nous schématisons dans la Fig. 2 les niveaux moyens et les intervalles de collecte et nous rapportons les

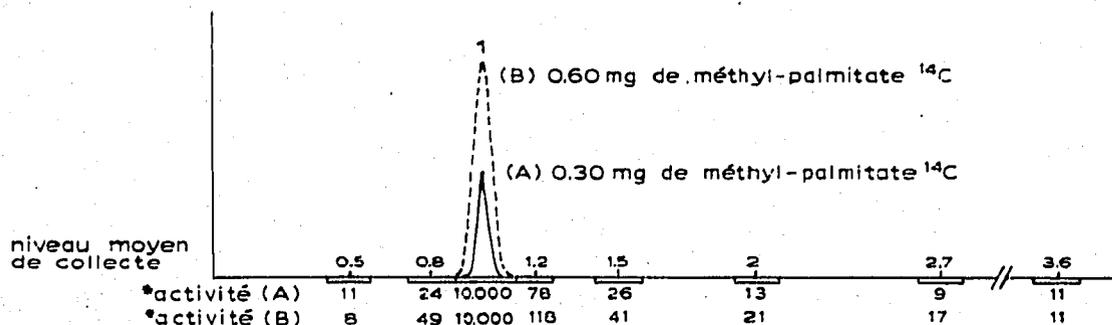


Fig. 2. Contamination des collectes après injection de méthyl-palmitate ^{14}C . Unité de temps: temps d'émergence du méthyl-palmitate. Durée de chaque collecte: 0.2.

* Activité = activité collectée—bruit de fond de collecte antérieur à l'injection.

activités de contamination observées à ces niveaux. L'unité de temps est le temps d'émergence du méthyl-palmitate et l'activité collectée dans le pic contaminant est ramenée à 10,000 imp/min. On effectue deux expériences pour, respectivement, 0.30 et 0.60 mg de méthyl-palmitate injecté.

Dans les conditions normales d'expérience, la contamination par traînées de pic est généralement négligeable, sauf évidemment pour les pics contigus au pic contaminant. Bien que les pics relatifs aux esters méthyliques d'acides gras, même dissymétriques, vérifient certaines des propriétés d'une distribution normale⁸, les activités observées dans les traînées du pic contaminant sont très supérieures aux activités escomptées d'après une distribution normale. La dissymétrie de la contamination, plus élevée après qu'avant le pic, est opposée à la dissymétrie du pic, de descente plus rapide que la montée. Des phénomènes de transestérification, rétention et émission ultérieure des esters d'acides gras, sont responsables d'une contamination dissymétrique de ce type. Les acides gras transestérifiés par échange avec l'acide adipique du polyester sont renouvelés par des acides gras ultérieurs transestérifiés à leur tour. Les polyesters volatils émis continuellement par la phase stationnaire participent aussi à ces transestérifications, conduisant ainsi au bruit de fond de collecte.

En plus des phénomènes de transestérification, on doit invoquer d'autres mécanismes de rétention, dans la phase stationnaire ou sur le support, suivis de réémission. D'après les observations de MEINERTZ ET DOLE⁹ concernant des analyses sur colonne apiezon et sur colonne polyester "rapide" — réduisant les risques de transestérification — il nous paraît que la contamination par transestérification est la plus à craindre. Enfin, outre ces divers processus, encore mal connus, la contamination

peut résulter de l'émission, très lente et non détectée sur le chromatogramme, de composés radioactifs provenant d'analyses antérieures.

(3) Contamination d'une analyse

Les phénomènes de transestérification étant continus tout au long de l'analyse, on s'attend à des transestérifications d'autant plus appréciables que les dimensions à la fois des pics contaminants et des pics contaminés sont plus importantes, les pics les plus contaminés étant les plus proches des pics contaminants. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons injecté trois fois successivement du méthyl-palmitate inactif à la suite de l'expérience désignée par B dans la Fig. 2. Dans la Fig. 3, sont

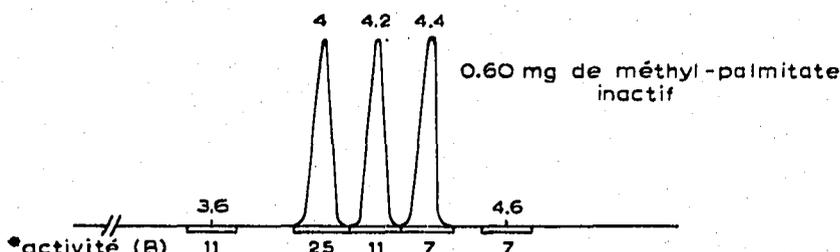


Fig. 3. Contamination des collectes. Suite de l'expérience (B) de la Fig. 2 (mêmes légendes).

données les valeurs des activités collectées. Le premier pic entraîne effectivement une fraction plus importante du contaminant palmitate et le bruit de fond de collecte reprend ensuite sa lente décroissance.

Pour apprécier l'ordre de grandeur des contaminations résultantes dans une analyse complète (acides gras de phosphoglycérides), nous avons ajouté du méthyl-palmitate ^{14}C à un ensemble d'esters inactifs, collecté diverses fractions au cours de l'analyse, et mesuré l'activité de ces fractions, pour deux dimensions d'analyse. Dans la Fig. 4 sont schématisées les conditions de l'expérience et les activités de contamination observées au niveau de différents esters.

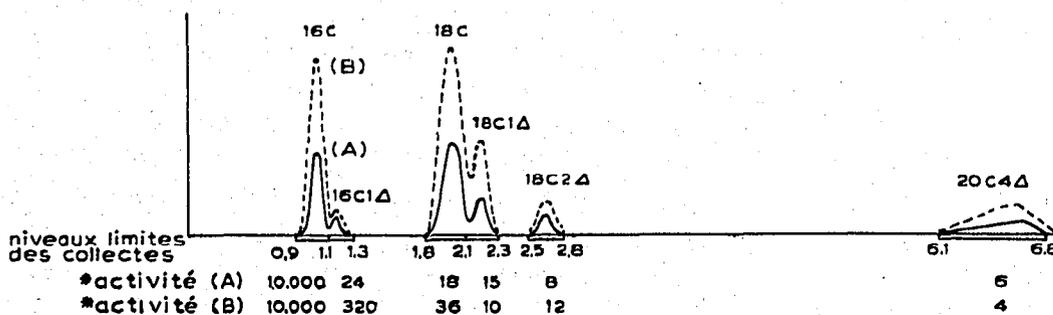


Fig. 4. Contamination des collectes, par le méthyl-palmitate ^{14}C , dans une analyse d'esters méthyliques d'acides gras de phosphoglycérides (mêmes légendes que Fig. 2). (A): analyse de 1 mg d'ester environ. (B): analyse de 2 mg.

Compte tenu des durées de collecte, les contaminations sont du même ordre de grandeur que précédemment (Fig. 2) à partir du stéarate. La forte contamination du palmitoléate provient surtout, évidemment, d'une mauvaise séparation du palmitate.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS PRATIQUES

Dans une analyse complète, les esters sont contaminés par une fraction de tous les esters émergeant avant eux. Les résultats obtenus ci-dessus permettent de calculer l'ordre de grandeur des contaminations relatives à chacun d'eux.

Le contrôle du bruit de fond de collecte au cours de l'analyse, si possible en encadrant les divers esters, permet d'apprécier les contaminations. Dans la pratique, on contrôle les corrections de contaminations provoquées par les esters les plus radio-actifs. Le calcul des contaminations selon le principe établi ci-dessus n'est qu'approximatif mais permet de décider si les activités attribuées à un ester donné sont valables ou non. Dans ces conditions de rectification, l'activité observée au niveau du linoléate après administration d'acétate ^{14}C chez l'animal est de l'ordre de grandeur d'une activité par contamination.

Il est clair que, lorsque les rectifications ainsi calculées sont importantes devant les activités mesurées, il faut, pour obtenir des résultats valables, effectuer de nouvelles analyses selon des méthodes différentes.

Dans le cas où les activités spécifiques des esters d'acides gras saturés sont très différentes de celles des esters d'acides insaturés, on séparera selon des méthodes conventionnelles soit les acides saturés des acides insaturés, soit les esters d'acides saturés des esters d'acides insaturés^{10,11}. Après ce fractionnement préalable, on effectuera sur deux colonnes distinctes l'analyse et la collecte des esters méthyliques des acides gras saturés d'une part, des acides insaturés d'autre part. Selon la nature des problèmes étudiés et selon les résultats ainsi obtenus, on pourra, au moins dans certains cas, se dispenser de recourir aux méthodes classiques de fractionnement qui nécessitent des quantités appréciables de produits.

Enfin, étant donné que, d'une part les séparations sont meilleures, d'autre part les phénomènes de transestérification et de rétention par le support sont d'autant moins notables que la température est moins élevée, on aura intérêt à effectuer les analyses sur polyester à une température modérée, de l'ordre de 180° pour le polyéthylène glycol adipate.

Le méthyl-palmitate $1\text{-}^{14}\text{C}$ utilisé dans ce travail a été mis à notre disposition par le Commissariat à l'Energie Atomique, Département de Biologie, selon le contrat No. 2761.

RÉSUMÉ

Les fractions collectées au cours d'une analyse d'esters méthyliques d'acides gras par chromatographie gaz-liquide sur phase stationnaire polyester sont contaminées par suite de phénomènes de transestérification. L'ordre de grandeur des contaminations par du méthyl-palmitate ^{14}C est déterminé dans diverses conditions d'analyse et l'on discute certaines conclusions pratiques.

SUMMARY

The methyl esters of fatty acids collected during analysis by gas-liquid chromatography on a polyester stationary phase are contaminated owing to trans-esterification processes. The contamination by ^{14}C methyl palmitate is essayed under different conditions of analysis. Practical conclusions are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. POPJAK, A. E. LOWE, D. MOORE, L. BROWN ET F. A. SMITH, *J. Lipid Res.*, 1 (1959) 29.
- ² A. T. JAMES ET E. A. PIPER, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 265.
- ³ L. H. MASON, H. J. DUTTON ET L. R. BAIR, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 322.
- ⁴ A. KARMEN, L. GUIFFRIDA ET R. L. BOWMAN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 1, 44.
- ⁵ A. K. HAJRA ET N. S. RADIN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 131.
- ⁶ J. CORSE ET R. TERANISHI, *J. Lipid Res.*, 1 (1960) 191.
- ⁷ A. KARMEN ET H. R. TRITCH, *Nature*, 186 (1960) 150.
- ⁸ J. C. BARTLET ET D. M. SMITH, *Can. J. Chem.*, 38 (1960) 2057.
- ⁹ M. MEINERTZ ET V. P. DOLE, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 141.
- ¹⁰ Y. KISHIMOTO ET N. S. RADIN, *J. Lipid Res.*, 1 (1959) 72.
- ¹¹ H. GOLDFINE ET K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2596.

J. Chromatog., 10 (1963) 125-130