

SÉPARATION ET IDENTIFICATION DE STÉROLS SUBSTITUÉS SUR LES CYCLES A ET B PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES ET CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

J. R. CLAUDE*, **

Groupe de Recherches sur l'Athérosclérose de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Hôpital Boucicaut, Paris (France)

(Reçu le 8 novembre 1965)

La molécule de cholestérol est capable de donner naissance à des composés, conservant la configuration générale de la molécule initiale, mais qui en diffèrent par certaines modifications (adjonction de fonctions alcooliques ou cétoniques, apparition ou déplacement de doubles liaisons), atteignant les cycles A et B. On les considère le plus souvent comme des produits d'oxydation d'origine biologique¹⁻⁵ dont le rôle est encore obscur^{6,7}; mais certains peuvent aussi se former spontanément *in vitro* sous l'influence d'agents physicochimiques^{5,8-10}. C'est le cas du 7-hydroxycholestérol qui pourrait jouer cependant un rôle métabolique important¹¹. Ce travail décrit les procédés qui, à l'aide de la chromatographie en couche mince (CCM) et de la chromatographie en phase gazeuse (CPG), permettent de séparer ces principaux stérols dont la structure est souvent très voisine.

MÉTHODE D'ÉTUDE DES STÉROLS SUBSTITUÉS SUR LES CYCLES A ET B

Les Tableaux I et II groupent les données relatives à l'isolement et à la caractérisation de divers stérols modifiés sur les cycles A et B.

Chromatographie en couches minces

Réalisées sur Kieselgel*** en utilisant les solvants benzène-acétate d'éthyle 9:1, 2:1 et 1:2 v/v selon des protocoles antérieurement décrits¹⁰ pour éviter les divers risques d'artéfacts.

La mise en évidence des spots est obtenue par observation directe en lumière ultra violette, ce qui permet de déceler déjà quelques corps tel le $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène, et par pulvérisation des réactifs suivants.

(a) *Acide phosphomolybdique à 10 % dans l'éthanol*, colorant en bleu intense les stérols porteurs de groupements hydroxyyles. Des stérols possédant des fonctions cétoniques peuvent être également révélés, mais avec moins d'intensité. Pour ces derniers, la coloration obtenue n'est pas toujours stable et évolue après conservation des plaques 24 h à l'obscurité, à l'inverse de la coloration des stérols hydroxylés, qui demeure inchangée. Le $\Delta^{4,6}$ -cholestadiène-3-one et le Δ^4 -cholestène-3,6-dione en

* Chargé de Recherches à l'INSERM.

** Avec la collaboration technique de Mlle. M. ANTONUCCI et Mme N. LEMORT.

*** Merck, Darmstadt.

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉPARATION ET DE LA RÉVÉLATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Les R_c sont calculés par rapport au cholestérol.

Dénomination	BAE 9-1	BAE 2-1	BAE 1-2	Fluor.	Acide phosphomolybdique	$SbCl_5$	Liebermann	$FeCl_3$
Δ^5 -Cholestène-3 β ,4 β -diol	0.23	0.42	0.69	0	+ bleu	bleu à froid et à chaud	bleu à froid chauffage 8 min: bleu-noir	bleu à froid, violet à chaud
Δ^5 -Cholestène-3 β ,7 α -diol	0.10	0.28	0.46	0	+ + bleu	bleu à froid et à chaud	bleu à froid et à chaud	bleu à froid et à chaud
Δ^5 -Cholestène-3 β ,7 β -diol	0.11	0.33	0.55	0	+ + bleu	bleu à froid et à chaud	bleu à froid et à chaud	bleu à froid et à chaud
Δ^5 -Cholestène-3-one	1.60	1.36	1.09	± vert	+ bleu	rose pâle à chaud, fugace	chauffage 8 min: brun clair	brun
Δ^5 -Cholestène-3 β -ol-7-one (7-Céto-cholestérol)	2.32	1.53	1.10	0	+ bleu	violet à chaud	chauffage 8 min: mauve	violet
Δ^5 -Cholestadiène-7-one	2.16	1.46	1.09	+ jaune	± gris-bleu	brun stable à chaud	chauffage 8 min: bistre brun-vert	bistre
Δ^4 -Cholestène-3,6-dione	1.60	1.35	1.09	+ jaune	± gris bleu, brun après 24 h à l'obscurité et redevient bleu par exposition aux U.V.	brun stable à chaud	chauffage 8 min: rouge violacé brun	rouge violacé
Δ^1 - Δ^4 -Cholestadiène-3-one	1.38	1.25	1.07	0	+ + bleu, violet-rouge après 24 h à l'obscurité	gris vert à chaud, mauve après 24 h	chauffage 8 min: bistre	gris-rosé
Δ^4 - Δ^6 -Cholestadiène-3-one	1.51	1.32	1.08	+ vert	± gris bleu, brun après 24 h à l'obscurité. Redevient bleu par exposition aux U.V.	brun-mauve à chaud	chauffage 8 min: gris brun	rose
5 α -Cholestane-	0.93	1	1.02	0	+ + bleu	rouge bistre par chauffage	non	violet

5 α -Cholestane-3 β -ol (Cholestanol)	0.93	I	1.02	0	+	+	bleu	rouge bistre par chauffage virant au mauve	chauffage: non coloré en 3 min, brun-mauve en 8 min	violet
5 α -Cholestane-3 α -ol (Epicholestanol)	1.46	1.26	1.08	0	+	+	bleu	rouge bistre par chauffage virant au mauve	chauffage: non coloré en 3 min, brun-mauve en 8 min	violet
5 β -Cholestane-3 β -ol (Coprostanol)	1.31	1.20	1.04	0	+	+	bleu	rouge bistre par chauffage virant au mauve	chauffage: non coloré en 3 min, brun-mauve en 8 min	violet
5 α -Cholestane-3 β -ol-6-one	0.25	0.54	0.73	0	±			jaune pâle	chauffage 8 min: jaune-brun	brun orangé
5 α -Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	0	0.05	0.17	0	+	+	bleu	bistre puis gris noir après chauffage	chauffage 8 min: bistre	bistre
5 α -Cholestane-3 β ,5 α -diol-6-one	0	0.05	0.17	0	+	+	bleu	bistre puis gris noir après chauffage	chauffage 8 min: bistre	bistre
4 β ,5-Cholestadiène	2.58	1.53	1.10	+	+	+	bleu	vert à froid violet après chauffage	vert à froid bleu vert à chaud	bleu-violet à froid et à chaud
4 β ,7-Cholestadiène-3 β -ol (7-Déhydrocholestérol)	I	I	I	+	+	+	bleu	rose à froid violet à chaud	gris vert à froid et après chauffage	gris vert
4 β -Cholestène-3 β -ol (Lathostérol)	I	I	I	0	+	+	bleu	brun à chaud	gris vert à froid et après chauffage	gris vert

TABLEAU II

SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Colonne de XE 60 à 3% et SE 52 à 10%. Les temps de rétention sont calculés par rapport au cholestérol.

Dénomination	XE-60 3%	SE-52 10%
Δ^5 -Cholestène-3 β ,4 β -diol	1.87	1.43
Δ^5 -Cholestène-3 β ,7 α -diol	0.39	0.58
Δ^5 -Cholestène-3 β ,7 β -diol		
Δ^5 -Cholestène-3-one	1.73	1.36
Δ^5 -Cholestène-3 β -ol-7-one (7-Cétocholestérol)	1.28	1.37
$\Delta^{3,5}$ -Cholestadiène-7-one	1.45	1.28
Δ^4 -Cholestène-3,6-dione	4.18	2.07
$\Delta^{1,4}$ -Cholestadiène-3-one	2.37	1.58
$\Delta^{4,6}$ -Cholestadiène-3-one	2.06	1.50
5 α -Cholestane-3 β -ol (β -Cholestanol)	1	1
5 α -Cholestane-3 α -ol (Épicholestanol)	0.94	1
5 β -Cholestane-3 β -ol (Coprostanol)	0.84	0.89
5 α -Cholestane-3 β -ol-6-one (6-Céto-cholestanol)	4.38	1.86
	début de décomposition	
5 α -Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	—	2.91
5 α -Cholestane-3 β ,5 α -diol -6-one	—	2.66
$\Delta^{3,5}$ -Cholestadiène	0.40	0.62
$\Delta^{6,7}$ -Cholestadiène-3 β -ol (7-Déhydrocholestérol)	1.15	décomposé
Δ^7 -Cholestène-3 β -ol (Lathostérol)	1.15	1.14

particulier virent du bleu gris pâle au brun, et le $\Delta^{1,4}$ -cholestadiène-3-one au violet rouge dans ces conditions.

En outre, la coloration gris bleu initiale est susceptible de réapparaître par exposition à la lumière ultra violette, ce qui constitue une très bonne contre-épreuve.

(b) *Trichlorure d'antimoine* en solution saturée dans le chloroforme.

(c) *Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD*, préparé selon le procédé décrit par ABELL *et al.*¹²

(d) *Réactif au perchlorure de fer*:

— Solution de perchlorure de fer anhydre à 10% dans l'acide acétique cristallisable: 0.2 ml.

— Acide acétique cristallisable: 30 ml.

— Acide sulfurique concentré: 20 ml.

Les colorations obtenues à l'aide de ces trois derniers réactifs sont souvent voisines ou identiques (cholestérol par exemple). Leur utilisation conjuguée est cependant indispensable pour différencier certains stérols de R_F voisin qui fournissent des colorations différentes (voir Tableau I).

Ces colorations peuvent apparaître spontanément à froid (7-hydroxycholestérol), mais nécessitent le plus souvent un chauffage, dont l'intensité et la durée ont une

influence capitale sur l'apparition et la nature de la couleur observée. Nous avons finalement retenu un chauffage uniforme à 110° pour tous les réactifs, seul variant le temps d'exposition.

Ces temps sont les suivants: réactif a: 10 min; réactif b: 8 min; réactif c: 3 min et 8 min; réactif d: 10 min.

De tous ces agents, le plus sensible est à coup sûr le réactif au perchlorure de fer, mais celui qui fournit les colorations les plus stables est le trichlorure d'antimoine.

La quantité minimale de substance pour laquelle la coloration est encore perçue varie non seulement en fonction du réactif, mais aussi selon les stérols: elle est de l'ordre du microgramme pour les plus sensibles (cholestérol; $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène; $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-6-one; cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol, par exemple), et de quelques microgrammes (5 à 10) pour les moins sensibles (Δ^5 -cholestène-3-one, $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène-7-one; $\Delta^{4,6}$ -cholestadiène-3-one; Δ^4 -cholestène-3,6-dione; par exemple).

En opérant avec les précautions indiquées antérieurement¹⁰ et en réalisant en particulier les migrations à l'obscurité, nous n'avons jamais observé d'altération au cours de l'analyse par CCM.

Chromatographie en phase gazeuse

L'appareil utilisé est du type Aérogaph 600 C à détecteur à ionisation de flamme, muni d'un double four permettant l'analyse successive rapide sur deux types de colonne des échantillons. On a retenu:

(a) Une colonne de 10 pieds \times 2 mm en verre, de silicone XE 60 ("nitrile gum") à 3 % sur Gas Chrom Z (lavé aux acides et désactivé au diméthyl chlorosilane) 80-100 mesh. Température de colonne 220°, température de l'injecteur 260°.

(b) Une colonne de 5 pieds \times 2 mm en inox de phényl méthyl silicone (SE 52) à 10 % sur chromosorb W 80 à 100 mesh lavé aux acides. Température de la colonne: 260°, température de l'injecteur: 280°.

Les débits d'azote employés sont de l'ordre de 35 à 50 ml/min, les stérols sont injectés en solution dans le sulfure de carbone ou le dioxanne.

Les temps de rétention indiqués au Tableau II sont calculés par rapport au cholestérol et non au 5α -cholestane comme il est habituel de le faire pour deux raisons:

(1) Le cholestérol est toujours présent dans les échantillons d'origine biologique que nous soumettons à l'analyse et constitue ainsi en quelque sorte un auto étalon interne.

(2) Les temps de rétention de certains stérols sont trop élevés pour être évalués par rapport au 5α -cholestane.

Dans un but de simplicité et de rapidité d'exécution, ainsi que pour éviter l'addition d'une manipulation supplémentaire qui ne serait pas forcément inactive sur ces molécules particulièrement peu stables, nous n'avons pas cherché à améliorer nos séparations par l'utilisation de dérivés (esters trifluoracétiques, triméthylsilyques, etc.).

De plus, l'utilisation successive de la CCM préparative, comme il a été décrit dans un travail antérieur¹⁰, et de la CPG permet d'achever une séparation qui peut être imparfaite par un seul de ces procédés. L'élution de la zone où se trouvent deux spots de R_F voisins, suivie de l'injection en CPG est en effet souvent fructueuse.

REMARQUES

Comme le montre l'examen des Tableaux I et II, certains stérols sont très bien séparés par CCM comme par CPG, mais dans un certain nombre de cas, leur utilisation est complémentaire. On peut alors distinguer 3 possibilités:

(1) Résolution incomplète par CCM, complète par CPG

Quatre groupes de stérols entrent dans cette catégorie:

(a) 5α -Cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol et 5α -cholestane- $3\beta,5\alpha$ -diol-6-one qui sont uniquement distinguables sur SE 52 à 10%.

(b) Δ^5 -Cholestène- $3\beta,4\beta$ -diol et 5α -cholestane- 3β -ol-6-one.

(c) $\Delta^{1,4}$ -Cholestadiène-3-one et coprostanol.

(d) Δ^5 -Cholestène-3-one, epicholestanol, Δ^4 -cholestène-3,6-dione et $\Delta^{4,6}$ -cholestadiène-3-one. Pour ces deux derniers stérols en particulier, la très bonne séparation par CPG contraste avec leur grande analogie de comportement en CCM.

Il faut souligner également que le caractère différentiel des réactifs de révélation proposés permet souvent d'aider au dépistage de deux de ces stérols voisins (Δ^5 -cholestène- $3\beta,4\beta$ -diol et 5α -cholestane- 3β -ol-6-one).

(2) Résolution incomplète par CPG, complète par CCM

Entrent dans cette catégorie 4 autres groupes:

(a) Δ^5 -Cholestène- $3\beta,7\alpha$ -diol, Δ^5 -cholestène- $3\beta,7\beta$ -diol et $\Delta^{3,5}$ -cholestadiène.

(b) Coprostanol, epicholestanol et bloc cholestérol-cholestanol.

(c) Δ^5 -Cholestène- $3\beta,4\beta$ -diol et Δ^5 -cholestène-3-one.

(d) 5α -Cholestane- 3β -ol-6-one et Δ^4 -cholestène-3,6-dione.

(3) Résolution incomplète par CCM et CPG

Certains stérols portés aux Tableaux I et II sont mal séparés par les deux procédés. Il s'agit du cholestanol, du 7-déhydrocholestérol, et du lathostérol. Ils ont été indiqués en fait ici pour mémoire afin de ne pas négliger la possibilité de leur interférence, mais leur séparation a été décrite en détail dans des travaux antérieurs¹²⁻¹⁵, souvent à l'aide de plaques imprégnées de nitrate d'argent.

On peut néanmoins faire remarquer que la CPG sur les types de colonne préconisés permet, au moins pour le 7-déhydrocholestérol et le lathostérol, de présumer de leur présence.

CONCLUSION

L'utilisation parallèle ou successive de la CCM ou de la CPG dans certaines conditions permet la séparation et la caractérisation de divers stérols substitués ou modifiés sur les cycles A et B par rapport au cholestérol.

Ceci doit permettre leur recherche précise dans les milieux biologiques après avoir réalisé leur isolement dans des conditions rigoureuses¹⁰.

RÉSUMÉ

L'utilisation de la chromatographie en couche mince sur plaque silicagel à

l'aide de 3 solvants différents, suivie de la révélation par divers réactifs, liée à celle de la chromatographie en phase gazeuse sur deux types de colonnes, permet la séparation et l'identification de divers stérols substitués ou modifiés sur les cycles A et B par rapport au cholestérol. Cette méthode doit permettre l'étude de ces stérols dans divers milieux biologiques où la réalité de leur existence présente un grand intérêt métabolique.

SUMMARY

The use of thin layer chromatography on silica gel plates with three different solvents, followed by visualization by means of various reagents, together with gas chromatography on two types of columns, permits the separation and identification of various sterols in which rings A and B are substituted or modified as compared with cholesterol. This method permits the study of these sterols in many different biological media where their presence is of great metabolic interest.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. A. D. HASLEWOOD, *Nature*, 154 (1944) 29.
- 2 H. B. MACPHILLAMY, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1732.
- 3 E. HÄRDEGGER, L. RUZICKA ET E. TAGMANN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 2205.
- 4 O. WINTERSTEINER ET J. R. RITZMANN, *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 697.
- 5 V. PRELOG, L. RUZICKA ET P. P. STEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 222.
- 6 S. BERGSTROM, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 16A (1943) 1.
- 7 P. BLADON, dans R. P. COOK, *Cholesterol Chemistry, Biochemistry and Pathology*, Academic Press, New York, 1958, p. 76.
- 8 I. M. HAIS ET N. B. MYANT, *Biochem. J.*, 94 (1965) 85.
- 9 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *Compt. Rend.*, 260 (1965) 3204.
- 10 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 189.
- 11 G. S. BOYD, *Federation Proc.*, 21 (1962) 86.
- 12 C. L. ABELL, B. B. LEVY, B. B. BRODIE ET F. E. KENDALL, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 357.
- 13 J. AVIGAN, D. S. GOODMAN ET D. STEINBERG, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 100.
- 14 J. R. CLAUDE, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 596.
- 15 J. R. CLAUDE ET J. L. BEAUMONT, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 22 (1964) 815.

J. Chromatog., 23 (1966) 267-273