

Conclusion

Cholesteryl esters were separated into five well defined fractions by TLC. Their fatty acid composition was quantitatively determined by GLC. It was found that each fraction obtained only one major fatty acid, 16:0, 18:1, 18:2, 20:4 and 20:5, respectively, which means that the separation was only dependent on the degree of unsaturation of the fatty acids.

Acknowledgement

The study was supported by a grant from the Swedish Medical Research Council (No. K67-13X-627-03).

Department of Neurochemistry,
Psychiatric Research Centre,
University of Gothenburg (Sweden)

CHRISTER ALLING
LARS SVENNERHOLM
JIRL TICHY

- 1 C. MICHALEC, *Naturwiss.*, 42 (1955) 509.
- 2 N. ZÖLLNER, G. WOLFRAM AND C. AMIN, *Klin. Wochschr.*, 40 (1962) 273.
- 3 C. ALLING, S. J. DENCKER, L. SVENNERHOLM AND J. TICHÝ, *Lancet*, II (1967) 312.
- 4 L. SVENNERHOLM, *J. Lipid Res.*, submitted for publication.
- 5 N. ZÖLLNER AND D. EBERHAGEN, *Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut*, Springer, Berlin, 1965, p. 119.
- 6 S. DE WITT GOODMAN, *Physiol. Rev.*, 45 (1965) 747.
- 7 O. W. PORTMAN AND M. SUGANO, *Arch. Biochem. Biophys.*, 102 (1963) 335.

Received December 29th, 1967

J. Chromatog., 34 (1968) 413-415

CHROM. 3385

Délipidation totale des extraits plasmatiques contenant les 17 cétostéroïdes (déhydroépiandrostérone, androstérone, étiocholanolone)*

Pour évaluer les 17 cétostéroïdes plasmatiques, il est indispensable de les séparer des lipides que contiennent les extraits totaux. Cette délipidation doit retirer des quantités importantes de cholestérol libre et estérifié, triglycérides, acides gras, phospholipides et, éventuellement, diglycérides et monoglycérides. Pour la réaliser de nombreuses méthodes ont été préconisées, qui ont toutes des inconvénients: la partition entre solvants (p. ex., méthanol/eau 70:30-hexane 1:1) est fastidieuse et laisse un résidu lipidique non négligeable¹⁻⁶; la précipitation à basse température (-15 °) durant une quinzaine d'heures dans des mélanges complexes à base de méthanol-eau 90:10⁷, 70:30⁸, 80:20⁹ ne débarrasse qu'incomplètement les 17 cétostéroïdes des lipides les accompagnant; le recours à une purification sur colonne de florisol¹⁰⁻¹², d'alumine¹³⁻¹⁵, de silicagel^{16,17} ou d'Amberlite¹⁸ ne résout pas davantage le problème et introduit, en plus, des pics artefacts dans la chromatographie gazeuse ultérieure¹⁹; le passage de l'extrait plasmatique sur deux colonnes successives chargées d'un

* Travail du Groupe de Recherches sur l'Athérosclérose (INSERM), Laboratoire du Prof. J. L. BEAUMONT, Hôpital Boucicaut, Paris 15e, France.

support différent (Séphadex G 25 et acide silicique) n'aboutit pas davantage au degré de pureté souhaitable du matériel à chromatographier¹⁰.

ANGELICO et coll.²⁰ ont préconisé récemment une séparation des lipides tissulaires et des stéroïdes par chromatographie en couche mince. Leur mode opératoire comporte toutefois deux migrations successives: dans la première, les stéroïdes restent sur la ligne de départ avec les phospholipides et, dans la seconde, pratiquée après élution du premier chromatogramme, les 17 cétostéroïdes se séparent des phospholipides.

Dans le présent travail, nous avons étudié les conditions qui permettent de séparer en un seul temps, par chromatographie en couche mince, les 17 cétostéroïdes plasmatiques (déhydroépiandrostérone (DHEA), androstérone, étiocholanolone) de tous les constituants lipidiques après les opérations d'hydrolyse classiques.

Matériel

Appareil automatique d'étalement des couches minces Chemetron.

Plaques en verre de 20 × 20 cm.

Silica Gel H Merck pour chromatographie en couche mince.

Hexane Merck.

Éther éthylique Merck.

Acide phosphomolybdique Merck.

Méthanol Merck.

Seringue Hamilton de 50 μ l.

Générateur d'air, réglé à \pm 300 ml/min.

Cuve en verre de 21 × 21 × 12 cm pour contenir les chromatogrammes.

Étuve à 110°.

Méthode

Préparation des plaques. Les plaques sont dégraissées soigneusement au méthanol ou au mélange méthanol-ether éthylique 80:20²¹, puis séchées.

On ajoute au Silica Gel H une quantité du mélange méthanol-eau 1:1 telle que 100 g de Silica Gel H soit imprégné de 250 ml du mélange. Les plaques dont l'épaisseur est de 0.7 mm sont laissées à l'air 20 min puis activées durant 1 h à 110°.

On dépose l'extrait à délipider à 1 cm du bord de la plaque et à une distance de 4 cm de ce premier dépôt, on dispose 20 μ g de déhydroépiandrostérone et d'étiocholanolone. L'extrait à délipider est solubilisé dans 50 à 100 μ l de CHCl_3 -méthanol 9:1 et l'étalon, dans 20 μ l du même mélange.

Les conditions idéales pour déposer les produits à chromatographier nous paraissent être les suivantes: la plaque est déposée sur une surface tiède et à mesure que l'on dépose les gouttes de solvant, on favorise son évaporation par un léger courant d'air, amené par une pipette Pasteur doublement effilée, reliée à un générateur d'air ou d'azote.

Chromatographie. Dans le fond de la cuve à chromatographie, on dispose la phase mobile suivante: éther-hexane-acide acétique 70:30:1, en quantité telle que la surface du liquide recouvre de 1 à 2 mm le silicagel de la plaque, ce qui correspond à un volume de \pm 130 ml de solvant pour une cuve dont les dimensions sont données plus haut. La migration est complète en 35-40 min. Le R_f de la DHEA et de l'androstérone est de 0.33 et celui de l'étiocholanolone est de 0.22.

Révélation des étalons. Après séchage de cinq minutes sous la hotte, on vaporise sur la partie de la plaque contenant les étalons une solution d'acide phosphomolybdique à 10 % dans le méthanol. On peut aussi vaporiser la solution récemment préconisée par TREIHER et coll.²¹ et comportant un mélange de *m*-dinitrobenzène et de bleu de tétrazolium en milieu KOH aqueux. La sensibilité de cette méthode est supérieure à celle de l'acide phosphomolybdique ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) mais les réactifs doivent être fraîchement préparés.

La partie du chromatogramme contenant les extraits plasmatiques est protégée par une plaque de verre.

Élution. La zone correspondant aux étalons est grattée par une lame de rasoir et la surface de verre ainsi mise à nu est rincée au moyen de petites parcelles de papier filtre imbibé d'éthanol, de façon à récupérer les stéroïdes qui restent accrochés au verre. La poudre de silicagel et les morceaux de papier filtre sont mis dans 5 ml d'éthanol ou d'acétate d'éthyle durant 10 min et centrifugés. On répète l'extraction à trois reprises. Le résidu d'évaporation ne contient plus aucune trace de lipides.

Présence d'artefacts à la chromatographie gazeuse. Si le Silica Gel H utilisé contient des impuretés qui se traduisent par des pics parasites en chromatographie gazeuse,

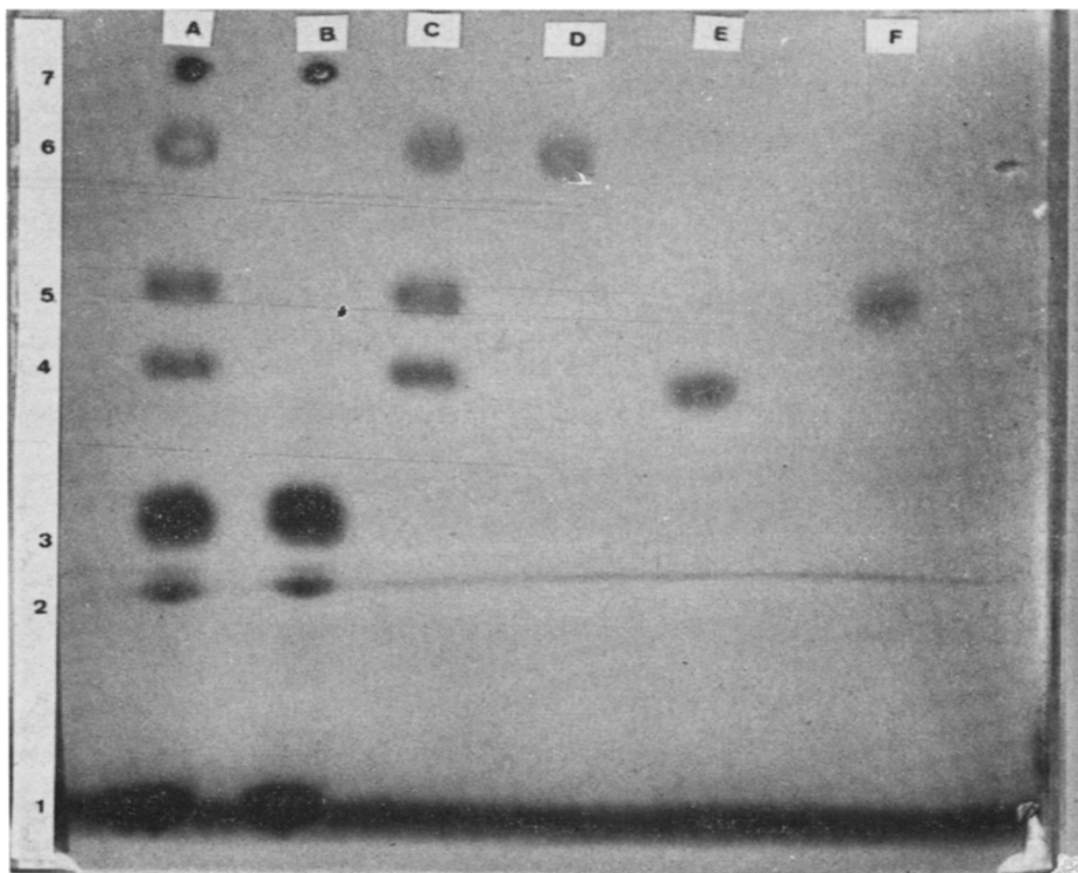


Fig. 1. Délipidation complète des extraits plasmatiques contenant les 17 cétostéroïdes. (A) Sérum normal enrichi par divers stéroïdes. (B) Sérum normal. (C) Mélange d'étalons de stéroïdes. (D) Etalon de 11-céto-étiocholanolone. (E) Etalon de déhydroépiandrostérone. (F) Etalon d'étiocholanolone. (1) Esters du cholestérol. (2) Triglycérides et, légèrement en arrière, acides gras. (3) Cholestérol libre. (4) Déhydroépiandrostérone, Δ^4 -androstènedione, androstérone. (5) Étiocholanolone. (6) 11-Céto-étiocholanolone. (7) Phospholipides et, éventuellement, monoglycérides.

on pourra s'en débarrasser par un lavage préalable, selon la méthode de MEYER ET WHITE²², ou selon celle de REDGWELL ET BIELESKI²³.

Résultats

Les résultats sont reproduits sur la Fig. 1. On y distingue les esters du cholestérol (R_F 1), les triglycérides (R_F 0.72), les acides gras libres, (R_F 0.66), le cholestérol libre (R_F 0.60), la déhydroépiandrostérone, mêlée à l'androstérone et à la Δ^4 -androstènedione (R_F 0.36), l'étiocolanolone (R_F 0.30), la 11-céto-étiocolanolone (R_F 0.10) et les phospholipides (R_F 0).

Les R_F des lipides et ceux des 17 cétostéroïdes sont assez différents pour que l'élution de ceux-ci soit faite avec une grande sécurité.

Un tel chromatogramme accepte le dépôt, sur une longueur de 15 cm, d'un extrait plasmatique total qui peut contenir les lipides de plus de 20 ml de plasma.

Remerciements

Nos remerciements vont à Mlle CH. VERDET pour sa collaboration technique et à la firme Organon qui nous a procuré les stéroïdes utilisés dans le présent travail.

Laboratoire du Prof. J. L. Beaumont, Hôpital Boucicaut,
Paris 15e (France)

R. NOIRET*

- 1 L. I. GARDNER, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 13 (1953) 941.
- 2 G. W. OERTEL ET K. EIK-NES, *J. Biol. Chem.*, 232 (1958) 543.
- 3 C. J. MIGEON, *Hormones in Human Plasma*, J. A. Churchill, London, 1960.
- 4 B. HUDSON ET G. W. OERTEL, *Ann. Biochem.*, 2 (1961) 248.
- 5 H. BERNARD ET A. SEEMAN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 1405.
- 6 N. DESHPANDE ET R. D. BULBROOK, *J. Endocrinol.*, 28 (1964) 289, 297.
- 7 F. PANICUCCI ET G. TAPONCO, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 41 (1965) 874.
- 8 G. W. OERTEL ET E. KAISER, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 221.
- 9 G. W. OERTEL ET E. EIK-NES, *J. Biol. Chem.*, 232 (1958) 543.
- 10 C. J. MIGEON ET J. E. PLAGER, *Recent Progr. Hormone Res.*, 9 (1954) 235.
- 11 C. J. MIGEON ET J. E. PLAGER, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 17 (1955) 702.
- 12 E. L. SAIER, E. CAMPBELL, H. S. STRICKLER ET R. C. GRAUER, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 19 (1959) 1162.
- 13 D. H. SANDBERG, N. AHMAD, M. ZECHMANN ET W. W. CLEVELAND, *Steroids*, 6 (1965) 777.
- 14 C. W. CLAYTON, A. M. BONGIOVANNI ET C. PAPADATOS, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 15 (1955) 633.
- 15 W. HEYNS ET P. DE MOOR, *Excerpta Medica International Congress Series No. 101, Androgens in Normal and Pathological Conditions*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1965.
- 16 J. W. GOLDZIEHER, R. A. BAKER ET E. C. RIHA, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21 (1961) 62.
- 17 J. A. BEGUE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 885.
- 18 K. SJOVALL, J. SJOVALL, K. MADDOCK ET E. C. HORNING, *Anal. Biochem.*, 64 (1966) 33.
- 19 J. SJOVALL ET R. VIHKO, *Steroids*, 6 (1965) 597.
- 20 R. ANGELICO, C. RAVINA, A. D'ANTONA ET G. GIOLLI, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 57.
- 21 L. TREIHER, W. RINDT ET G. W. OERTEL, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 480.
- 22 A. C. MEYER ET H. B. WHITE, Jr. *J. Chromatog.*, 30 (1967) 228.
- 23 R. J. REDGWELL ET R. L. BIELESKI, *J. Chromatog.*, 30 (1967) 231.

Reçu le 26 octobre 1967; modifié le 3 janvier 1968

* Adresse actuelle: Lab. Chimie Hormonologique, 12 Minderbroederstraat, Leuven, Belgique.