

CHROM. 4107

Artefacts expérimentaux pouvant survenir lors de la chromatographie en couche mince des lipides membranaires

L'analyse des lipides des fractions subcellulaires est une manipulation des plus courantes à l'heure actuelle. L'échelle microscopique des échantillons examinés exige un soin tout particulier du matériel mis en oeuvre et le personnel responsable prend en général un ensemble de précautions opératoires qui, à première vue, paraissent suffisantes. Cependant, comme nous allons le montrer, la contamination qui provient encore de la verrerie, des solvants et des adsorbants risque de masquer totalement le lipide à analyser.

La présence de 5 à 10 p.p.m. d'acides gras dans les solvants étiquetés "pour analyse" est une contamination dont il est parfois difficile de se débarrasser et qui se répercute sur les résultats ultérieurs de façon d'autant plus accentuée que les opérations d'extraction, de lavage et de purification ont été mieux soignées. On se doit donc de vérifier la transparence spectrale des solvants avant leur emploi. Ce contrôle effectué, la contamination la plus importante provient certainement de l'adsorbant et notre propos est d'attirer l'attention sur quelques résultats concernant l'analyse de gels de silice commerciaux, en indiquant ensuite une méthode de purification plus poussée que celles qu'on a coutume d'effectuer.

Les gels de silice avec ou sans plâtre peuvent renfermer une quantité appréciable de lipides qui varie avec l'origine commerciale des gels et le lot considéré. Par exemple, trois lots de gel de silice avec plâtre livrés successivement par le même fournisseur ont été contrôlés de la façon suivante: un échantillon de l'ordre du gramme est traité d'abord par le méthylate de sodium puis par le méthanol chlorhydrique¹ de façon à convertir les matières grasses qui peuvent éventuellement s'y trouver en esters méthyliques correspondants. L'analyse en chromatographie gaz-liquide et l'estimation quantitative par étalonnage interne (pentadécanoate de méthyle) permet de déceler 10 μ g, 300 μ g ou 800 μ g de lipides suivant le gel de silice examiné. La nature du contaminant varie d'un lot à l'autre: acides gras, alcools supérieurs ou mélange des deux (Fig. 1).

On peut mettre en évidence la présence d'acide palmitique, stéarique, oléique, linoléique. Lorsque les alcools supérieurs sont peu abondants, ils peuvent aisément être confondus (Fig. 2) avec des acides gras à longue chaîne polyinsaturés. Les pics A et B émergent de la colonne de DEGS avec une longueur équivalente de chaîne (LEC) voisine de celle des acides gadoléique, linoléique ou docosapentaénoïque² (Tableau I).

Remarque

Les auteurs qui décrivent leur méthode de purification des adsorbants font migrer sur la plaque le même système de solvants que celui qui est utilisé ultérieurement pour la chromatographie. Comme on va le voir, ce procédé est tout à fait insuffisant pour éliminer totalement les contaminants.

Si l'on fait migrer séparément sur deux plaques préparatives de gel de silice soit le système de solvants utilisé pour la séparation des graisses³ soit celui qui permet de séparer les phospholipides⁴ on s'aperçoit qu'il reste encore des lipides en opérant de

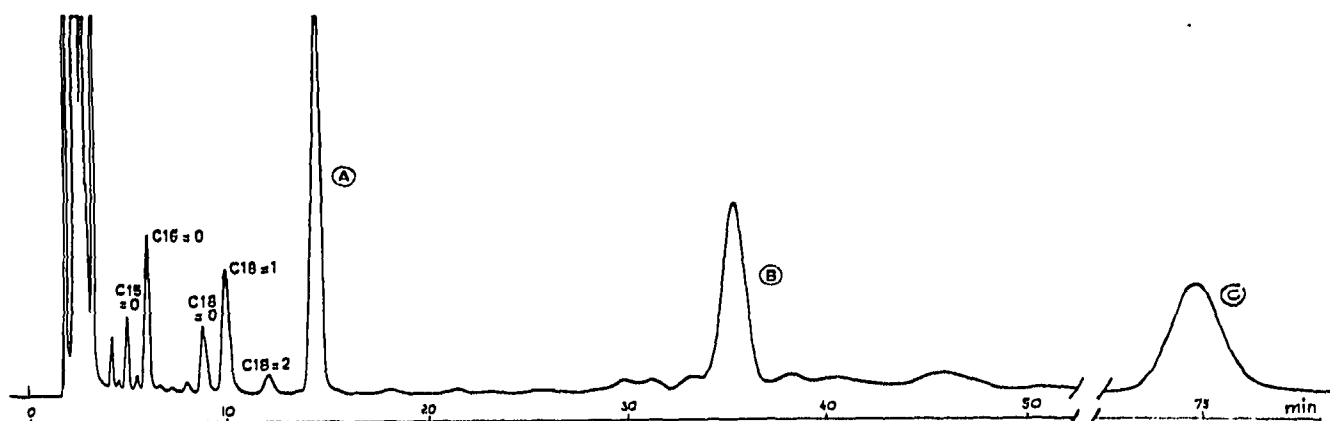


Fig. 1. Chromatographie gaz-liquide d'un mélange d'alcools supérieurs et d'esters méthyliques d'acides gras, contaminant un gel de silice avec plâtre (alcools supérieurs: pics A, B et C). Appareil: Girde! 75 CD muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Colonne: DEGS 4% sur Chromosorb W 80/100, longueur 3 m, diamètre 1/8 in. Température du four: 200°; température d'injection: 220°. Pression d'azote à l'entrée: 1.9 kg/cm².

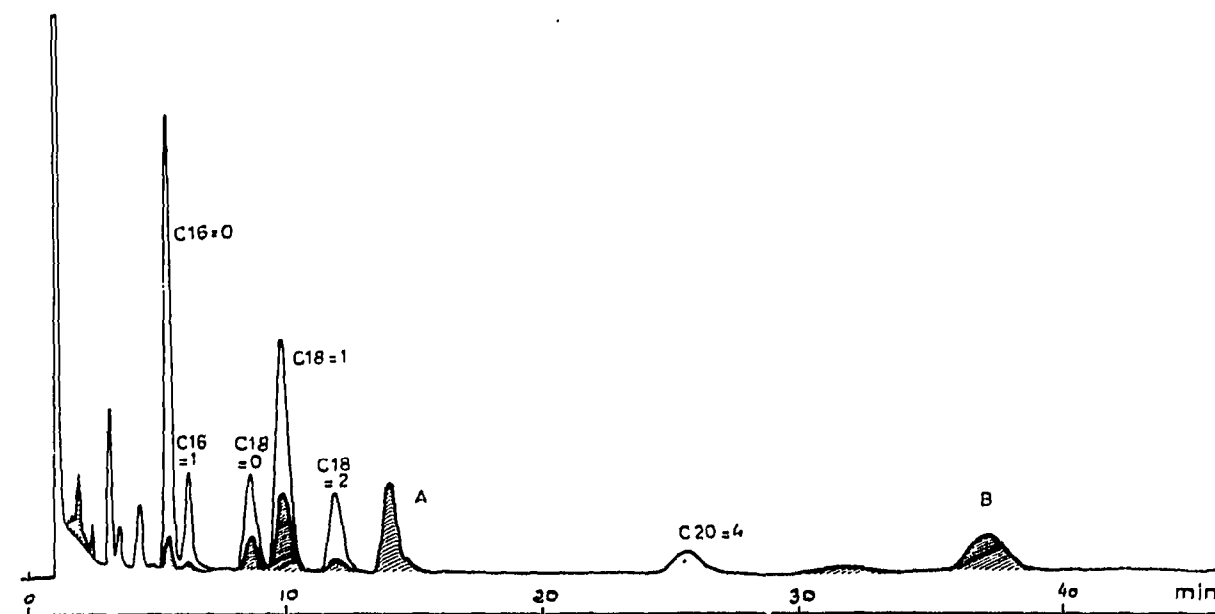


Fig. 2. Chromatographie gaz-liquide des esters méthyliques d'un échantillon de "phospholipides membranaires" contaminés par le gel de silice utilisé pour leur séparation. Conditions d'analyse identiques à celles de la Fig. 1. Partie hachurée: contamination.

TABLEAU I

	LEC ^a
Pic A	20.40
C20:1ω9	20.44
C18:3ω3	20.40
Pic B	24.90
C22:5ω6	24.97

^a LEC, Longueur équivalente de chaîne calculée par rapport au temps de rétention des esters méthyliques saturés.

la façon suivante: on prélève sur chaque plaque une bande de gel de silice de 1 cm de large ayant un R_F de 0.5 (ce qui représente approximativement 500 mg de poudre) et on lui fait subir le même traitement que celui qui a été décrit plus haut.

Après chromatographie gaz-liquide avec étalonnage interne on retrouve 120 μg d'acides gras dans un cas, 80 μg dans l'autre alors que, dans un même poids et avant lavage, le gel de silice renfermait 170 μg de lipides.

La présence de contaminants lipidiques se manifeste également dans certains gels de silice vendus déjà étalés sur support flexible et destinés à la chromatographie préparative.

Méthode proposée pour la purification des gels de silice (avec ou sans plâtre)

Le protocole de purification suivant donne d'excellents résultats: 100 g de gel de silice sont traités pendant 30 min à 60-70° par 400 ml d'éthylate de sodium à 0.2 %. Après essorage, on traite pendant 30 min à 60-70° par 200 ml d'acide acétique à 20 % dans l'éthanol.

Après filtration, lavages répétés à l'éthanol et séchage, la contamination a complètement disparu (Fig. 3).

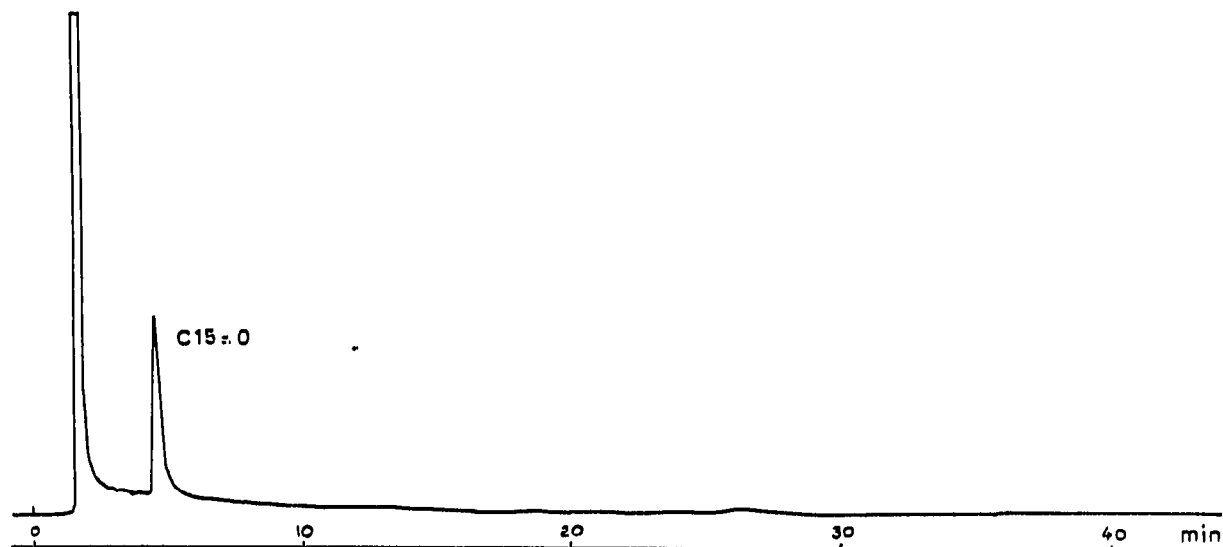


Fig. 3. Chromatographie gaz-liquide montrant la disparition des contaminants après le traitement suivant le procédé indiqué. Le pentadécanoate de méthyle est utilisé comme étalon interne. Conditions d'analyse identiques aux précédentes.

Conclusion

La contamination des gels de silice (avec ou sans plâtre) par des traces de lipides de l'ordre de 100 μg à 300 $\mu\text{g/g}$ peut être soit négligeable soit tout à fait rédhibitoire suivant l'échelle de poids des éléments qu'on cherche à analyser après séparation de leurs constituants en chromatographie préparative. Ainsi, pour une contamination moyenne de 200 μg sur une région de la plaque contenant 10 mg de lipides, l'erreur n'est que de 2 %, pour 1 mg de lipides elle est de 20 % et se monte à 200 % si l'échantillon à analyser représente 100 μg .

Le traitement des gels de silice avec ou sans plâtre par migration de solvants sur la plaque préparative ou même par suspension et décantation répétées dans ces mêmes solvants est absolument insuffisant pour éliminer les traces contaminantes difficilement extractibles. Après un tel traitement on retrouve encore des acides gras (palmitique, stéarique, oléique, linoléique) et des alcools supérieurs qui perturbent considérablement les résultats de l'analyse des lipides membranaires manipulés à l'échelle microscopique. L'erreur peut être totalement évitée si l'on prend la précaution de purifier les gels de silice suivant le procédé que nous préconisons avant leur utilisation en chromatographie préparative.

*Service de Lipophysiologie,
Centre de Recherches sur la Nutrition,
CNRS, 9, Rue Emile, 92-Bellevue (France)*

J. P. CARREAU
D. LAPOUS
J. RAULIN

- 1 M. LOURY, *Rev. Franç. Corps Gras*, 6 (1967) 383.
- 2 H. H. HOFSTETTER, N. SEN ET R. T. HOLMAN, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 537.
- 3 J. L. BROWN, J. M. JOHNSTON, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 480.
- 4 V. P. SKIPSKI, R. F. PETERSON, J. SANDERS ET M. BARCLAY, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 227.

Reçu le 31 mars 1969

J. Chromatog., 42 (1969) 422-425