

CHROM. 9037

## SÉPARATION QUANTITATIVE DES LIPIDES D'ORIGINE BIOLOGIQUE PAR CHROMATOGRAPHIES SUCCESSIVES SUR COUCHES MINCES JUXTAPOSÉES

J.-L. CHABARD, F. VÉDRINE, D. GODENECHÉ, J. PETIT et J.-A. BERGER

*Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie et Unité No. 71 de P.I.N.S.E.R.M., Boîte Postale No. 38, 63001 Clermont-Ferrand Cédex (France)*

(Reçu le 9 décembre 1975)

---

### SUMMARY

*Quantitative separation of biological lipids by successive chromatographic runs on juxtaposed thin layers*

During a study on incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labeled precursors in biological lipids, we had to elaborate a method of quantitative separation of lipid classes, based upon three successive chromatographic runs on juxtaposed thin layers. The first thin layer, on which the lipid extract is applied, consists of silica gel alkalisied by means of sodium hydroxide solution. The second thin layer is constituted only by silica gel G.

The three one-dimensional migrations are respectively carried out in the following solvent systems: diethyl ether-hexane-benzene (55:30:15), hexane-benzene (80:20) and diethyl ether-benzene-acetic acid (62:20:18). The lipid fractions are scraped out and counted by liquid scintillation. The reproducibility of the whole operation is discussed.

---

### INTRODUCTION

L'étude de l'incorporation de précurseurs, marqués par  $^{14}\text{C}$ , dans les lipides hépatiques et sériques du rat, nous a conduits à rechercher une méthode de séparation efficace et reproductible des diverses fractions lipidiques et susceptible en outre d'être associée, sur le plan quantitatif, au comptage par scintillation liquide.

L'intérêt de l'obtention directe d'échantillons liquides, recueillis par un collecteur automatique, nous a d'abord incités à nous adresser à la chromatographie sur colonne et la méthode de Carroll<sup>1</sup>, employant une colonne de Florisil, hydraté à 7% d'eau, nous a paru la plus efficace. Malheureusement, l'utilisation successive de plusieurs solvants très volatils, tels que l'éther, entraîne des variations importantes du volume des échantillons d'une opération à l'autre; de plus, la chromatographie sur colonne ne permet pas de contrôler systématiquement chaque opération à l'aide de témoins lipidiques et, d'autre part, il nous était impossible de disposer de tous les lipides marqués de référence. Enfin, il faut noter que, dans la technique de Carroll,

les phospholipides ne sont pas élués et restent fixés sur la colonne de Florisil. Pour toutes ces raisons, nous avons été amenés à renoncer à cette méthode.

Seule, la chromatographie sur couches minces semblait donc susceptible de résoudre notre problème, mais, parmi les nombreuses méthodes proposées dans la littérature, faisant généralement appel à des couches minces de silice, aucune ne nous a paru entièrement satisfaisante. En effet, la plupart d'entre elles ne concernent pas la séparation de la totalité des fractions lipidiques présentes dans les extraits biologiques, comme par exemple les hydrocarbures du type squalène<sup>2-9</sup>. De plus, aucune n'engendre une séparation parfaite, soit du cholestérol et des diglycérides<sup>2,5,7,9,10</sup>, soit des esters du cholestérol et des hydrocarbures<sup>5,11</sup>.

Nous avons néanmoins choisi une méthode de départ, dont nous nous sommes employés à améliorer le pouvoir séparateur. Il s'agit de la méthode de French et Andersen<sup>3</sup>, fondée sur deux chromatographies unidimensionnelles successives et qui utilise deux solvants, rappelant ceux de la méthode de Carroll<sup>1</sup>: benzène-hexane (15:85) pour la première migration et acide acétique-éther-hexane (2:29:69) pour la seconde. Cette méthode ne nous a pas permis d'obtenir, en particulier, une bonne individualisation du cholestérol et des diglycérides.

Or, parallèlement, nous avons remarqué que l'élimination de l'acide acétique des systèmes de solvants utilisés entraînait une meilleure séparation de ces deux fractions. C'est effectivement ce que l'on observe au cours d'une première migration, réalisée avec le système I, éther-hexane-benzène (55:30:15), alors qu'une seconde migration avec le système II, hexane-benzène (80:20), sépare finalement les triglycérides, les esters du cholestérol et les hydrocarbures. Par contre, l'autoradiographie d'un chromatogramme, obtenu selon cette méthode avec un extrait hépatique (Fig. 1), montre que les acides gras libres donnent une trainée, qui masque le cholestérol et que les monoglycérides restent pratiquement sur la ligne de dépôt avec les phospholipides.

Pour éviter cet étalement particulièrement gênant des acides gras, nous avons fait appel à la technique des couches minces juxtaposées, mise au point au laboratoire voici une dizaine d'années<sup>12-15</sup>. L'extrait lipidique est déposé sur une première couche alcaline, à base de silice et d'hydroxyde de sodium et s'étendant sur les trois premiers centimètres de la plaque. Cette première couche bloque les acides gras, qui restent à l'origine avec les phospholipides. Ce résultat est illustré par la Fig. 2, qui représente l'autoradiographie d'un chromatogramme, obtenu avec le même extrait hépatique que précédemment.

En ce qui concerne les fractions restant sur la ligne de dépôt, leur séparation peut être obtenue au cours d'une troisième chromatographie, à l'aide du système de solvants acide III, éther-benzène-acide acétique (62:20:18). La migration est réalisée de manière à ce que le front du solvant ne puisse atteindre le spot du cholestérol. La Fig. 3, représentant la chromatographie d'un mélange de témoins lipidiques purs, montre que l'on peut finalement obtenir une très bonne séparation de toutes les fractions.

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

### *Origine des lipides de référence et des divers réactifs*

Parmi les produits de référence utilisés, les phospholipides (lécithine et sphin-

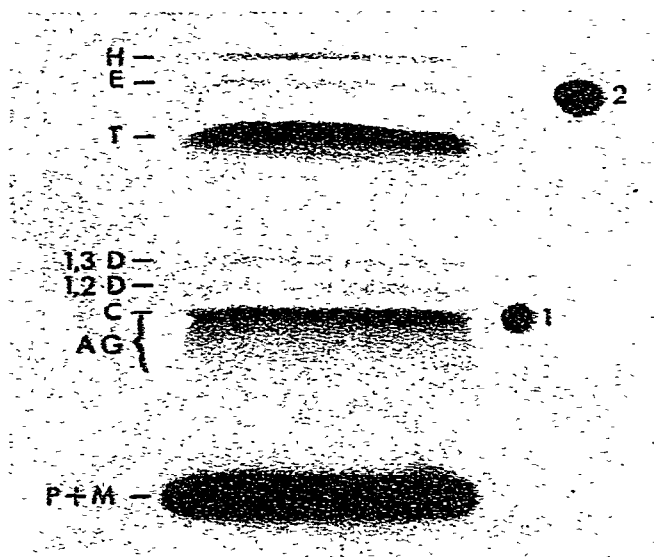


Fig. 1. Autoradiographie du chromatogramme d'un extrait hépatique, réalisé sur simple couche de silice G, avec des témoins de (1) [ $^{14}\text{C}$ ]cholestérol et de (2) palmitate de [ $^{14}\text{C}$ ]cholestérol. On distingue: H, hydrocarbures de type squalène; E, esters du cholestérol; T, triglycérides; 1,2 D et 1,3 D, 1,2 et 1,3 diglycérides; C, cholestérol; M, monoglycérides; AG, acides gras; P, phospholipides.

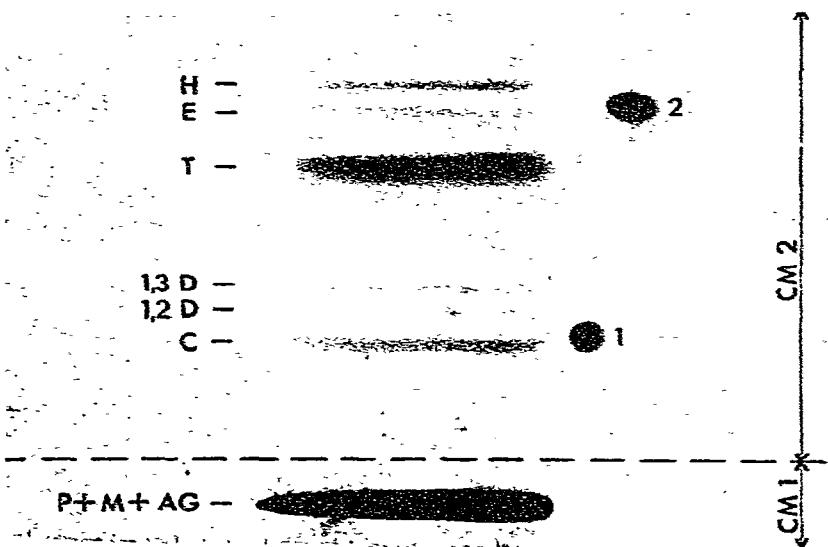


Fig. 2. Autoradiographie du chromatogramme du même extrait hépatique, sur couches minces juxtaposées. CM 1, première couche mince de silice G imprégnée d'hydroxyde de sodium; CM 2, deuxième couche mince de silice G pure. Les autres symboles utilisés sont identiques à ceux de la Fig. 1.

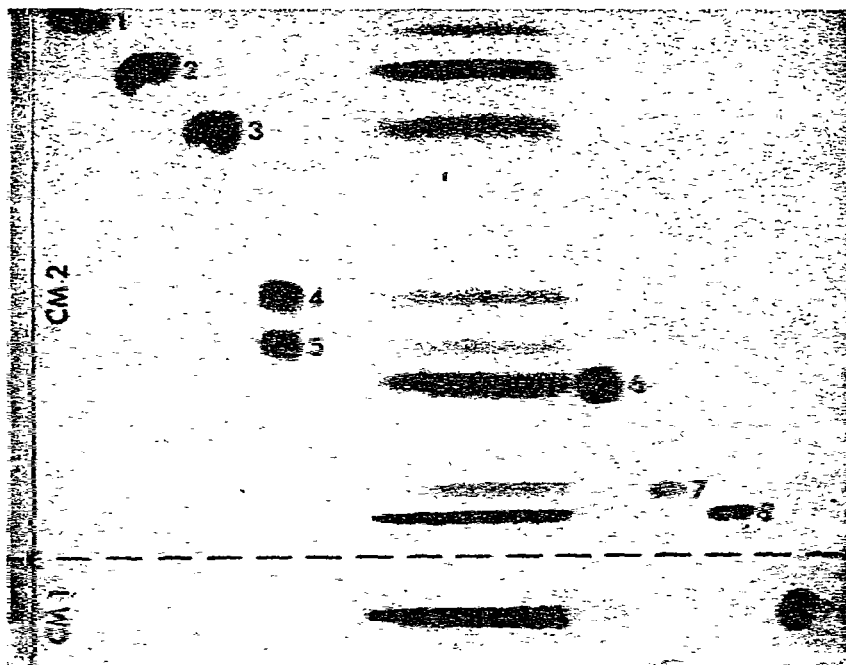


Fig. 3. Séparation d'un mélange de lipides de référence, après trois migrations successives, avec des témoins de squalène (1), de palmitate de cholestérol (2), de triglycérides (3), de 1,2 et 1,3 diglycérides (4 et 5), de cholestérol (6), d'acides gras (7), de monoglycérides (8) et de phospholipides (9).

gomyéline), les acides gras (palmitique, stéarique, oléique), la monopalmitine, la tripalmitine, le cholestérol et deux de ses esters (stéarate, oléate) sont des produits Fluka (Buchs, Suisse); la dipalmitine et le palmitate de cholestérol proviennent de la firme Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.) et le squalène de l'A.E.C. (Commentry, France). En ce qui concerne les témoins radioactifs, le [ $^{14}\text{C}$ ]cholestérol a été fourni par le C.E.A. (Saclay, France) et le palmitate de cholestérol a été réalisé par synthèse dans notre laboratoire de l'I.N.S.E.R.M., à partir du [ $^{14}\text{C}$ ]cholestérol et de l'acide palmitique inactif. Quant aux autres produits utilisés, sulfate de sodium anhydre, silice G type 60, solvants d'extraction et de chromatographie, ce sont tous des produits Merck (Darmstadt, R.F.A.).

#### *Extraction des lipides*

Après broyage du foie total en présence de sulfate de sodium anhydre et obtention d'un mélange homogène et pulvérulent, l'extraction des lipides hépatiques est réalisée en continu (Extracteur BBS standard; Verre et Technique, Arcueil, France), pendant 13 h, sur une prise d'essai de ce mélange, correspondant exactement à un gramme de foie. Une étude en fonction du temps a montré que le rendement d'extraction était maximal à partir de 12 h; en conséquence, nous avons fixé la durée d'extraction à 13 h, ce qui laisse une marge de sécurité suffisante.

Pour le sérum, la radioactivité étant nettement plus faible, la totalité de l'échantillon (2-5 ml) a été soumise à l'extraction, après trituration avec une quantité suffisante de sulfate de sodium anhydre.

Le solvant d'extraction est celui de la méthode de Folch<sup>16</sup>, constitué de deux parties de chloroforme pour une partie de méthanol. Les extraits sont évaporés à l'étuve entre 30° et 40° et chromatographiés rapidement, après reprise du résidu par 5 ml du même solvant.

A l'aide de lipides de référence, nous avons vérifié que l'extraction était totale pour toutes les fractions lipidiques et qu'aucune hydrolyse des esters du cholestérol, des glycérides et des phospholipides n'intervenait au cours des diverses opérations.

#### *Préparation des couches minces*

Les couches minces de 250  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, étalées sur des plaques de verre de 20  $\times$  20 cm, sont préparées à l'aide d'un étaleur original<sup>12-15</sup>, permettant la juxtaposition, sur la même plaque, de deux couches de nature différente. La première, qui s'étend sur 3 cm et sur laquelle est située la ligne de dépôt, est à base de silice G imbibée d'une solution 0.4 N d'hydroxyde de sodium, dans les proportions de 11 g pour 20 ml. La seconde couche, qui occupe les 17 cm restant, est constituée uniquement par de la silice G. Les plaques sont séchées et conservées sous vide.

#### *Chromatographie des extraits*

Le dépôt linéaire d'une quantité d'extrait de l'ordre de 1.5 ml est effectué sur une largeur de 8 cm et à une distance de 1.5 cm du bord de la plaque, à l'aide d'un appareil automatique (Autoliner 75; Desaga). Si cet appareil présente l'avantage de permettre la réalisation de dépôts réguliers, il n'est pas possible, en revanche, d'obtenir des dépôts de volume constant. Cet inconvénient, pour une large part, ne nous a pas permis d'exprimer nos résultats en activité absolue.

Effectuée sur 14 cm avec le solvant I, la première chromatographie donne une bonne séparation du cholestérol et des diglycérides. Les triglycérides, les esters du cholestérol et les hydrocarbures, qui migrent pratiquement ensemble avec le front du solvant I, sont séparés par le système de solvants II; cette seconde migration a lieu sur toute la longueur de la plaque. La dernière chromatographie, effectuée seulement sur les quatre premiers centimètres avec le solvant III, sépare les phospholipides, qui restent sur la ligne de dépôt, les monoglycérides et les acides gras libres.

#### *Révélation et comptage*

Les chromatogrammes sont révélés par exposition aux vapeurs d'iode. Il s'agit d'un procédé de révélation non spécifique, qui colore en jaune les différentes classes de lipides. Cette coloration étant très fugace, les spots colorés sont rapidement délimités, afin de pouvoir être ensuite facilement prélevés par grattage, à l'aide d'une mince spatule en inox.

Sur le plan qualitatif, les chromatogrammes des extraits lipidiques radioactifs ont été également soumis à l'autoradiographie, qui nécessite une durée d'exposition d'environ un mois, compte tenu de l'activité moyenne des échantillons.

Sur le plan quantitatif, les échantillons obtenus lors de la récupération des fractions lipidiques sont dispersés au sein d'un mélange constitué par 5 ml d'eau distillée et 15 ml d'Instagel (Packard, Paris, France), dans des flacons en polyéthylène (Réf. 33-27, pour appareil Mark I; Dannatt, Paris, France). Le comptage s'effectue en scintillation liquide sur l'appareil Mark I (Nuclear-Chicago, Des Plaines, Ill.,

U.S.A.). La correction de "quenching" est effectuée par la méthode du standard externe et les résultats sont exprimés en dpm<sup>17</sup>. Le volume d'extrait déposé n'étant pas rigoureusement constant d'une opération à l'autre et étant données en outre les variations d'incorporation du précurseur marqué, très importantes d'un animal à l'autre, l'activité des différentes fractions lipidiques a été exprimée en activité relative par rapport à l'activité totale du dépôt.

## RÉSULTATS

En comparant le chromatogramme du mélange des lipides de référence (Fig. 3) avec celui d'un extrait lipidique, dont la Fig. 4 représente l'autoradiographie, on peut observer deux différences essentielles.

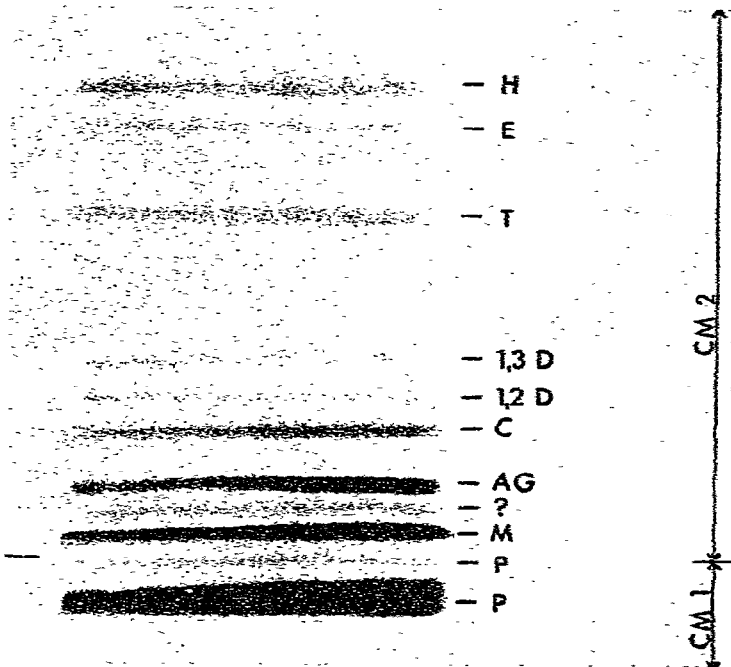


Fig. 4. Autoradiographie du chromatogramme d'un extrait hépatique, obtenu après trois migrations successives sur couches minces juxtaposées. Les symboles, caractérisant chacune des fractions lipidiques, sont identiques à ceux de la Fig. 1.

La première réside dans la dissociation des phospholipides de l'extrait lipidique en deux spots distincts, alors que les constituants du mélange de référence, à savoir lécithine et sphingomyéline, ne sont pas différenciés. L'identification de ces deux spots de phospholipides est confirmée à la fois par la méthode de révélation de Goswami et Frey<sup>18</sup> et par la présence de phosphore dans les fractions récupérées, après minéralisation.

La seconde différence observée concerne l'existence d'un spot supplémentaire entre les monoglycérides et les acides gras, visible sur l'autoradiogramme de l'extrait

lipidique et préalablement révélé par l'exposition aux vapeurs d'iode. La nature des constituants de ce spot n'a pu encore être déterminée, mais il est évident qu'il rend plus difficile la récupération quantitative des deux fractions qui l'entourent et peut être une cause d'erreur dans la mesure de leurs activités respectives.

Le contrôle de la reproductibilité de la méthode a porté sur l'ensemble des opérations effectuées sur une partie aliquote de foie, à savoir: extraction des lipides, reprise du résidu, chromatographies, récupération des spots par grattage et comptage par scintillation liquide. Pour ce faire, nous avons renouvelé l'ensemble de ces opérations sur plusieurs échantillons d'un même foie. En ce qui concerne les fractions d'activité élevée, les résultats sont reproductibles à environ 1% près; par contre, cette reproductibilité devient beaucoup moins satisfaisante pour les fractions de faible activité. Ceci provient des erreurs inhérentes au comptage, qui atteignent des valeurs relatives élevées, pour des activités de quelques centaines de dpm, comme c'est souvent le cas dans nos expériences. En effet, la fluctuation statistique due au comptage est proportionnelle à la racine carrée du nombre de dpm,  $n$  (écart type  $\sigma = \sqrt{n}$ ).

L'erreur relative globale, portant sur l'ensemble des opérations et l'erreur relative maximale due au comptage ont été calculées pour trois fractions lipidiques d'activités très différentes: les phospholipides d'activité élevée, le cholestérol d'activité moyenne et les esters du cholestérol de faible activité (Tableau I). Elles soulignent la part importante du comptage dans la reproductibilité de la méthode, qui ne peut donc être jugée valablement, que sur les fractions de forte activité, pour lesquelles l'erreur de comptage reste faible.

TABLEAU I

## REPRODUCTIBILITÉ DE LA METHODE CALCULÉE POUR TROIS FRACTIONS LIPIDIQUES

<i>Fraction</i>	<i>Activité (dpm)</i>	<i>Erreur relative globale (%)</i>	<i>Erreur relative maximale (%)</i>
Phospholipides	28 000	1.4	1.2
Cholestérol	2000	4.7	4.4
Esters du cholestérol	200	15	14.9

## RÉSUMÉ

Au cours d'une étude sur l'incorporation de précurseurs marqués par  $^{14}\text{C}$  dans les lipides d'origine biologique, nous avons été amenés à mettre au point une méthode de séparation quantitative des diverses fractions lipidiques, fondée sur trois chromatographies successives sur couches minces juxtaposées. La première couche mince, sur laquelle est déposé l'extrait lipidique, est constituée par de la silice G, imbibée d'une solution d'hydroxyde de sodium. La seconde couche mince se compose uniquement de silice G.

Pour les trois migrations unidimensionnelles successivement mises en oeuvre, les systèmes de solvants suivants ont été utilisés: ether-hexane-benzène (55:30:15), hexane-benzène (80:20), et éther-benzène-acide acétique (62:20:18). Les fractions sont récupérées et leur comptage effectué en scintillation liquide. La reproductibilité, portant sur l'ensemble des opérations, est discutée.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. K. Carroll, *J. Lipid Res.*, 2 (1961) 135.
- 2 A. H. Duthie et H. V. Atherton, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 319.
- 3 J. A. French et D. W. Andersen, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 133.
- 4 J. L. Hojnacki et S. C. Smith, *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 365.
- 5 T. F. Kelley, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 456.
- 6 M. Kimura, T. Arima, H. Tasiro, K. Yamada, E. Minakawa, S. Wanbu et Y. Mizuguchi, *Radioisotopes*, 17 (1968) 391.
- 7 F. Kunz, *Biochim. Biophys. Acta*, 296 (1973) 331.
- 8 M. J. Manners, D. E. Kidder et P. M. Parsons, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 276.
- 9 T. L. Sallee et G. M. Adams, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 545.
- 10 V. P. Skipski, J. J. Good, M. Barclay et R. B. Reggio, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 10.
- 11 J. J. Biezenski, W. Pomerance et J. Goodman, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 148.
- 12 J. A. Berger, G. Meyniel, P. Blanquet et J. Petit, *C.R. Acad. Sci.*, 257 (1963) 1534.
- 13 J. A. Berger, G. Meyniel et J. Petit, *Bull. Soc. Chim.*, (1964) 3179.
- 14 J. A. Berger, G. Meyniel et J. Petit, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 190.
- 15 J. Petit, *Thèse doctorat pharmacie (État)*, Université de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, 1965.
- 16 J. Folch, M. Lees et S. G. H. Sloane, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497.
- 17 J. Trignon et E. Thiriet, *J. Radioanal. Chem.*, 14 (1973) 105.
- 18 S. K. Goswami et C. F. Frey, *J. Chromatogr.*, 89 (1974) 87.