

Separazione cromatografica in colonna di fosfolipidi da tessuti con controllo continuo dell'effluente mediante un rivelatore a ionizzazione di fiamma

GUIDO GAVINA, LUCIA MORETTA, ROBERTO ANTONINI (*)
ALFREDO CANTAFORA (*) e FIORELLA MASCAGNA (**)

Laboratori di Biologia

Riassunto. — Si descrive un metodo per il frazionamento di fosfolipidi da tessuti mediante cromatografia in colonna di acido silicico. L'eluizione è ottenuta con un gradiente concavo di metanolo in cloroformio, realizzato mediante l'impiego di due pompe dosatrici, secondo lo schema riportato in una precedente nota. L'effluente è controllato, in maniera continua, mediante l'invio di una aliquota attraverso un rivelatore a ionizzazione di fiamma.

I fosfolipidi di vari tessuti di ratto (fegato, cervello, siero) e quelli da tuorlo d'uovo presentano profili caratteristici; i componenti dei picchi principali sono identificabili dai rispettivi volumi di eluzione.

L'analisi qualitativa dei componenti corrispondenti ai picchi è stata eseguita con metodiche cromatografiche in strato sottile, che, specie per i componenti presenti in minore qualità, si rivelano più vantaggiose che non quelle applicate sull'intero estratto.

Le corrispondenti analisi quantitative sono state eseguite mediante analisi colorimetrica del fosforo lipidico.

I risultati delle analisi sono riportate nella relativa tabella e nelle figure.

Summary (*Fractionation of phospholipids from tissues by means of column chromatography with continuous monitoring of the eluate by a flame ionization detector*). — A method is described for the fractionation of phospholipids from animal tissues by means of silicic acid column chroma-

(*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

(**) Ospite dei Laboratori di Biologia.

tography. Elution is performed with a concave gradient of methanol in chloroform, obtained by means of two metering pumps, following our scheme reported in a previous paper.

The effluent is monitored continuously by means of a hydrogen flame ionization detector, a part of the effluent being continuously drawn off.

The phospholipids from different rat tissues (liver, brain, serum) and those obtained from egg yolk show characteristic profiles: the components of the major peaks are identified by means of their elution volumes.

The qualitative analysis of the components corresponding to the different peaks is performed with bidimensional thin layer chromatographic procedures; the application of thin layer chromatographic methods after column fractionation results much more convenient than the direct thin layer chromatography on the whole extract, especially for low concentration components.

The quantitative analysis is performed on the single peaks by a colorimetric procedure for the lipid phosphorous.

The results of the analysis are reported in the table and the figures.

INTRODUZIONE

In un precedente lavoro (CAVINA *et al.*, 1969) abbiamo descritto una metodica per il frazionamento in classi dei lipidi neutri, mediante cromatografia in colonna di acido silicico. In questa metodica si impiegava per l'eluzione un gradiente di etere etilico in benzina, ottenuto secondo un nostro schema, e per quanto concerne l'analisi degli effluenti era stato applicato con successo un procedimento in continuo basato sull'impiego di un rivelatore a ionizzazione di fiamma. La metodica, ampiamente collaudata anche con successive applicazioni alla separazione di steroidi da lipidi (CAVINA *et al.*, 1971 *a; b*) si presta a separazioni sia di tipo analitico quantitativo che di tipo preparativo su piccola scala ed è caratterizzata da buona riproducibilità e da un buon grado di automatizzazione.

Questi reali vantaggi della metodica ci hanno spinto a studiare l'applicazione di un procedimento, dotato delle stesse positive caratteristiche, al frazionamento dei fosfolipidi nelle varie classi di strutture molecolari allo scopo di poter indagare, con lo stesso tipo di metodiche, il più ampio spettro possibile di componenti lipidici, polari e non, di un determinato tessuto.

È noto che metodiche cromatografiche in colonna per il frazionamento dei fosfolipidi sono state già da tempo descritte da HANAHAN, DITTMER & WARASHINA (1957), da LEA, RHODES & STOLL (1955) e ampiamente passate in rassegna nel capitolo di ROUSER, KRITCHEWSKI & YAMAMOTO (1967) in *Lipid Chromatographic Analysis*; solo poche tuttavia possono dirsi soddisfa-

centemente risolutive ed automatizzabili nel contempo (NELSON, 1967; HOELZL WALLACH & NORDBY, 1963) per cui la risoluzione di questo problema presenta sempre un notevole interesse.

Si deve aggiungere che, secondo la nostra ed altrui esperienza, è preferibile applicare le metodiche di cromatografia in strato sottile, specie quelle bidimensionali, a frazioni del totale dei fosfolipidi, precedentemente separate mediante cromatografia in colonna. Questo procedimento consente di identificare con maggiore sicurezza le varie classi di composti fosfolipidici, e ciò è tanto più utile per i componenti presenti in minori quantità.

Descriviamo infine nel presente lavoro alcune applicazioni della metodica da noi studiata al frazionamento di fosfolipidi da tessuti di ratto, riportando i risultati ottenuti.

PARTE SPERIMENTALE

Preparazione degli estratti lipidici.

Per la preparazione degli estratti contenenti i lipidi totali dei tessuti è stato seguito il metodo di FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957) dopo omogeneizzazione del tessuto in *blendor*. Sono stati così preparati estratti da fegato, siero e cervello di ratti alimentati con le diete basali ed aterogene, impiegate da ANGELICO *et al.* (1970) nelle esperienze sugli effetti dei differenti carboidrati e del contenuto lipidico della dieta sul quadro lipidico del siero, del fegato e dell'aorta.

Con la stessa tecnica è stato preparato un estratto contenente i lipidi dal tuorlo d'uovo fresco.

Gli estratti in coloroformio-metanolo 2:1, contenevano in 20 ml i lipidi totali di 1 g di tessuto: il contenuto veniva determinato per pesata con microbilancia Cahn, con la tecnica in precedenza descritta (CAVINA *et al.*, 1969). I fosfolipidi venivano determinati mediante analisi del fosforo lipidico con il micrometodo di BARTLETT (1959) modificato da MARINETTI (1962) e moltiplicazione del valore ottenuto per il fattore 25.

Solventi e materiali per la cromatografia in colonna.

Coloroformio e metanolo per analisi, bidistillati. Acido silicico. Bio-Rad 325 mesh per la cromatografia dei lipidi secondo Hirsch ed Ahrens, condizionato per il contenuto in acqua come descritto da CAVINA *et al.* (1969).

Colonne per cromatografia.

Sono state impiegate colonne in vetro LKB, tipo 4.200, diametro 6 mm, lunghezza 30 cm. Le connessioni fra le colonne e le altre parti dell'apparecchiatura sono state realizzate mediante tubi in teflon del diametro esterno di 1/16" (1,58 mm). Le colonne sono state riempite con 5 g circa di acido

silicico, impaccandole a secco con l'aiuto di un vibratore. Veniva poi introdotto coloroformio, al flusso di 1 ml/min per 1 ora o più fino a scomparsa di bolle d'aria dall'adsorbente.

Preparazione dei campioni per le analisi e loro introduzione in colonna.

Opportune aliquote degli estratti, preparati secondo CAVINA *et al.* (1969), venivano concentrate in corrente di azoto e riprese con cloroformio, in modo da avere in 1 ml circa 0,8 mg di fosforo lipidico (pari a circa 20 mg di fosfolipidi), accompagnato da quantità variabili di lipidi neutri secondo la natura dell'estratto. Il campione prelevato con siringa Hamilton da 1 ml, veniva quantitativamente introdotto in colonna attraverso un apposito iniettore.

Sistema di alimentazione della colonna.

Questo sistema è stato descritto in dettaglio da CAVINA *et al.* (1969); le condizioni operative per il gradiente sono riportate nelle leggende delle figure.

Analisi degli eluati.

Una parte dell'effluente dalla colonna veniva inviata in continuo ad un Liquid Chromatography Detector, Barber & Colman, mod. 5400, con rivelatore a ionizzazione di fiamma. Le condizioni del Liquid Chromatography Detector (LCD) erano quelle riportate da CAVINA *et al.* (1969); il rapporto di *splitting* al rivelatore era 8% oppure 4% del volume totale in uscita dalla colonna, a seconda che la portata R_2 fosse 1 oppure 2 ml/min.

Per quanto riguarda la procedura per il controllo dei volumi eluiti nel corso della cromatografia e per il calcolo delle quantità presenti nell'eluato, tenendo conto del volume splittato, si rimanda a quanto descritto nel lavoro di CAVINA *et al.* (1969).

La determinazione del fosforo lipidico nelle raccolte delle frazioni corrispondenti ai vari picchi è stata eseguita con il metodo in precedenza citato (BARTLETT, 1959, modificato da MARINETTI, 1962). In alcuni casi è stata effettuata la determinazione del residuo totale adottando la microtecnica descritta da CAVINA *et al.* (1969). La verifica dell'identità e della purezza dei componenti presenti nelle varie raccolte è stata eseguita mediante cromatografia su strato sottile.

Solventi e materiali per la cromatografia in strato sottile.

1) Lastre di cm 20×20 , preparate con silica gel H Merck, spessore 0.25 mm, attivate in stufa a 110°C per 30 min.

2) Solventi. Si usavano le seguenti miscele:

- a) etere di petrolio-etere etilico-acido acetico . . . 70:30:1 v/v
- b) cloroformio-metanolo-acido acetico-acqua . . . 65:25:8:4 v/v
- c) cloroformio-metanolo-ammoniaca al 25% . . . 70:30:5 v/v
- d) cloroformio-acetone-acido acetico-metanolo-acqua 50:20:10:10:5 v/v

3) Reattivi per il riconoscimento. La rivelazione dei vari componenti si effettuava con i seguenti reattivi:

- a) vapori di iodio per tutte le classi di lipidi;
- b) acido solforico concentrato diluito 1:1 con acqua, impiegato come descritto da ANGELELLI *et al.* (1966);
- c) ninidrina, preparata ed impiegata come descritto da ANGELELLI *et al.* (1966);
- d) bleu di molibdeno, preparato ed impiegato come descritto da DITTMER & LESTER (1964);
- e) reattivo all'orcinolo, preparato ed usato come descritto da SVENNERHOLM (1956).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi qualitativa

La tecnica descritta nel presente lavoro consente delle soddisfacenti separazioni, tenendo conto soprattutto che è stato necessario rispettare in egual misura le esigenze di praticità d'impiego e di risoluzione. I risultati migliori sono stati ottenuti con una colonna di 30 cm di lunghezza e con una portata dell'eluente di 1 ml/min. Con alcuni estratti, tipo quello di fegato, è stato possibile realizzare un compromesso tempo-risoluzione che meriterebbe ulteriore approfondimento.

Le Fig. 1 e 2 mostrano il frazionamento dei componenti fosfolipidici da fegato di ratto come ottenuto nelle due differenti condizioni di flusso.

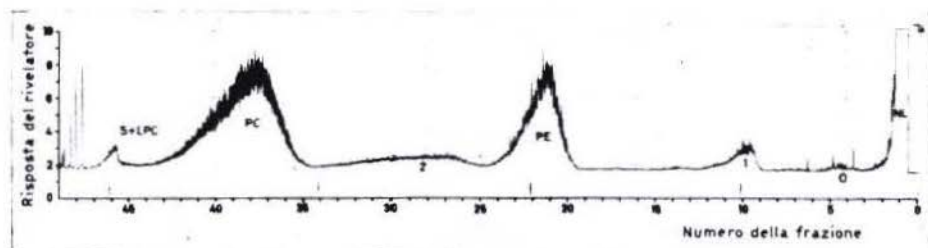


Fig. 1. — Cromatogramma di estratto lipidico da fegato di ratto alimentato con dieta basale, quantità 33,5 mg, fosforo lipidico 800 μ g. Colonna di diametro 6 mm, altezza 300 mm, caricata con 4,8 g di acido silicico. Sensibilità del rivelatore 3×10^{-10} A. Gradiente concavo $P = 1/4$, $C_R = 100\%$ di metanolo, 87 ml; $C_M = 100\%$ cloroformio, 348 ml + 20 ml di pregradiente. Flusso attraverso la colonna 1 ml/min; rapporto di ripartizione rivelatore/totale dell'effluente 8/100. Velocità della carta 6"/h. Picchi: NL) lipidi neutri; O) piccole quantità di lipidi neutri e probabili ac. grassi; 1) difosfatidil glicerolo e tracce di glicolipidi; PE) fosfatidiletanolammina; 2) zona comprendente fosfatidilinositolo, fosfatidilserina e lisofosfatidiletanolammina; PC) fosfatidilcolina; S + LPC) sfingomieline e lisofosfatidilcolina non ben separate ed impure per fosfatidilcolina.

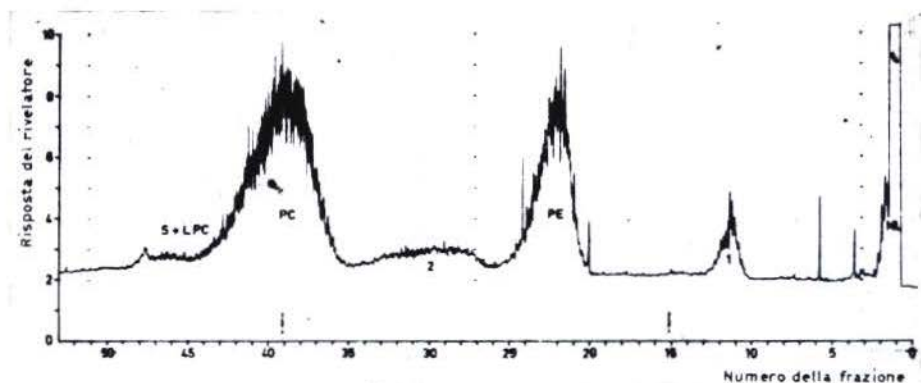


Fig. 2. — Cromatogramma di estratto lipidico da fegato di ratto alimentato con dieta basale, stesse quantità della Fig. 1, stesse condizioni della Fig. 1, eccetto il flusso attraverso la colonna portato a 2 ml/min e rapporto di ripartizione rivelatore/ totale dell'effluente 4/100. Picchi: come in Fig. 1.

Dall'esame dei due cromatogrammi si rileva la presenza di sei picchi ben definiti e di un leggero rialzo compreso fra i NL ed il picco 1; si richiama inoltre l'attenzione sul fatto che i volumi di ritenzione si sono mantenuti costanti alle differenti portate dell'effluente.

Per quanto concerne l'identificazione e la caratterizzazione dei vari picchi si può osservare che in questi due cromatogrammi, come anche in tutti quelli relativi ad estratti di organi e tessuti diversi, si riscontra un picco che esce sempre fuori scala, a piccolissimo volume di ritenzione, contrassegnato nelle figure dalle lettere NL; si è accertato che esso contiene tutte le classi dei lipidi neutri.

Per quanto riguarda la raccolta X_1 (picco 0), l'esame in cromatografia su strato sottile e l'assenza di fosforo all'analisi colorimetrica indicano la presenza in piccole quantità di lipidi neutri e probabilmente di acidi grassi liberi.

La raccolta GL+DPG+PA (picco 1), che rappresenta circa il 4,7% del fosforo lipidico caricato in colonna, è risultata essere essenzialmente costituita da difosfatidilglicerolo; nelle nostre prove non abbiamo riscontrato diretta evidenza di acido fosfatidico nel fegato di ratto. Questo fosfolipide sembra essere contenuto nei PL epatici secondo HAWTHORNE (1959), tuttavia SKIPSKI, PETERSON & BARCLAY (1964) e BIEZENSKI (1967) avevano considerato l'acido fosfatidico come costituente, assieme al DPG, della frazione più mobile in cromatografia su strato sottile, ma senza darne diretta dimostrazione della presenza negli estratti: ciò può essere dovuto ai valori molto piccoli del contenuto in questo fosfolipide. Per quanto riguarda il contenuto in fosfolipidi della frazione, è da notare che i nostri valori sono compresi entro i limiti trovati dagli AA. precedentemente citati (HAWTH-

ORNE, 1959; SKIPSKI, PETERSON & BARCLAY, 1964; BIEZENSKI, 1967), che erano pari al 3-5% del fosforo lipidico totale. Accanto a questo lipide fosforato si è accertata la presenza in quantità molto piccole di glicolipidi: ciò in accordo con quanto trovato da SKIPSKI, SMOLOWE & BARCLAY (1967).

Il picco contrassegnato dalle lettere PE, in questo come negli altri cromatogrammi, è relativo alla fosfatidiletanolammina. Negli estratti di fegato tale picco è ben definito e di rilevante entità, rappresentando il 23% circa dei fosfolipidi iniettati; l'esame in strato sottile mostra un'elevata purezza della sostanza.

La zona contrassegnata con il n. 2 (raccolta PS+PI+LPE), cui corrisponde un modesto ma ampio rialzo del cromatogramma, rappresenta circa l'8-10% del fosforo lipidico totale; mediante analisi cromatografica su strato sottile bidimensionale è stato possibile riscontrare sicuramente la presenza di fosfatidilserina, fosfatidilinositolo e lisofosfatidiletanolammina, come mostrato nella Fig. 3. I nostri dati qualitativi e quantitativi sono in accordo con quanto riportato da altri AA. (SKIPSKI, PETERSON & BARCLAY, 1964; BIEZENSKI, 1967; PARKE & PETERSON, 1965).

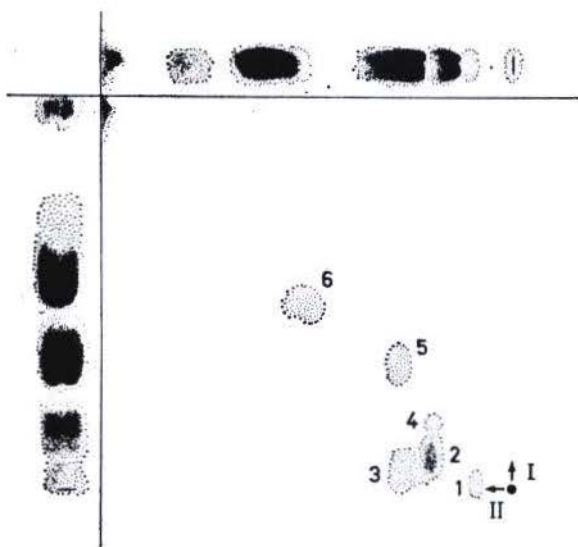


Fig. 3. — Cromatografia in strato sottile bidimensionale della zona contrassegnata con il n. 2 nel cromatogramma di Fig. 1 o 2, quantità 100 μ g di fosfolipidi, pari al 4% circa della raccolta. Solventi: *c*) e *d*) in successione bidimensionale. Sviluppo: ninidrina e bleu di molibdeno. Standard laterali dello stesso estratto lipidico di fegato di ratto, quantità 600 μ g di fosfolipidi. Macchie: 1) ninidrina positiva, molibdeno positiva; incognito; 2) fosfatidilinositolo; 3) fosfatidilserina; 4) lisofosfatidiletanolammina; 5) fosfatidilcolina in tracce; 6) fosfatidiletanolammina in tracce.

Nei cromatogrammi riportati il picco contrassegnato dalle lettere PC è relativo alla fosfatidilcolina; l'esame in strato sottile mostra una elevata purezza della sostanza; nell'estratto di fegato questo picco rappresenta il componente principale contenendo il 47-48% del fosforo lipidico totale.

L'ultimo picco presente nel cromatogramma costituisce il 5-7% del fosforo lipidico introdotto; l'esame in cromatografia su strato sottile ha rivelato la presenza di due componenti fosforati principali, che sono stati identificati come sfingomieline e lisofosfatidilcolina, accompagnati da modeste quantità di PC, purtroppo non ben risolti in queste condizioni sperimentali.

Nella successiva Fig. 4 è riportato un cromatogramma ottenuto da un estratto di lipidi di cervello di ratto, operando con un flusso di 1 ml/min, che in questo caso si è dimostrato da preferire. L'esame del cromatogramma rivela la presenza di nove zone importanti ai fini della identificazione; la successione dei picchi può essere commentata come segue.

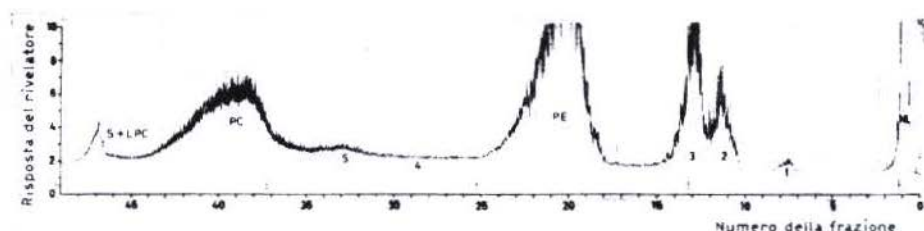


Fig. 4. — Cromatogramma di estratto lipidico da cervello di ratto alimentato con dieta basale; quantità cromatografata 40 mg di lipidi totali, 800 μ g di fosforo lipidico. Condizioni operative come in Fig. 1. Picchi: NL) lipidi neutri; 1) incognito, probabili tracce di ac. grassi liberi; 2) ac. fosfatidico e difosfatidilglicerolo, tracce di cerebrosidi; 3) cerebrosidi e tracce di acido fosfatidico; PE) fosfatidiletanolamina; solfati in modeste quantità; 4.5) zona 4, presenza di PI, PS, LPE; nella zona 5 si ha una prevalenza di PI; PC) fosfatidilcolina; S+LPC) sfingomieline e lisofosfatidilcolina non completamente risolti.

Nella raccolta X_1 (picco 1, ben definito ma di scarsa entità) l'analisi colorimetrica del fosforo dà risultati negativi e ciò è confermato dall'analisi in strato sottile, che ha rivelato la presenza di modeste quantità di un componente incognito e di probabili tracce di acidi grassi liberi.

La raccolta GL+DPG+PA (picchi 2 e 3) è costituita nel primo picco prevalentemente da fosfolipidi, che sono presenti per un 2% circa del fosforo caricato in colonna; l'esame cromatografico in strato sottile evidenzia la presenza, in quantità pressoché eguali, di acido fosfatidico e di difosfatidilglicerolo, mentre sono presenti in modeste quantità, a causa della cattiva risoluzione dal picco successivo, i glicolipidi.

Il picco 3 mostra di aver solo in tracce componenti fosforati (acido fosfatidico) essendo essenzialmente costituito da cerebrosidi. Questi, oltre che riconosciuti mediante cromatografia su strato sottile con la reazione con acido solforico ed orcinolo (SKIPSKI, SMOLOWE & BARCLAY, 1967), sono stati valutati mediante microdeterminazione ponderale (ROUSER, KRITCHEWSKY & YAMAMOTO, 1967) del residuo su parte della raccolta. In questa, il residuo totale è risultato pari al 9% circa dei lipidi polari cromatografati (lipidi totali meno i lipidi neutri).

Per quanto riguarda la raccolta PE essa rappresenta il componente più rilevante in questo estratto essendo il 38-39% del fosforo lipidico introdotto in colonna; l'analisi in strato sottile ha mostrato la presenza oltre che di fosfatidiletanolamina anche di un componente non fosforato da noi identificato come sulfatide.

La raccolta PI+PS+LPE che si presenta come un ampio rialzo, compreso fra i picchi PE e PC, contiene il 12% circa del fosforo lipidico ed alla

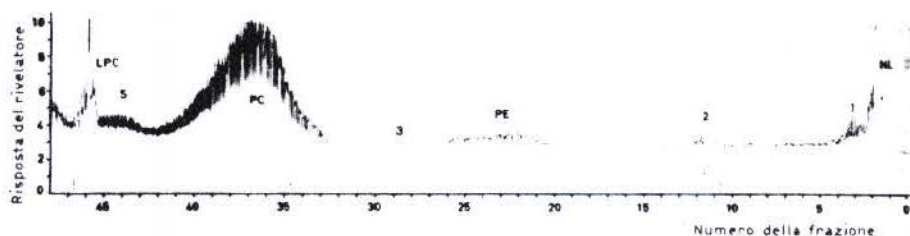


Fig. 5. — Cromatogramma di estratto lipidico da siero di ratto alimentato con dieta atterogena, quantità 146,97 mg. fosforo lipidico 800 μ g. Condizioni operative come in Fig. 1. Picchi: NL) lipidi neutri; 1) incognito; 2) glicolipidi in piccolissime quantità; PE) fosfatidiletanolamina; 3) zona PI+PS+LPE: fosfatidilinositolo ed in minor quantità lisofosfatidiletanolamina, assente la fosfatidilserina; S) sfingomieline impura; LPC) lisofosfatidilcolina impura per sfingomieline e fosfatidilcolina.

analisi cromatografica in strato sottile bidimensionale ha dimostrato di contenere fosfatidilserina (componente prevalente) accanto a fosfatidilinositolo e a lisofosfatidiletanolamina. Raccogliendo separatamente la parte iniziale e finale di queste zone, sembra che la prima contenga prevalentemente PI e la seconda PS+LPE.

Per le raccolte PC ed S+LPC valgono i commenti fatti per l'estratto di fegato.

La Fig. 5 mostra il cromatogramma di un estratto lipidico da siero di ratto. È di evidenza immediata il fatto che, contrariamente agli altri estratti, nelle prime zone del cromatogramma, ad eccezione del picco NL, che nel

grafico riportato è particolarmente rilevante in quanto si tratta di un estratto da siero di animali trattati a dieta aterogena, i picchi 2 e PE sono di scarsa entità. Per quanto riguarda la verifica quantitativa del fosforo lipidico vi è infatti un contenuto molto basso, pari al massimo allo 0,4% per la raccolta GL+DPG+PA e del 3-4% per il picco PE. Nella prima raccolta non è stato possibile individuare sicuramente alcuno dei componenti che di regola vi si possono trovare per i loro volumi di eluizione, ossia PA, DPG e glicolipidi, ciò in accordo con quanto trovato da BROEKHUYSE (1959) ed in contrasto con quel che risulta da un lavoro di ADAMS & SALLEE (1970), dove però vengono presentati solo dati qualitativi e le varie frazioni vengono identificate soltanto in base allo R_f .

Nella zona intermedia a PE e PC, corrispondente al 2% circa del fosforo lipidico totale, troviamo fosfatidilinositolo ed in minore quantità LPE, mentre sembra assente la fosfatidilserina, in accordo con quanto riportato da BROEKHUYSE (1969). Immediatamente dopo il picco PC troviamo l'accento di un picco non risolto dal successivo il cui contenuto in fosforo lipidico ammonta al 6-7% circa del totale, che all'esame cromatografico in strato sottile si mostra essenzialmente composto da sfingomieline.

Si trova per ultimo un picco piuttosto consistente, che all'esame in strato sottile risulta essere LPC impura per SP e PC, il cui contenuto in fosforo lipidico è pari al 21-25% del totale cromatografato.

La Fig. 6 mostra il cromatogramma di un estratto lipidico da tuorlo d'uovo, dal cui esame si rileva la presenza di sei picchi che ai fini dell'identificazione possono essere così commentati.

La raccolta X_1 (picco 1) è caratterizzata da valori pressochè nulli di fosforo lipidico e dalla presenza in cromatografia su strato sottile di piccole quantità di lipidi neutri, di acidi grassi liberi e di uno o due componenti non ben identificati.

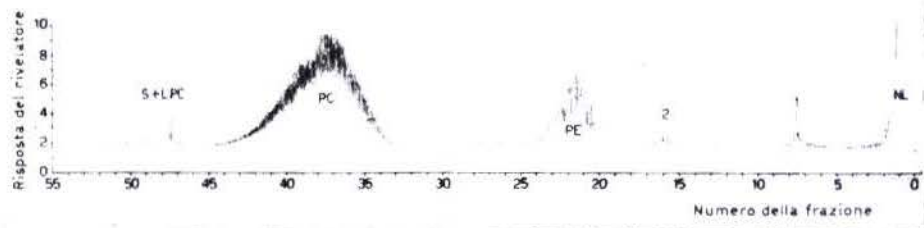


Fig. 6. — Cromatogramma di estratto lipidico da tuorlo d'uovo, quantità 80,81 mg, 800 μ g di fosforo lipidico. Condizioni operative come in Fig. 1. Picchi: 1) lipidi neutri; 2) difosfatidilglicerolo; PE) fosfatidiletanolamina; 3) zona PI+PS+LPE, fosfatidilinositolo e tracce di lisofosfatidiletanolamina, assente la fosfatidilserina; PC) fosfatidilcolina; S) sfingomieline impura.

La raccolta GL+DPG+PA (picco 2) presenta un modesto contenuto in fosforo lipidico cui corrisponde all'esame in strato sottile la presenza di un componente fosforato identificato per difosfatidilglicerolo.

Le raccolte PE e PC sono le più rilevanti in questo tipo di estratto e sono essenzialmente costituite da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, mentre la zona intermedia, pur non presentando un apprezzabile rialzo,

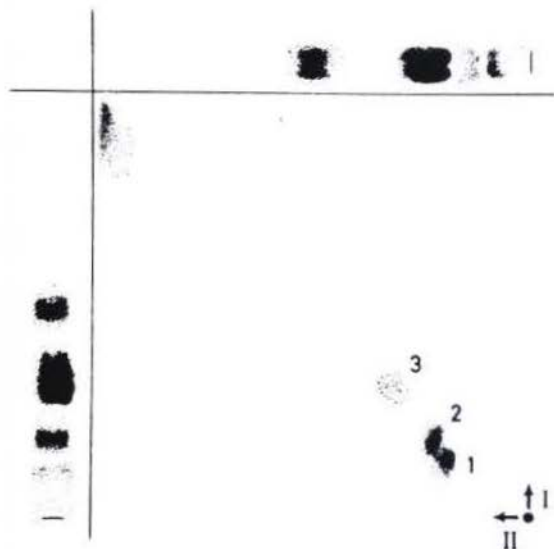


Fig. 7. — Cromatografia in strato sottile bidimensionale della zona compresa fra il picco PE e quello PC nel cromatogramma di Fig. 6, quantità 100 μg di fosfolipidi. Solventi c) e d) in successione bidimensionale. Sviluppo: ninidrina e bleu di molibdeno. Standard laterali dello stesso estratto lipidico di tuorlo d'uovo, quantità 500 μg di fosfolipidi. Macchie: 1) lisofosfatidiletanolamina; 2) fosfatidilinositolo; 3) fosfatidilcolina in tracce.

contiene un 3% di fosforo lipidico che all'esame in strato sottile risulta essere prevalentemente costituito da PI accompagnato da tracce di LPE; sembra assente la fosfatidilserina (Fig. 7).

L'ultimo picco è prevalentemente costituito da sfingomieline impura per fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina che si riscontra principalmente nelle ultime frazioni della cromatografia.

Analisi quantitativa

Nella Tab. 1 sono riportati i risultati di alcune analisi eseguite per controllare gli aspetti quantitativi del metodo proposto: le analisi dei differenti estratti sono state eseguite in doppio. I risultati possono ritenersi soddisfacenti per quanto riguarda la concordanza dei valori in doppio ed i relativi recuperi e soprattutto per quanto riguarda la caratterizzazione dei diversi tipi di estratti.

TABELLA 1

Risultati delle analisi cromatografiche di estratti lipidici da vari tessuti

Per ogni raccolta è stato determinato il contenuto in fosforo lipidico: per ciascuna di queste e per il valore sommatorio totale la quantità di fosforo trovato è stata espressa come percentuale del fosforo lipidico introdotto in colonna.

CAMPIONE	QUANTITÀ CROMATOGRAFATA		RACCOLTE										VALORE TOTALE RECUPERATO
	mg (*)	µg P	NL	N ₁	GL ± DPG ± PA	PE	PI + PS + LPE	PC	S + LPC	LPC	50-55		
			1-3	4-8	9-12	13-18	19-25	27-34	35-44	45-49			
Lipidi totali da fegato di ratto (dieta basale)	40,71	888,0	0,0	0,0	—	20,6	9,8	48,4	5,6	—	89,0		
	35,36	800,1	0,0	0,1	4,8 (**)	23,4	7,7	16,8	6,8	—	89,6		
Lipidi totali da cervello di ratto (dieta basale)	34,90	800,1	0,0	0,0	—	37,4	11,7	36,7	7,5	—	95,5		
	34,90	800,1	0,0	0,6	2,2 (**)	30,7	12,2	39,0	6,3	0,8	100,3		
Lipidi totali da siero di ratto (dieta aterog.)	100,00	610,0	0,1	0,0	0,4 (**)	3,3	2,2	53,5	6,0	25,0	90,5		
	146,97	800,2	0,1	0,0	0,0	4,5	0,6	55,1	7,9	21,1	89,4		
Lipidi totali da tuorlo di uovo	80,81	800,0	0,1	0,1	1,1 (**)	17,0	2,2	63,2	3,3	2,0	90,0		
	80,81	800,0	0,1	0,0	1,2 (**)	16,1	1,8	64,5	5,1	2,7	90,5		

(*) Peso dell'estratto lipidico totale; (**) Valore complessivo dovuto al tipo di profilo cromatografico.

Circa i recuperi si può fare l'ipotesi per i valori meno soddisfacenti (89-90%) di una relativa perdita per scodamento del componente principale, in questo caso la fosfatidilcolina, che viene eluita piuttosto tardi: tale perdita quindi sarebbe tanto più grande quanto maggiore è la percentuale di questo componente nell'estratto. Alla luce di questa ipotesi appaiono giustificabili gli elevati valori del recupero negli estratti da cervello, perchè questa volta il componente principale non è la fosfatidilcolina bensì la fosfatidiletanolamina.

CONCLUSIONI

Per quanto concerne il frazionamento dei fosfolipidi, i risultati riportati nella Tab. I mostrano in termini numerici le differenze fra i diversi tipi di estratto; i differenti profili inoltre rendono spesso possibile l'identificazione a prima vista di questi, consentendo di evidenziare eventuali variazioni di composizione. Proseguendo nell'esame dei vantaggi e degli svantaggi del metodo si può far osservare che:

a) per quanto riguarda il procedimento cromatografico in generale, sono confermate le caratteristiche di semplicità, parziale automatizzazione e riproducibilità dei risultati (in particolare, costanza dei volumi di eluzione) che erano evidenziate nelle precedenti applicazioni di un procedimento di questo tipo (CAVINA *et al.*, 1969; CAVINA *et al.*, 1971 a; b);

b) per quanto riguarda l'applicazione al frazionamento dei fosfolipidi nelle varie classi di strutture molecolari si può dire che a parte il caso della incompleta separazione della sfingomielina dalla parte finale della fosfatidilcolina ed in parte dalla lisofosfatidilcolina, si hanno le seguenti possibilità di separazione:

1) lipidi neutri dai fosfolipidi. In ogni caso è possibile introdurre in colonna l'estratto dei lipidi totali, anche quando presenti in forte eccesso, senza disturbare le separazioni dei lipidi polari, diversamente da ciò che può avvenire in cromatografia su strato sottile;

2) glicolipidi dai lipidi neutri e dai principali fosfolipidi. Risulta invece incompleta la separazione da difosfatidilglicerolo ed ancor più da acido fosfatidico;

3) fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina dagli altri componenti. Il controllo di purezza sui picchi principali eseguito mediante cromatografia su strato sottile, in condizioni atte al confronto, li mostra infatti praticamente senza contaminazioni;

4) fosfatidilinositolo, fosfatidilserina e lisofosfatidiletanolamina, che danno luogo ad un unico picco, dai componenti principali. In questo caso si ottiene la separazione della fosfatidilserina dalla fosfatidiletanolamina, cosa che secondo l'opinione di SLOMIAMY & HOROWITZ (1970) non è generalmente ottenibile su semplici colonne di acido silicico e nel contesto di una più generale separazione;

c) infine, caratteristica importante della cromatografia in colonna, gli eluati, corrispondenti ai vari picchi principali del cromatogramma, possono essere ottenuti in quantità sufficienti per eseguire analisi quantitative replicate e con diversi procedimenti. È il caso delle analisi mediante cromatografia in strato sottile bidimensionale che è stato illustrato con alcuni esempi nel corso del presente lavoro.

Ricevuto il 29 maggio 1972.

Accettato il 4 luglio 1972.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, G. M. & T. L. SALLEE, 1970. *J. Chromatog.*, **49**, 552.
- ANGELELLI, L., C. CAVINA, G. MORETTI & P. SINISCALCHI, 1966. *Farmaco, Ed. Prat.*, **21**, 493.
- ANGELICO, R., G. GASPARRINI, G. CAVINA & L. MORETTA, 1968. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **4**, 234.
- ANGELICO, R., L. MORETTA, G. IMPROTA & P. L. IALONGO, 1970. *Nutr. Metab.*, **12**, 179.
- BARTLETT, G. R., 1959. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466.
- BIEZENSKI, J. J., 1967. *J. Lipid Res.* **8**, 409.
- BROEKHUYGSE, R. M., 1969. *Clin. Chim. Acta*, **23**, 457.
- CAVINA, G., G. MORETTI, A. MOLLIKA & R. ANTONINI, 1971. *Farmaco, Ed. Prat.*, **26**, 275.
- CAVINA, G., G. MORETTI, A. MOLLIKA & R. ANTONINI, 1971. *J. Chromatog.*, **60**, 179.
- CAVINA, G., G. MORETTI, A. MOLLIKA, L. MORETTA & P. SINISCALCHI, 1969. *J. Chromatog.*, **44**, 493.
- DITTMER, J. L., R. L. LESTER, 1964. *J. Lipid Res.* **5**, 126.
- FOLCH, J., M. LEES & G. H. SLOANE-STANLEY, 1957. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
- HANAHAN, J., J. C. DITTMER & E. WARASHINA, 1957. *J. Biol. Chem.*, **228**, 685.
- HAWTHORNE, J. N., 1959. *J. Lipid Res.*, **1**, 255.
- HOELZL, WALLACH D. F. & G. L. NORDBY, 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 188.
- LEA, C. H., D. N. RHODES & R. D. STOLL, 1955. *Biochem. J.*, **60**, 353.
- MARINETTI, G. V., 1962. *Lipid Res.*, **3**, 1.
- NELSON, G. J., 1967. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 86.
- PARKE, F., & R. F. PETERSON, 1965. *J. Lipid Res.* **6**, 455.
- ROUSER, G. G. KRITCHEWSKY & A. YAMAMOTO, in: G. V. MARINETTI, *Lipid Chromatographic Analysis*, M. Dekker Inc., New York 1967, p. 99-161.
- SKIPSKI, V. P., R. F. PETERSON & M. BARCLAY, 1964. *Biochem. J.* **90**, 374.
- SKIPSKI, V. P., A. F. SMOLOWE & M. BARCLAY, 1967. *J. Lipid Res.*, **8**, 295.
- SLOMIAMY, B. L., & M. I. HOROWITZ, 1970. *J. Chromatog.*, **49**, 455.
- SVENNERHOLM L., 1956. *J. Neurochem.*, **1**, 42.