

**Separazione dei lipidi in classi mediante cromatografia su strato sottile. Frazionamento e determinazione dei lipidi del fegato e del siero di ratto**

GUIDO CAVINA, MARIA TERESA AJELLO (\*), GIUSEPPE CASPARRINI (\*),  
ANDREINA D'ANTONA (\*), LUCIA MORETTA E GABRIELLA MORETTI

*Laboratori di Biologia*

**Riassunto.** — Si descrive lo studio dei lipidi del fegato e del siero di ratto normale, digiuno da 12 ore, effettuato mediante cromatografia su strato sottile.

Vengono riportate le tecniche di cromatografia su strato sottile per il frazionamento dei lipidi in classi e per confronto, quelle di cromatografia su colonna sia analitiche che preparative.

Mediante cromatografia su strato sottile è possibile determinare la composizione di un grasso di organo in trigliceridi, fosfolipidi, colesterolo, digliceridi, esteri del colesterolo, operando su quantità di lipidi totali comprese fra 3 e 15 mg.; la precisione del metodo è documentata dai bassi valori della deviazione standard.

Questa tecnica consente anche applicazioni micropreparative, in quanto permette di effettuare la determinazione gas-cromatografica degli acidi grassi nelle singole classi di lipidi frazionate su strato sottile.

**Summary** (*Separation of lipids according to classes of compounds by means of thin layer chromatography. Fractionation and determination of liver and serum lipids of normal rats*). — A detailed thin layer chromatography method is described for fractionation and determination of rat liver and serum lipids.

The tissue was extracted with the chloroform-methanol procedure of FOLCH, LESS & SLOANE STANLEY (1957), and the serum with the analogous procedure of SPERRY & BRAND (1955); the total amount of lipids was determined by weight on small amounts of the extracts. Thin layer fractionation of lipids into classes was carried out on silica gel G Merck (0.250-1 mm thin) according to the lipidic load (3-20 mg); the solvent system was hexane-ethyl ether-acetic acid 70:30:1.

(\*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

Separation was obtained of the spots corresponding to cholesterol esters, triglycerides, fatty acids, cholesterol plus diglycerides, phospholipids; detection was obtained with dichlorofluorescein and the visualised areas were eluted with proper solvents using either a warm extractor (Kumagawa type) or a small sintered glass filter as a percolator. The main components were determined as follows: phospholipids with the FISKE & SUBBAROW (1930) method; cholesterol and its esters by means of the HANEL & DAM (1955) method; tri- and di-glycerides with the VAN HANDEL & ZILVERSMITH (1957) method; and free fatty acids using the DOLE (1956) method.

The results were cross-checked by comparing them with those obtained on silicic acid columns following the HIRSCH & AHRENS (1958) method, or by simplified techniques also on Florisil.

The mean values obtained for liver lipids (7 normal rats starved for 12 hours) were as follows: total lipids (mg/g tissue) 57.7; phospholipids 32.6; triglycerides 11.3; diglycerides 1.5; cholesterol 2.6; cholesterol esters 1.0 (Tables 1, 2, 3 and 5). For serum lipids (mean value of 3 pools, mg/100 ml): total lipids 351; phospholipids 108; triglycerides 47.8; diglycerides 5.5; cholesterol 12.5; cholesterol esters 114.8; free fatty acids 30.5 (Tables 4 and 6).

The precision of the method was checked by repeating the analysis of the same extract 4 times: the mean values (mg/100 mg of total lipids)  $\pm$  standard deviation were as follows (liver lipids of female rats fed on a triglyceride rich diet): phospholipids  $42.45 \pm 0.59$ ; triglycerides  $37.93 \pm 0.31$ ; diglycerides  $1.39 \pm 0.02$ ; cholesterol  $3.72 \pm 0.02$ ; cholesterol esters  $1.12 \pm 0.03$ .

Finally the preparation of fatty acid methyl esters and the gas chromatographic analysis is described on aliquots of from 2 to 15 mg of the eluates from the fractions separated by thin layer chromatography, using the method of STOFFEL, CHU & AHRENS (1959).

---

Le nostre ricerche sul fenomeno della iperlipemia nel ratto irradiato con un'unica dose di 1000 r (ANGELICO *et al.*, 1963) ci hanno condotto ad esaminare e ad applicare alcune delle più recenti tecniche descritte per il frazionamento dei lipidi in classi, in particolare la cromatografia su strato sottile.

Alcuni aspetti qualitativi e quantitativi del problema analitico sono stati trattati da diversi Autori.

MALINS & MANGOLD (1960), MANGOLD (1961), MANGOLD & TUNA (1961) si sono interessati al frazionamento di miscele complesse di lipidi mediante cromatografia su strato sottile. WEICHER (1959) ha descritto applicazioni di tali tecniche alle analisi di lipidi ematici. Separazioni qualitative di lipidi e fosfolipidi del siero e di lipidi del cervello e loro prodotti di demolizione sono state eseguite rispettivamente da VOGEL (1960), DOIZAKI & ZIEVE (1962; 1963) e da JATZKEWITZ & MEHL (1960).

Prevalentemente quantitative o preparative sono le ricerche di GOLD-RICK & HIRSCH (1963) che hanno descritto un dispositivo per il recupero dei lipidi dagli strati e quelle di VACIKOVA, FELT & MALIKOVA (1962) che hanno descritto il frazionamento dei lipidi del siero mediante cromatografia su strato sottile di allumina applicata senza legante, seguito da determinazioni colorimetriche. Analogo problema è stato risolto da KRELL & HASHIM (1963) mediante cromatografia su strato sottile di acido silicico con determinazione di trigliceridi mediante spettrofotometria I. R.

Esteri del colesterolo sono stati frazionati da ZOLLNER, WOLFRAM & AMIN (1962) e valutati densitometricamente dopo trattamento con tricloruro di antimonio.

Applicazioni preparative della cromatografia su strato sottile, specialmente in connessione con la cromatografia gas-liquido, sono descritte da DOBIASOVA (1963), da NICHAMAN *et al.* (1963) e da SNYDER & CRESS (1963); mentre ROUSER *et al.* (1963) descrivono ampie, reciproche integrazioni di cromatografie su colonna e cromatografie su strato sottile di acido silicico nell'analisi di lipidi e fosfolipidi.

Lo studio quantitativo mediante gas-cromatografia della composizione degli acidi grassi dei lipidi del siero di suino frazionati mediante cromatografia su strato sottile è riportato in un'interessante ricerca di BOWYER *et al.* (1963).

Scopo della nostra ricerca era soprattutto lo studio delle applicazioni quantitative della cromatografia su strato sottile. Abbiamo messo a punto una metodica di frazionamento con una unica cromatografia dei lipidi che ne consente la successiva determinazione di modeste quantità, quali quelle contenute in alcuni ml di siero di ratto, con semplici determinazioni colorimetriche per il colesterolo ed i suoi esteri, per i tri- e i di-gliceridi e i fosfolipidi; il frazionamento cromatografico ci ha permesso di applicare successivamente la tecnica gas-cromatografica all'analisi degli acidi grassi presenti nelle varie frazioni, ottenute da 10-20 mg di lipidi totali.

Abbiamo inoltre confrontato i risultati ottenuti con quelli forniti da altre tecniche, quali la cromatografia su colonna su micro- e macro-scala nonché da determinazioni dirette, quando queste erano sufficientemente specifiche.

Le metodiche da noi eseguite ed i nostri risultati sono qui di seguito riportati.

## MATERIALI E METODI

### MATERIALI

*Animali.* — Ratti Long-Evans del peso di 250 g, alimentati con dieta standard di laboratorio, sono tenuti a digiuno per 12 ore indi sacrificati per decapitazione. Si procede poi al prelievo del sangue e del fegato.

*Preparazione delle lastre per cromatografia su strato sottile.* — Per la preparazione delle lastre di cm  $20 \times 20$  si usa Silica Gel G Merck (in precedenza lavato con cloroformio in Soxhlet per 12 ore) in strati di 0,250 mm e più fino ad 1 mm, secondo il quantitativo dell'estratto da analizzare. (Per semplici cromatografie di riconoscimento può usarsi Silica Gel G non lavato). Le lastre si attivano per 30' a  $105^{\circ}$ .

*Sistemi di solventi per la cromatografia su strato sottile.* — Si usano le seguenti miscele :

- 1) benzina per cromatografia (p. e.  $65^{\circ}$ ) - etere etilico anidro esente da perossidi - acido acetico, 80: 20: 1;
- 2) benzina per cromatografia (p. e.  $65^{\circ}$ ) - etere etilico anidro esente da perossidi - acido acetico, 70: 30: 1;
- 3) cloroformio-metanolo-acqua, 75: 15: 2;
- 4) benzina per cromatografia (p. e.  $65^{\circ}$ ) - etere etilico - metanolo, 80:20:5 (SNYDER & CRESS, 1963).

*Materiali e solventi per la cromatografia su colonna.* — Si impiegano per le colonne:

- 1) Florisil attivato (a  $650^{\circ}$ ), addizionato di 5 g di acqua per 100 g di prodotto; si conserva in vaso chiuso, o 2) acido silicico per cromatografia Mallinckrodt 100 mesh, attivato per 4 ore a  $125^{\circ}$ ; si conserva in vaso chiuso.

Come solventi sono impiegati:

cloroformio per analisi con 0,5 % di etanolo; metanolo per analisi; benzina per cromatografia (p. e.  $65^{\circ}$ ); etere etilico privo di perossidi.

*Reattivi per il riconoscimento.* — La rivelazione dei vari componenti si effettua con i seguenti reattivi:

- 1) Vapori di iodio.
- 2) Acido solforico concentrato o in miscela 1:1 con etanolo, a spruzzo, seguito da riscaldamento in stufa a  $120^{\circ}$  fino a comparsa delle colorazioni caratteristiche: rosso-viola che vira al bleu per il colesterolo ed esteri; bruno che vira al grigio per gli altri costituenti.
- 3) Soluzione alcoolica di 2', 7'- diclorofluoresceina allo 0,2 % o allo 0,05 % del suo sale sodico (si neutralizzano 50 ml di soluzione allo 0,2 % con 0,25 ml circa di NaOH N/1) con applicazione a spruzzo: fluorescenza azzurro-bruna su fondo giallo-verde.
- 4) Soluzione alcoolica allo 0,5 % di rodamina B in etanolo, con applicazione a spruzzo: colorazione e fluorescenza arancio, su fondo rosa.
- 5) Soluzione alcoolica al 5 % di acido fosfomolibdico; applicazione a spruzzo, seguita da riscaldamento a  $80-90^{\circ}$  per 5': colorazione azzurra su

fondo giallo chiaro; i vapori di ammoniaca attenuano la colorazione del fondo (HONNEGER & FREYVOGEL, 1963).

6) Soluzione di tricloruro di antimonio al 20 % in cloruro di etilene con il 2 % di cloruro di acetile; applicazione a spruzzo seguita da riscaldamento a 100-110° per 5-10': colorazione rosso vivo per il colesterolo ed i suoi esteri, azzurro, grigio per gli altri costituenti.

*Composti di riferimento.* — Come sostanze di riferimento si impiegano colesterolo, colesterolo stearato, tripalmitina, tristearina, trioleina, acido palmitico, glicerolo monostearato e glicerolo distearato.

Questi due ultimi composti sono stati preparati in laboratorio per frazionamento cromatografico di un campione commerciale di glicerolo monostearato con la tecnica descritta da QUINLIN & WEISER (1958). Analogamente sono stati purificati campioni di trioleina e tristearina. Tutte le soluzioni hanno la concentrazione di 2 mg/ml in cloroformio, sono conservabili a lungo in frigorifero e, per la cromatografia, si impiegano nella quantità di 20-40  $\mu$ l.

#### METODI DI ESTRAZIONE

*Estrazione dei lipidi epatici.* — Per l'estrazione dei lipidi epatici viene usata la tecnica di FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957).

Il tessuto è omogeneizzato per 5 minuti a 10.000 giri con un omogenizzatore M.S.E. con miscela cloroformio-metanolo 2:1 nel rapporto di un grammo di tessuto (considerando 1 g = ad 1 volume) e 17 ml di miscela: dopo l'omogeneizzazione si porta il volume a 20 volte quello del tessuto prelevato. Dopo i lavaggi l'estratto viene portato al volume di partenza con cloroformio-metanolo 2:1 in cilindro graduato e conservato in frigorifero.

*Estrazione dei lipidi dal siero.* — L'estrazione dei lipidi viene eseguita con la tecnica di SPERRY & BRAND (1955) su aliquote di 1-2 ml con complessivi 25 volumi di cloroformio-metanolo 2:1 per 1 volume di siero, lavorando a caldo.

*Estrazione diretta dei trigliceridi dal siero.* — Si applica il metodo di Van Handel e Zilversmith qui modificato (VAN HANDEL & ZILVERSMITH, 1957; VAN HANDEL, 1961). Si versano goccia a goccia 0,5 ml di siero in una provetta con tappo a smeriglio contenente 2 g di Florisil attivato e portato al 5 % di acqua come descritto precedentemente ed addizionato in precedenza di 1 ml di cloroformio. Si mescola con una bacchettina di vetro sino ad ottenere una polvere scorrevole, poi si aggiungono 9 ml di cloroformio, si agita per 10 minuti e si lascia a sè per una notte. Si filtra su carta sgrassata e si preleva una opportuna aliquota (0,5 - 1,0 ml) per la determinazione colorimetrica dei trigliceridi.

## METODI DI DETERMINAZIONE PONDERALE

*Determinazione ponderale dei lipidi epatici.* — 20 ml di estratto in cloroformio-metanolo 2:1 si trasferiscono in un palloncino da vuoto da 100 ml in precedenza tarato e mantenuto a peso costante in essiccatore su  $P_2O_5$ . Si evapora il solvente in evaporatore rotante a pressione ridotta in atmosfera di  $N_2$ ; il palloncino viene successivamente portato a peso costante in essiccatore sotto vuoto su  $P_2O_5$ . Tutte le pesate vanno eseguite nelle medesime condizioni equilibrando termicamente ed idrometricamente i recipienti per lo stesso tempo prima della pesata (5 minuti); un recipiente vuoto viene analogamente pesato per il controllo della tara.

*Determinazione ponderale dei lipidi del siero.* — L'estratto lavato, circa 40 ml, corrispondenti a 2 ml di siero, viene trasferito quantitativamente in palloncino da vuoto da 100 ml; si evaporano quindi i solventi in evaporatore rotante a pressione ridotta in atmosfera di  $N_2$ .

Il residuo viene ripreso con sei porzioni da 1 ml di cloroformio-metanolo 2:1, travasando ogni aliquota in un palloncino da 10 ml del peso medio di 8-10 g, mediante un dispositivo di aspirazione munito di setto filtrante G 3, in accordo con la metodica descritta da SPERRY (1954).

La soluzione filtrata viene portata a secco in corrente di  $N_2$  ed il palloncino viene portato a peso costante tenendolo sotto vuoto per almeno 18 ore in un essiccatore nel quale è stato fatto un ripetuto lavaggio dell'ambiente con l'azoto per allontanare completamente l'ossigeno.

## FRAZIONAMENTO CROMATOGRAFICO DELL'ESTRATTO LIPIDICO.

*Cromatografia di riconoscimento.* — Si effettua su 200  $\mu$ g circa di estratto lipidico, in soluzione di 5-10 mg per ml di cloroformio o cloroformio-metanolo 2:1; deponendone 40-20  $\mu$ l su lastre di spessore 0,250 mm e procedendo poi al confronto con le sostanze di riferimento (vedi « Materiali »).

*Cromatografia analitica su strato sottile.* — Si effettua su di una aliquota di 10-20 mg di estratto lipidico totale, trasferito in una provettina in precedenza tarata. Si evapora con azoto il solvente, si controlla con pesata rapida l'ammontare del residuo e si riprende questo con 100-200  $\mu$ l di cloroformio per deporlo sulla lastra, lavando con piccole frazioni di solvente (50  $\mu$ l) per assicurare il trasferimento quantitativo. Si impiegano lastre di cm 20  $\times$  20, spessore di 1 mm, preparate con Silica Gel G lavato con cloroformio; la deposizione si effettua secondo una banda di cm 8-10 circa di lunghezza. A lato si dispongono gli standard per i necessari confronti. La cromatografia si effettua con il solvente 2; si rivelano poi i componenti con soluzione di diclorofluoresceina sale sodico allo 0,05 % in etanolo proteggendo la zona

dalla partenza fino a cm 1,5 (zona dei fosfolipidi) con una lastrina di vetro. Le bande a reazione positiva evidenziate alla luce U.V., vengono rimosse per raschiamento, trasferite in piccoli ditali da Soxhlet di mm  $16 \times 100$  ed estratte con un estrattore di tipo Kumagava (che consente di mantenere la sostanza di estrazione alla temperatura del solvente) nelle seguenti condizioni: la zona dei fosfolipidi per 3 ore con 50 ml di cloroformio-metanolo 2:1; quelle del colesterolo, dei trigliceridi e degli esteri del colesterolo per 3 ore con 50 ml di etere etilico privo di perossidi.

Gli estratti si portano a secco in evaporatore rotante sotto pressione ridotta ed i residui si riprendono con 10 ml di cloroformio, ad eccezione dei fosfolipidi, che si riprendono con 10 ml di metanolo. Su queste soluzioni vengono eseguite le determinazioni colorimetriche.

*Separazione cromatografica breve dei trigliceridi dai fosfolipidi su piccola colonna di Florisil o di acido silicico.* — Si prepara una colonnina cromatografica del diam. di 8 mm, con 2 g di Florisil, trattenuto da lana di vetro; si lava con cloroformio e vi si fanno passare 10-20 mg di estratto lipidico sciolti in 5 ml di cloroformio. Si fanno passare poi 45 ml di cloroformio, raccogliendo alla fine l'eluato in un pallone da 50 ml. In tale modo vengono trattenuti sull'adsorbente di natura basica i fosfolipidi e gli acidi grassi (CARROL, 1961). Per la successiva determinazione si diluisce con cloroformio fino ad ottenere una concentrazione presunta in trigliceridi di circa 40  $\mu\text{g/ml}$ .

Si può anche adottare una colonnina per cromatografia del diam. 8 mm con 1 g di acido silicico (MALINS & MANGOLD, 1960). Questa si lava con cloroformio, vi si fanno passare 10-20 mg di estratto lipidico sciolto in 5 ml di cloroformio, poi ancora cloroformio, fino ad avere un eluato di 50 ml che si raccoglie in un pallone tarato, ed infine 25 ml di metanolo per raccogliere la frazione fosfolipidica. Questa cromatografia consente l'analisi sia della frazione trigliceridi (in maniera del tutto analoga a quanto precisato per la cromatografia su Florisil) che della frazione fosfolipidi.

*Cromatografia su colonna di acido silicico.* — Si esegue sugli estratti contenenti i lipidi totali secondo la metodica di HIRSCH & AHRENS (1958), modificata nei seguenti punti:

1) L'acido silicico (Mallinckrodt setacciato, raccogliendo la frazione di 300 mesh) viene attivato per 4 ore a  $125^\circ$  (secondo BÖTTCHER *et al.*, 1959).

Si determina il contenuto di acqua, che è dell'1,5 % circa, e lo si porta al 9,5 % per aggiunta di acqua mescolando con cura e conservando poi la polvere in recipiente chiuso entro un essiccatore su gel di silice.

2) Si impiega una colonna in vetro del diametro di mm 11, lunghezza mm 200, adatta a contenere 8 g di acido silicico.

3) La colonna termina alle due estremità con 2 coni a smeriglio  $\varnothing$  14 mm nei quali si adattano due coni in Teflon che assicurano una perfetta

tenuta della colonna e consentono le connessioni con le tubazioni di alimentazione e di uscita della colonna che sono in Teflon  $\varnothing$  1/16".

4) L'alimentazione è assicurata da un pallone da 1000 ml a 3 colli, con giunti a smeriglio che portano rispettivamente un imbuto di carico per introdurre le varie miscele di solventi, la tubazione di alimentazione che conduce alla colonna e la tubazione connessa con un pressostato ad azoto che consente di mantenere una pressione costante e quindi una spinta costante del liquido attraverso la colonna.

5) La successione dei solventi ed i rispettivi volumi sono i seguenti: benzina con etere etilico alle concentrazioni progressive di: 1% (160 ml), 4% (140 ml), 8% (330 ml), 25% (120 ml), etere etilico (140 ml), metanolo (180 ml). Ogni frazione è di 10 ml (totale 107 frazioni).

6) Si portano a secco le singole frazioni, controllando a vista la presenza di un residuo; sui residui ripresi con cloroformio, si eseguono le determinazioni colorimetriche del colesterolo (ed esteri), dei gliceridi e del fosforo lipidico, impiegando le metodiche in precedenza descritte.

*Analisi mediante gas-cromatografia degli acidi grassi negli eluati della cromatografia su strato sottile.* — Gli eluati delle zone trigliceridi e fosfolipidi, ottenuti da una o più cromatografie analitiche eseguite su lastre di spessore da 1 mm (10-15 mg di lipidi totali di partenza, 2-2,5 mg di trigliceridi, 5-7 mg di fosfolipidi) vengono trasformati in esteri metilici con il procedimento di STOFFEL, CHU & AHRENS (1959), con l'aggiunta di idrochinone per prevenire l'ossidazione di acidi grassi non saturi.

Nello stesso modo si può operare sui lipidi totali, non frazionati per cromatografia; essi devono però subire una purificazione per sublimazione sotto vuoto spinto, purificazione non necessaria per le frazioni isolate dal cromatogramma, eccettuata quella degli esteri del colesterolo. In ogni caso la purezza degli esteri metilici degli acidi grassi è controllata mediante cromatografia su strato sottile.

L'analisi gas-cromatografica viene eseguita con un apparecchio Perkin Elmer modello 800, con colonne da 1/8", lunghe 2 metri, con riempimento di Chromosorb W silanizzato 60-80 mesh, col 20% di dietilene-glicole-succinato-poliestere, gas vettore azoto, con flusso di 20 ml al minuto, temperatura della colonna 150° iniziale con aumento programmato di 3,3°/minuto fino a 200°, rivelatore a ionizzazione di fiamma.

#### DETERMINAZIONI.

*Determinazione del fosforo lipidico.* — Si esegue con il metodo colorimetrico di FISKE & SUBBAROW (1930) dopo mineralizzazione del campione

secondo YOUMBURG (1930) sulle frazioni fosfolipidi, isolate nella cromatografia su strato sottile o su colonna, e sull'estratto lipidico *in toto*.

*Determinazione del colesterolo.* — Si esegue con il metodo di HANEL & DAM (1955) sulle frazioni colesterolo e colesterolo estere isolate per cromatografia su strato sottile o su colonna di acido silicico. Si può eseguire anche sulla frazione 1<sup>a</sup> (trigliceridi) delle cromatografie su piccola colonna di Florisil o di acido silicico e sull'insaponificabile dell'estratto lipidico o del siero.

*Saponificazione del siero e dell'estratto lipidico.* — In una provetta da 20-25 ml con tappo a smeriglio si introducono 0,5 ml di siero oppure un volume di estratto lipidico totale in cloroformio-metanolo 2 : 1, pari a 5-10 mg di lipidi totali; in questo caso si porta a secco il solvente con azoto.

Si aggiungono in rapida successione 2,5 ml di soluzione N/2 di KOH in etanolo di fresco preparata e 0,2 ml di soluzione di idrochinone allo 0,1 % in etanolo. Si riscalda a ricadere per 30' a 80°, si raffredda, si aggiungono 2,5 ml di acqua e si estrae con 10 ml di benzina, p. e. 65°, agitando per alcuni minuti.

Si aspira quantitativamente la fase organica in altra provetta con tappo a smeriglio e si ripete l'estrazione con 10 ml di benzina. Si riuniscono le fasi organiche nella seconda provetta, dove si lavano con 2 ml di acqua, centrifugando se necessario.

Si trasferiscono gli estratti in benzina in un palloncino tarato da 25 ml, portando a volume con il medesimo solvente.

Per la determinazione del colesterolo si prelevano aliquote di 5 ml che si portano a secco, riprendendo con 2 ml di cloroformio e operando come descritto nel metodo di HANEL & DAM (1955).

*Determinazione dei trigliceridi e dei digliceridi.* — Si esegue con il metodo di VAN HANDEL & ZILVERSMITH (1957) e VAN HANDEL (1961) sulla frazione trigliceridi e su quella del colesterolo che contiene anche i digliceridi, isolate per cromatografia su strato sottile, e su quelle ottenute da cromatografia su colonna di acido silicico.

Si esegue anche sulla frazione 1<sup>a</sup> (trigliceridi) delle cromatografie su piccola colonna di Florisil o di ac. silicico.

*Determinazione degli acidi grassi liberi.* — Si esegue con il metodo di DOLE (1956) sulla frazione acidi grassi liberi isolata dalla cromatografia su strato sottile o su colonna.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

*Lipidi di fegato di ratto.* — La Tab. 1 riporta i valori della composizione percentuale delle frazioni ottenute dai lipidi del fegato di ratto dopo separazione mediante cromatografia su strato sottile.

I lipidi epatici totali sono stati estratti mediante la tecnica di FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957) e conservati in soluzione in cloroformio-metanolo 2:1 in frigorifero per tutto il tempo necessario alle analisi, per prevenire le ossidazioni che possono avvenire nei lipidi conservati allo stato di pellicole secche come hanno osservato BÖTTCHER *et al.* (1959).

Su di una aliquota dell'estratto è stato determinato il valore del residuo lipidico riferendolo a 1 g di tessuto fresco. Gli animali erano stati tenuti a digiuno per 12 ore e sono stati sacrificati per decapitazione.

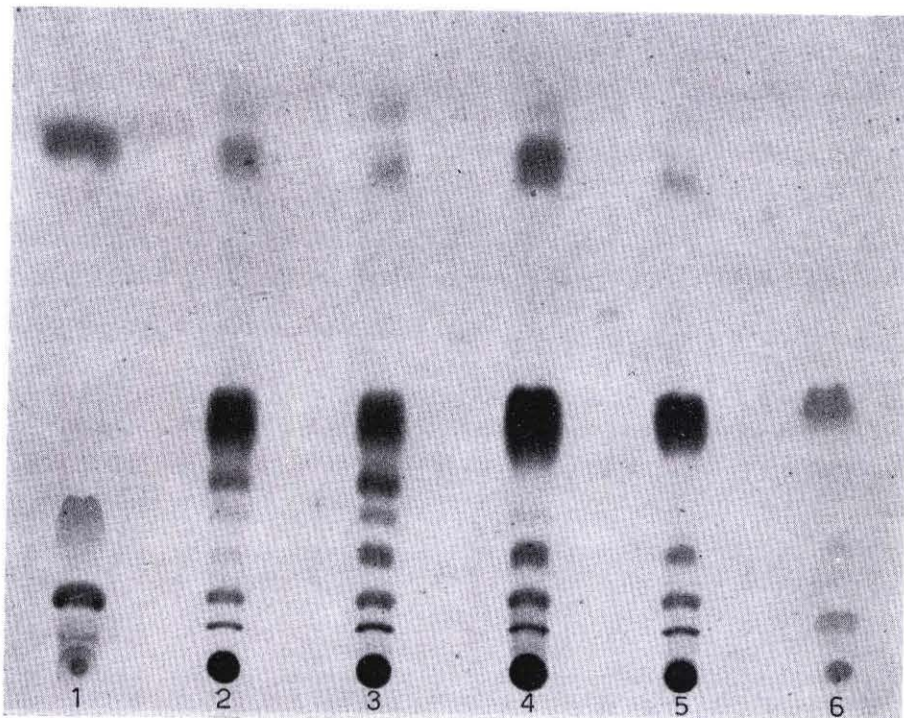


Fig. 1. — Cromatografia su strato sottile di lipidi totali di fegato di ratto. Solvente: benzina p. e. 65°-etere etilico-ac. acetico (80:20:1). Sviluppo: vapori di iodio. Dal basso in alto - 1: Standard di colesterolo, ac. palmitico, colesterolo stearato. 2-3-4-5: Lipidi totali di fegato di ratto: si osservano diversi componenti nella zona degli acidi grassi, assieme ai componenti identificabili dagli standard (fosfolipidi alla partenza). 6: Standard di glicerolo monostearato, glicerolo distearato, tripalmitina.

Per ogni estratto sono state eseguite due cromatografie (escluso l'estratto n. 5) che hanno dato risultati in generale in buono accordo: nella Tab. 1 sono riportati per confronto anche alcuni risultati ottenuti dalle analisi eseguite direttamente sugli estratti lipidici (fosfolipidi) e dopo sem-

TABELLA I.

## Analisi di lipidi epatici di ratto a digiuno da 12 ore

Estratto (N°)	Liquidi totali pes 1g tessuto fresco (mg)	Tipo della determinazione *	Quantità impiegate (mg)	Contenuto percentuale sul totale impiegato per l'analisi						Totale del recupero (%)
				fosfoli- pidi	trigli- ceridi	digli- ceridi	colesterolo			
							libero	esteri	totale	
1	57,4	Cromatografia su strato sottile	10,0	56,4	28,4	2,6	3,8	1,9	5,8	93,1
			10,0	56,4 <sup>a</sup>	30,0	2,4	4,1	2,2	6,4	95,1
2	68,9	Cromatografia su strato sottile	8,6	54,0 <sup>b</sup>	22,9	1,7	5,0	2,2	7,2	85,8
			8,6	53,2	23,2	1,6	4,7	2,1	6,8	84,8
		Analisi diretta	5,0	54,0	22,9 <sup>c</sup>	—	—	—	—	—
			10,0	55,6	23,3 <sup>d</sup>	—	—	—	—	—
3	63,2	Cromatografia su strato sottile	24,3	52,2	15,9	1,3	4,4	1,5	5,9	75,3
			16,2	55,0	17,3	1,2	4,4	1,7	6,2	79,6
		Analisi diretta	10,0	54,0	18,0 <sup>d</sup>	—	—	—	—	—
4	41,6	Cromatografia su strato sottile	15,2	57,8 <sup>b</sup>	15,9	1,1	5,6	1,6	7,2	82,0
			15,2	55,2	17,5	1,2	5,7	1,5	7,3	81,1
		Analisi diretta	10,0	57,8	18,9 <sup>d</sup>	—	—	—	—	—
			10,0	57,6 <sup>c</sup>	16,7 <sup>c</sup>	—	—	—	8,5 <sup>c</sup>	82,2
5	62,4	Cromatografia su strato sottile	16,8	52,6	25,3	1,2	4,1	2,1	6,2	85,3
			10,0	49,1 <sup>c</sup>	—	—	—	—	—	—
		Analisi diretta	10,0	55,5	—	—	—	—	—	—
6	59,7	Cromatografia su strato sottile	10,1	61,2	14,0	1,4	4,9	1,8	6,7	83,3
			10,0	65,8	16,7 <sup>d</sup>	—	—	—	—	—
		Analisi diretta	10,0	68,7 <sup>d</sup>	15,8 <sup>c</sup>	—	—	—	—	—
			10,1	65,8 <sup>b</sup>	14,2	1,4	4,8	1,9	6,8	88,1
		Cromatografia su colonna	59,7	67,6	12,8	0,8	4,2	0,7	4,9	89,2 <sup>e</sup>
7	51,1	Cromatografia su strato sottile	10,2	66,8	10,3	1,8	4,6	1,3	5,9	—
			10,2	64,7	11,0	1,8	4,6	1,1	5,7	83,2
		Analisi diretta	10,0	70,0	12,3 <sup>d</sup>	—	—	—	—	—
		Cromatografia su colonna	45,3	65,2	9,9	1,6	4,6	1,0	5,6	85,7 <sup>f</sup>

\* Alcune determinazioni sono state eseguite in parallelo mediante analisi diretta e cromatografia su colonna.

<sup>a</sup> Utilizzato il valore della cromatografia precedente; <sup>b</sup> utilizzato il valore dell'analisi diretta; <sup>c</sup> frazionamento su piccola colonna di acido silicico; <sup>d</sup> frazionamento su piccola colonna di Florisil; <sup>e</sup> acidi grassi liberi 1,43 monogliceridi 1,60, inclusi; <sup>f</sup> acidi grassi liberi 1,61 monogliceridi 1,83, inclusi.

plici frazionamenti in due gruppi: fosfolipidi e trigliceridi + altri costituenti degli estratti, eseguendo il frazionamento cromatografico su piccola colonna di acido silicico o di Florisil. Queste semplici metodiche sono state da noi allestite in dettaglio utilizzando le osservazioni di CARROLL (1961), SNYDER & CRESS (1963) e CARLSON & WADSTRÖM (1959), dopo una accurata messa a punto sperimentale.

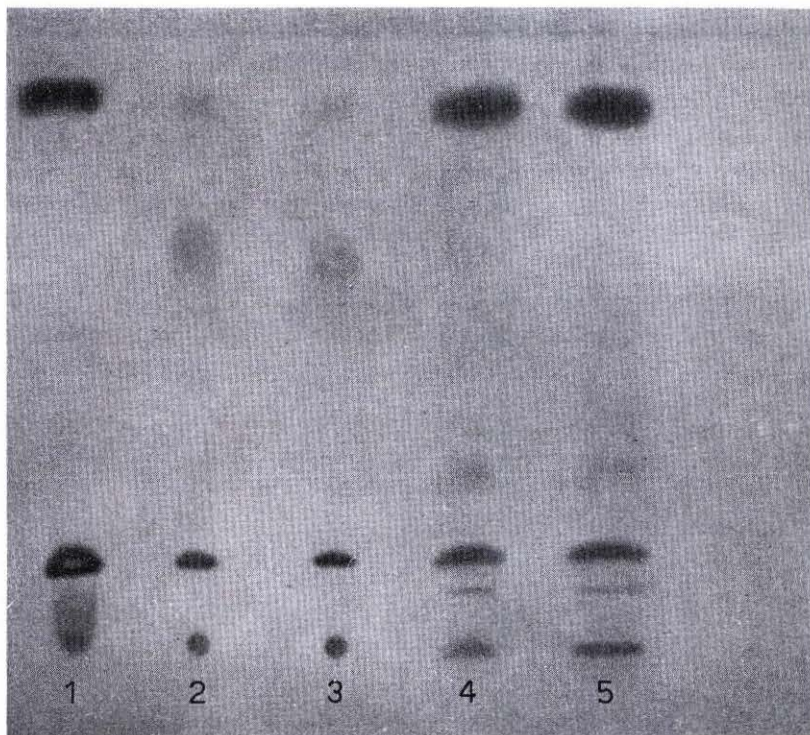


Fig. 2. — Cromatografia su strato sottile di lipidi totali di fegato e di siero di ratto. Solvente: benzina p. e. 65°-etere etilico-ac. acetico (70:30:1). Sviluppo: ac. fosfomolibdico. Dal basso in alto - 1: Standard di colesterolo e di colesterolo stearato. 2-3: Lipidi di fegato. 4-5: Lipidi di siero. Si osservano dalla partenza al fronte: fosfolipidi + monogliceridi alla partenza, digliceridi, colesterolo, ac. grassi liberi, trigliceridi, esteri del colesterolo.

Per quanto riguarda i valori dei fosfolipidi, si osserva un notevole accordo con quelli ottenuti per cromatografia su strato sottile, essendo le determinazioni basate sulla analisi del fosforo organico; anzi a questo proposito si può osservare che è possibile calcolare la composizione percentuale in fosfolipidi determinando il fosforo organico senza che sia necessario estrarre

lo strato contenente la zona fosfolipidi. Per i valori dei trigliceridi si osserva che i risultati delle analisi per cromatografia su piccola colonna sono di poco più elevati di quelli forniti dal frazionamento su strato sottile e questo può essere spiegato col fatto che la composizione della frazione ottenuta nella cromatografia su piccola colonna non è strettamente limitata ai trigliceridi ma comprende anche di- e mono-gliceridi.

Per gli estratti N° 6 e 7 viene riportata anche la composizione percentuale determinata mediante analisi per cromatografia su colonna, secondo la tecnica di HIRSCH & AHRENS (1958), da noi modificata per l'uso di una colonna di minori dimensioni con la raccolta di 107 frazioni circa da 10 ml ciascuna.

Con questa tecnica si ottiene un ulteriore frazionamento dei fosfolipidi che nel cromatogramma sono rappresentati da tre massimi corrispondenti a cefaline, lecitine e sfingomieline e si ottengono inoltre le frazioni

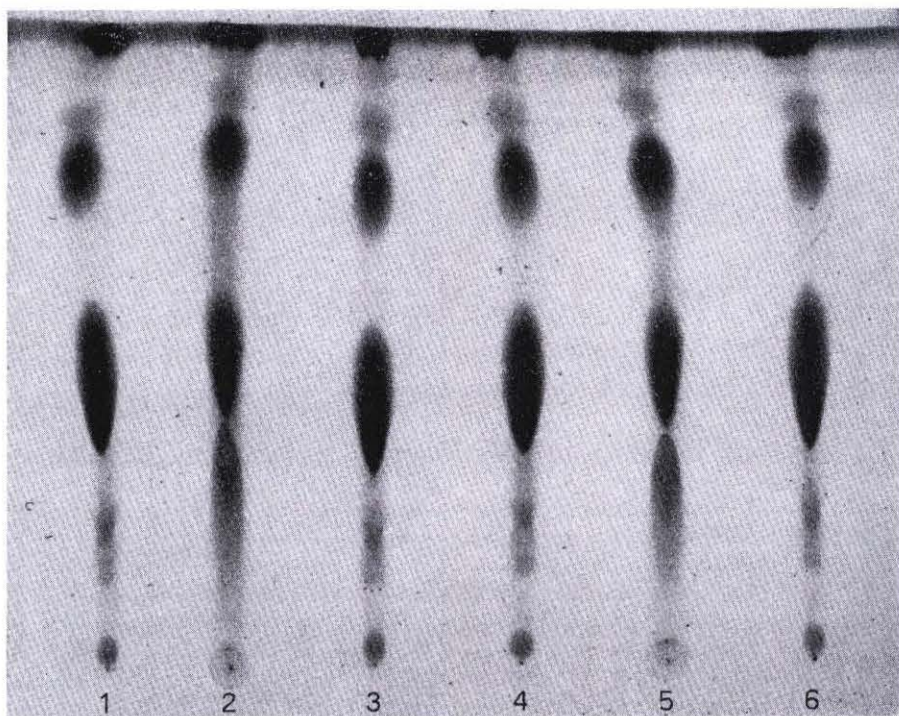


Fig. 3. — Cromatografia su strato sottile di lipidi totali di fegato di ratto a confronto con lipidi totali di tuorlo d'uovo. Solvente: cloroformio-metanolo-acqua (75:15:2). Sviluppo: ac. solforico. 1-3-4-6: Lipidi totali di tuorlo d'uovo dove dal basso in alto si notano: liolecitine, sfingomieline, lecitine, cefaline. 2-5: Lipidi di fegato di ratto.

TABELLA 2.

## Valori medi dei costituenti dei lipidi epatici di ratto a digiuno da 12 ore

Estratto (%)	LIPIDI epatici totali per 1 g di tessuto fresco (mg)		FOSFOLIPIDI		TRIGLICERIDI		DIGLICERIDI		COLESTEROLO LIBERO		ESTERI DEL COLESTEROLO		COLESTEROLO TOTALE		RECUPERO	
	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)	per 100 mg di lipidi	per 1 g di tessuto fresco (mg)
1	57,4	56,4	32,4	16,8	29,2	16,8	2,5	1,4	3,9	2,2	2,0	1,1	5,9	3,3	94,0	53,9
2	68,9	53,6	36,9	15,8	23,0	15,8	1,6	1,1	4,8	3,3	2,1	1,4	6,9	4,7	85,1	58,5
3	63,2	53,6	33,8	10,5	16,6	10,5	1,2	0,7	4,4	2,8	1,6	1,0	6,0	3,8	77,4	48,8
4	41,6	56,5	23,5	6,9	16,7	6,9	1,1	4,6	5,6	2,3	1,5	0,6	7,1	2,9	81,4	37,9
5	62,4	52,6	32,8	15,7	25,3	15,7	1,2	0,8	4,1	2,6	2,1	1,3	6,2	3,9	85,3	53,2
6	59,7	59,1	35,2	8,4	14,1	8,4	1,4	0,8	4,9	2,9	1,8	1,1	6,7	4,0	81,3	48,4
7	51,1	65,7	33,6	5,4	10,6	5,4	1,8	0,9	4,6	2,3	1,2	0,6	5,8	2,9	83,9	42,8
Valori medi *	57,7 ± 8,9	56,8 ± 4,5	32,6 ± 4,3	11,3 ± 4,7	19,3 ± 6,6	11,3 ± 4,7	1,5 ± 0,4	1,5 ± 1,4	4,6 ± 0,5	2,6 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,3	6,4 ± 0,5	3,6 ± 0,6	84,0 ± 5,1	49,0 ± 5,3

\* Per ogni valore è data la deviazione standard.

monogliceridi e acidi grassi liberi: le singole frazioni sono però meno pure, come abbiamo potuto controllare per cromatografia su strato sottile dei vari eluati; per gli altri costituenti i recuperi sono in accordo con quelli ottenuti con la più semplice tecnica di cromatografia su strato sottile (Fig. 1, 2, 3).

Nella Tab. 2 sono riportati i valori medi ottenuti dalle medie di due analisi di ciascun estratto: è stata ottenuta così la composizione media (su 7 estratti) relativa ai costituenti dei lipidi totali di fegato di ratto a digiuno da 12 ore, suddivisi nelle principali frazioni quali fosfolipidi, trigliceridi, digliceridi, colesterolo. I nostri valori sono in accordo con quelli ottenuti con tecniche differenti da COOK (1958) e da DUPONT & LEWIS (1963).

A completamento dei risultati riuniti nella Tab. 1, sono riportati nella Tab. 3 i risultati di una prova di analisi ripetuta quattro volte su uno stesso estratto: come si può osservare anche dai valori della deviazione standard, la concordanza tra i quattro valori di ciascuna analisi di fosfolipidi, di- e trigliceridi, colesterolo libero ed esterificato, è veramente notevole.

TABELLA 3.

Verifica della riproducibilità delle analisi dopo frazionamento  
mediante cromatografia su strato sottile \*

ANALISI N°	CONTENUTO PERCENTUALE SUL TOTALE IMPIEGATO PER L'ANALISI						RECUPERO %
	Fosfolipidi	Trigliceridi	Digliceridi	Colesterolo libero	Esteri del colesterolo	Colesterolo totale	
1	42,46	37,94	1,38	3,72	1,12	4,84	86,62
2	41,72	37,72	1,39	3,70	1,08	4,78	85,61
3	43,17	38,38	1,42	3,70	1,13	4,83	87,80
4	42,26	37,70	1,38	3,76	1,15	4,91	86,45
MEDIE **	42,45 ± 0,59	37,93 ± 0,31	1,39 ± 0,02	3,72 ± 0,02	1,12 ± 0,03	4,84 ± 0,01	86,62 ± 0,93

\* Lipidi da *pool* di fegato di ratto femmina a digiuno da 12 ore, mg 74,4 per grammo di tessuto fresco. Per ogni analisi sono stati impiegati mg 11,0.

\*\* Accanto alle medie sono riportate le deviazioni standard.

*Lipidi di siero di ratto.* — Nella Tab. 4 sono riportati parallelamente i valori della composizione, riferita a 100 mg di lipidi e a 100 ml di siero, per le frazioni ottenute dai lipidi totali del siero di ratto, mediante cromatografia su strato sottile. Sono stati preparati 3 *pool* di lipidi di siero di ratto e per ogni *pool* sono state eseguite da 2 a 4 analisi mediante cromatografia

su strato sottile, oltre le analisi dirette, analogamente a quanto precisato per i lipidi epatici.

In aggiunta ai fosfolipidi ed ai gliceridi totali è stato determinato sull'estratto lipidico il colesterolo totale dopo saponificazione; le determinazioni sono state ripetute sul siero come tale, impiegando per i fosfolipidi il metodo di YOUMBURG & YOUMBURG (1930), per i trigliceridi il metodo di VAN HANDEL & ZILVERSMITH (1957) e VAN HANDEL (1961) modificato per l'impiego di Florisil 60-100 mesh in luogo della zeolite e per il colesterolo il metodo di HANEL & DAM (1955) sull'insaponificabile di 0,5 ml di siero secondo la metodica descritta nella parte sperimentale.

Le analisi sono sufficientemente concordanti per il colesterolo totale e per i fosfolipidi mentre per i gliceridi totali, determinati sulla rispettiva frazione ottenuta nella cromatografia su piccola colonna di Florisil o di acido silicico, si ottengono valori più elevati di quelli ottenuti sulla frazione separata mediante cromatografia su strato sottile (fanno eccezione i gliceridi totali determinati direttamente sul siero con il metodo di Van Handel e Zilversmith modificato), analogamente a quanto osservato per i lipidi epatici.

Nelle cromatografie su strato sottile dei lipidi totali del siero (Fig. 2), le prove sono state eseguite su quantità di 12-14 mg, analogamente a quanto è stato fatto per i lipidi epatici, e parallelamente su quantità di 3,0-3,8 mg, pari a quelle contenute in 1 ml di siero: i risultati ottenuti nei due modi sono in perfetto accordo.

Abbiamo voluto anche confrontare l'estrazione a freddo, effettuata con l'aspiratore a setto filtrante (MATTEWS, PERERA & AGUILERA, 1962) già impiegato da noi nella cromatografia su strato sottile di steroidi, con quella a caldo, per estrazione con estrattori tipo Kumagawa: risulta dalle prove riportate nella Tabella 4 che l'estrazione a freddo dà valori costantemente inferiori a quelli ottenuti con l'estrazione a caldo.

I valori ottenuti per il siero sono in accordo con quelli di SWELL *et al.* (1961).

È da osservare infine che la diclorofluoresceina viene estratta in minima parte nella eluizione con etere e comunque non dà alcuna interferenza con le metodiche colorimetriche adottate.

*Analisi gas-cromatografica.* — Dopo le determinazioni colorimetriche effettuate nei modi descritti nella parte sperimentale, restano disponibili aliquote delle singole frazioni (ottenute da una o più cromatografie di 10-15 mg di lipidi totali) sufficienti ad eseguire analisi gas-cromatografiche degli acidi grassi. Gli esteri metilici sono stati preparati per transesterificazione con acido cloridrico e metanolo anidro secondo la tecnica di STOFFEL CHU & AHRENS (1959). Gli esteri metilici provenienti dalle frazioni trigliceridi e

## Analisi dei lipidi da siero

Estratto N°.	Lipidi plasmatici per 100 ml di siero (mg)	TIPO DELLA DETERMINAZIONE	Quantità imple- gata per l'analisi (mg)	Fosfolipidi		Trigliceridi		Digliceridi		Colesterolo libero	
				per 100 ml di siero (mg)	per 100 mg di lipidi (mg)	per 100 ml di siero (mg)	per 100 mg di lipidi (mg)	per 100 ml di siero (mg)	per 100 mg di lipidi (mg)	per 100 ml di siero (mg)	per 100 mg di lipidi (mg)
				1	305,0	Cromatografia su strato sottile . . . . .	12,2	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	45,0	14,7
		Idem . . . . .	12,2	107,1	35,1	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>	5,4	1,7	12,8	4,2
		Idem estrazione a caldo . . . . .	3,0	105,0	34,4	45,7	14,9	5,7	1,8	13,4	4,4
		Idem estrazione a freddo . . . . .	3,0	87,5	28,6	38,4	12,5	4,1	1,3	9,6	3,1
		Analisi diretta siero . . . . .	1,5	114,0	37,3	45,0 <sup>c</sup>	14,7	—	—	—	—
		Analisi diretta estratto lipidico	1,5	116,0	38,0	54,0 <sup>c</sup>	17,7	—	—	—	—
2	380,0	Cromatografia su strato sottile e- strazione a caldo	3,8	118,0	31,0	55,8	14,6	9,6	2,5	12,0	3,1
		Idem estrazione a freddo . . . . .	3,8	—	—	41,6	10,9	4,7	1,2	10,5	2,7
		Analisi diretta siero . . . . .	1,9	111,0	29,2	65,2	17,1	—	—	—	—
		Analisi diretta estratto lipidico	1,9	121,0	31,8	73,6 <sup>c</sup>	19,4	—	—	—	—
3	369,0	Cromatografia su strato sottile . . . . .	14,7	108,5	29,4	48,2	13,0	3,8	1,0	11,4	3,1
		Idem . . . . .	14,7	100,0	27,1	45,8	13,1	3,9	1,0	12,0	3,2
		Idem estrazione a caldo . . . . .	3,7	110,1	29,8	48,7	13,1	4,4	1,2	12,6	3,4
		Idem estrazione a freddo . . . . .	3,7	104,3	28,2	38,2	10,3	3,9	1,0	10,1	2,7
		Analisi diretta estratto lipidico	1,8	109,5	29,7	62,0 <sup>c</sup>	16,8	—	—	—	—
		Analisi diretta siero . . . . .	1,8	—	—	59,0	15,9	—	—	—	—

<sup>a</sup> Considerato il valore dell'analisi diretta dell'estratto lipidico.

<sup>b</sup> Considerato il valore della cromatografia precedente.

<sup>c</sup> Frazionamento su piccola colonna di Florisil.

TABELLA 4.

di ratto a digiuno da 12 ore

Esteri del colesterolo				Colesterolo totale				Acidi grassi		Recupero totale	
per 100 ml di siero (mg)		per 100 mg di lipidi (mg)		per 100 ml di siero (mg)		per 100 mg di lipidi (mg)		per 100 ml di siero	per 100 mg di lipidi	per 100 ml di siero	per 100 mg di lipidi
come colesterolo	come stearato	come colesterolo	come stearato	come colesterolo	come stearato	come colesterolo	come stearato	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
68,9	115,7	22,5	37,9	82,0	128,8	26,8	42,2	28,6	9,3	323,3	105,8
69,3	116,0	22,7	38,1	82,1	128,8	26,9	42,3	27,6	9,0	313,9	102,8
69,8	117,0	22,8	38,3	83,2	130,4	27,2	42,7	30,0	9,8	316,8	103,6
62,2	104,4	20,3	34,2	71,8	114,0	23,4	37,3	27,7	9,0	271,7	88,7
—	—	—	—	72,6	—	23,8	—	—	—	—	—
—	—	—	—	72,6	—	23,8	—	—	—	—	—
74,0	124,2	19,4	32,6	86,0	136,2	22,5	35,7	33,6	8,8	353,2	92,6
62,4	105,0	16,4	27,3	72,9	115,5	19,1	30,0	25,2	6,6	—	—
—	—	—	—	86,2	—	22,7	—	—	—	—	—
—	—	—	—	83,2	—	21,8	—	—	—	—	—
66,6	111,8	18,0	30,0	78,0	123,2	21,1	33,1	29,1	7,8	312,8	84,3
66,6	111,8	18,0	30,0	78,6	123,8	21,2	33,2	28,6	7,7	304,8	82,1
64,8	108,8	17,5	29,4	77,4	121,4	20,9	32,8	36,0	9,7	320,6	86,6
60,5	101,6	16,3	27,5	70,6	111,7	19,0	30,2	31,0	8,4	289,1	78,1
—	—	—	—	77,4	—	20,9	—	—	—	—	—
—	—	—	—	73,2	—	19,8	—	—	—	—	—

fosfolipidi sono già privi di colesterolo in quanto provenienti dalla cromatografia su strato sottile e possono essere direttamente impiegati; per i lipidi totali, analizzati in parallelo, è necessario procedere alla microsублиmazione sotto vuoto spinto. La temperatura del bagno e la durata della sublimazione sono state determinate dopo avere eseguito una serie di esperienze usando la stessa quantità di esteri metilici (mg 4,5) e variando la temperatura e il tempo di permanenza nel bagno. In ogni prova gli esteri metilici sublimati e il residuo della sublimazione sono stati ripresi separatamente con etere di petrolio ed una aliquota è stata cromatografata su strato sottile di gel di silice usando come solvente benzina, etere etilico privo di perossidi, acido acetico nel rapporto 80:20:1, come standard oleato di metile e vapori di iodio per la rivelazione.

Si è osservato che operando alla temperatura di 60°, e per un tempo rispettivamente di 1, 2, 3 ore si hanno apprezzabili, per quanto decrescenti, quantità di esteri metilici nel residuo. Tale quantità diminuisce lavorando a 65° per tempi di sublimazione di 1-2 ore e scompare del tutto quando il tempo di sublimazione viene portato a 3 ore.

Per ottenere gli esteri metilici dai lipidi totali abbiamo anche usato il procedimento di saponificazione descritto da BÖTTCHER *et al.* (1959) con successiva metilazione degli acidi grassi, così ottenuti, con metanolo e acido cloridico secco al 5 %.

Nelle Tab. 5 e 6 sono riportate le composizioni percentuali in acidi grassi da C<sub>12</sub> a C<sub>24</sub> relative ai lipidi del fegato e del siero di ratto (*pool* di 20 animali) affiancando per i confronti i valori per i lipidi totali, i trigliceridi, i fosfolipidi e nel caso del siero anche gli esteri del colesterolo e gli acidi grassi liberi.

Dato il carattere comparativo, le singole composizioni in acidi grassi sono espresse in per cento dell'area totale, analogamente a quanto eseguito da MORUZZI, VIVIANI & BORRI (1962), ARRIGO & TRISCORNIA (1963) e MOHRHAUER (1963).

Nei lipidi epatici totali l'acido palmitico è il componente saturo contenuto in maggiore proporzione, essendo anche il principale componente in senso assoluto, seguito da acido oleico (principale componente insaturo), linoleico, stearico ed arachidonico. Nei trigliceridi invece prevale l'acido oleico, seguito da acido palmitico e da linoleico mentre lo stearico e l'arachidonico scendono a valori assai bassi. Nei fosfolipidi prevalgono, tra i saturi, lo stearico e il palmitico e tra i non saturi l'arachidonico, con valori nettamente elevati. Nei lipidi del siero il quadro è analogo, con l'osservazione che nei fosfolipidi prevalgono nettamente gli acidi grassi saturi su quelli non saturi; negli esteri del colesterolo è preminente l'acido arachidonico che da solo supera il 50 % degli acidi grassi totali, sui quali gli acidi non saturi rappresentano circa il 75 %. Negli acidi grassi liberi prevale l'acido palmitico seguito dall'oleico, dal linoleico e dallo stearico.

La saponificazione alcalina anche se eseguita in presenza di idrochinone seguita da metilazione con metanolo e acido solforico conduce a perdite sensibili rispetto alla transesterificazione acida a danno degli acidi grassi poli-insaturi (contenuto percentuale di acido arachidonico che varia dal 21,9 % al 17,4 %).

### CONCLUSIONI

A conclusione di questa ricerca si può ritenere fondatamente che la tecnica di cromatografia su strato sottile possa competere validamente con quella di cromatografia di adsorbimento su colonna nel frazionamento dei

TABELLA 5.

Composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi di fegato di ratto, separati per cromatografia su strato sottile ed analizzati con la cromatografia gas-liquido.

ACIDI GRASSI *	LIPIDI TOTALI	TRIGLICERIDI	FOSFOLIPIDI
12:0	tracce	tracce	tracce
13:0	tracce	tracce	tracce
14:0	0,8	1,8	1,0
15:0	0,2	0,5	0,6
16:0	21,5	27,1	19,4
16:1	3,4	5,4	1,9
17:0	0,6	0,5	1,0
17:1	0,4	0,6	0,5
18:0	15,7	2,5	32,2
18:1	20,2	29,4	7,9
18:2	18,1	21,9	10,1
18:3	1,7	2,4	0,4
20:0	0,8	1,3	0,6
20:4	14,7	4,6	21,6
21:0	0,4	0,5	0,3
22:0	0,7	0,5	1,4
24:0	0,7	0,9	0,9

\* Numero di atomi di carbonio: numero dei doppi legami.

TABELLA 6.

Composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi di siero di ratto, separati per cromatografia su strato sottile ed analizzati con la cromatografia gas-liquido.

ACIDI GRASSI *	LIPIDI TOTALI	TRI-GLICERIDI	FOSFOLIPIDI	ESTERI DEL COLE-STEROLO	ACIDI GRASSI LIBERI
12 : 0	tracce	0,8	0,6	0,2	1,3
14 : 0	0,5	2,5	1,3	1,3	4,6
14 : 1	0,1	0,4	0,3	0,4	0,6
15 : 0	0,3	0,9	0,6	0,8	1,2
15 : 1	0,1	0,2	0,2	0,6	0,4
16 : 0	23,1	28,4	25,3	12,2	33,5
16 : 1	3,3	5,4	2,7	4,9	8,2
17 : 0	0,6	0,5	1,1	0,5	0,9
17 : 1	0,3	0,8	0,7	1,1	1,1
18 : 0	17,7	4,8	34,9	3,2	9,4
18 : 1	16,1	26,2	9,7	10,1	20,4
18 : 2	13,7	17,6	7,9	10,5	10,3
18 : 3	1,5	1,8	0,4	0,2	2,0
20 : 0	1,1	1,4	0,3	0,8	0,6
20 : 4	19,4	5,7	10,7	51,6	3,5
21 : 0	0,7	0,7	0,3	0,2	0,6
22 : 0	0,7	0,8	1,4	0,2	0,6
24 : 0	0,5	1,0	1,3	0,8	0,6

\* Numero di atomi di carbonio : numero dei doppi legami.

lipidi in classi ed anzi ne sia superiore sotto alcuni aspetti, quali la possibilità di frazionare piccole quantità di sostanze (3-15 mg) e di eseguire con notevole rapidità e precisione anche ripetute analisi quantitative dei vari costituenti. La possibilità di abbinare questa tecnica ad altre recenti microtecniche di analisi consente di apprezzarne anche certi aspetti preparativi, in quanto le frazioni ottenute possono essere a loro volta ulteriormente impiegate, sia per eseguire la determinazione degli acidi grassi per gas-cromatografia che per eseguire il frazionamento dei fosfolipidi e dei trigliceridi secondo insaturazione, come verrà precisato in una Nota successiva.

6 luglio 1964.

## BIBLIOGRAFIA

- ANGELICO, R., G. CASPARRINI, G. CAVINA, L. MORETTA-MAGGIORE & L. QUINTILIANI, 1963. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **39**, 1785.
- ARRIGO, L. & E. TRISCORNIA, 1963. *Giorn. Ital. Biochim.*, **12**, 341.
- BÖTTCHER, C. J. F., F. P. WOODFORD, E. BOELSMA-VAN HOUTE & C. M. VAN GENT, 1959. *Rec. Trav. Chim.*, **78**, 794.
- BOWYER, D. E., W. M. F. LEAT, A. N. HOWARD & G. A. GRESHAM, 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 423.
- CARLSON, L. A. & L. B. WADSTRÖM, 1959. *Clin. Chim. Acta*, **4**, 197.
- CARROL, K. K., 1961. *J. Lipid Res.*, **2**, 135.
- COOK, R. P., 1958. *Cholesterol*, Acad. Press. Inc., N. Y. p. 152.
- DOBIASOVA, M., 1963. *J. Lipid Res.*, **4**, 481.
- DOLE, V. P., 1956. *J. Clin. Invest.*, **35**, 150.
- DUPONT, S. & H. LEWIS, 1963. *J. Nutrition*, **80**, 397.
- FISKE, C. H. & Y. SUBBAROW, 1930. *J. Biol. Chem.*, **86**, 671.
- FOLCH, J., M. LEES & G. H. SLOANE STANLEY, 1957. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
- GOLDRICK, B. & J. HIRSH, 1963. *J. Lipid Res.*, **4**, 482.
- HANEL, H. K. & H. DAM, 1955. *Acta Chem. Scand.*, **9**, 677.
- HIRSCH, J. & J. E. H. AHRENS, 1958. *J. Biol. Chem.*, **233**, 311.
- HONNEGGER, C. G. & H. T. A. FREYVOGEL, 1963. *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2265.
- JATZKEWITZ, H. & E. MEHL, 1960. *Z. Physiol. Chem.*, **320**, 251.
- KRELL, K. & S. A. HASHIM, 1963. *J. Lipid Res.*, **4**, 407.
- MALINS, D. C. & H. K. MANGOLD, 1960. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 576.
- MANGOLD, H. K., 1961. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 708.
- MANGOLD, H. K. & N. TUNA, 1961. *Federation Proc.*, **20**, 268.
- MATTEWS, J. S., A. L. PERERA & A. J. AGUILERA, 1962. *J. Chromatog.*, **9**, 331.
- MOHRHAUER, H., 1963. *J. Lipid Res.*, **4**, 151.
- MORUZZI, G., R. VIVIANI & P. BORRI, 1962. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **38**, 1774.
- NICHAMAN, M. Z., C. C. SWEELEY, N. M. OLDHAM & E. R. OLSON, 1963. *J. Lipid Res.*, **4**, 484.
- QUINLIN, P. & H. J. WEISER, 1958. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **35**, 325.
- ROUSER, G., G. KRITCHEVSKY, D. HELLER & E. LIEBER, 1963. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 425.
- SNYDER, F. & E. A. CRESS, 1963. *Radiation Res.*, **19**, 129.
- SPERRY, V. M., 1954. *J. Biol. Chem.*, **209**, 377.
- SPERRY, V. M. & F. C. BRAND, 1955. *J. Biol. Chem.*, **213**, 69.
- STOFFEL, W., F. CHU & E. M. AHRENS, 1959. *Anal. Chem.*, **31**, 407.
- SWELL, L., M. D. LAW, P. E. SCHOOLS & C. R. TREADWELL, 1961. *J. Nutrition*, **74**, 148.
- VACIKOVA, A., V. FELT & J. MALIKOVA, 1962. *J. Chromatog.*, **9**, 301.
- VAN HANDEL, E., 1961. *Clin. Chem.*, **7**, 249.
- VAN HANDEL, E. & D. B. ZILVERSMITH, 1957. *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 152.
- VOGEL, W. L., W. M. DOIZAKI & L. ZIEVE, 1962. *J. Lipid Res.*, **3**, 138.
- VOGEL, W. L., W. M. DOIZAKI & L. ZIEVE, 1963. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **113**, 91.
- WEICHER, H., 1959. *Klin. Wochschr.*, **37**, 763.
- YOUMBURG, G. E. & M. V. YOUMBURG, 1930. *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158.
- ZOLLNER, N., G. WOLFRAM & G. AMIN, 1962. *Klin. Wochschr.*, **40**, 273.