

126. Comparaison et perfectionnement des méthodes d'extraction des lipides du foie humain

par **Pierre Favarger.**

(7. IX. 41.)

Les lipides du foie ont été étudiés par un grand nombre d'auteurs et les méthodes d'investigation diffèrent souvent passablement. De ce fait, les résultats sont loin d'être comparables. Les auteurs américains, à la suite de *Bloor*¹⁾, procèdent à une extraction alcoolique de l'organe frais. La méthode primitive est perfectionnée par *Bloor* lui-même²⁾, *Snider* et *Bloor*³⁾, *Sinclair*⁴⁾ 5) 6), spécialement en vue d'une bonne séparation des phosphatides et pour le fractionnement des acides gras. Des fractions « lécithine » et « céphaline » sont isolées dans certains cas^{1) 6)}, mais il n'est fait mention que d'une petite quantité d'un produit insoluble dans l'éther, produit qui ne possède que quelques-uns des caractères de la sphingomyéline (Méthode A).

*Klenk*⁷⁾ et *Epstein*^{8) 9)} étudient les lipoidoses humaines et différencient les phosphatides éthersolubles (lécithine, céphaline) des alcoolosolubles (sphingomyéline). Pour le faire, *Klenk* a mis au point une méthode analytique basée sur une extraction primaire à l'acétone suivie d'extractions à l'éther et avec un mélange d'alcool méthylique et de chloroforme. Il a ainsi pu identifier la sphingomyéline splénique et hépatique dans la maladie de *Niemann-Pick*. *Epstein* trouve dans des cas de goutte lipoidique, et même dans des cas normaux, une importante « fraction sphingomyéline » nommée simplement plus tard « lipoides alcoolosolubles ». Pour notre part, nous avons appliqué avec succès la méthode de *Klenk* (Méthode B) à un cas de *Niemann-Pick*¹⁰⁾ et nous avons obtenu de la sphingomyéline pure en quantité notable, mais dans un cas de goutte lipoidique les purifications subséquentes de la fraction « phosphatides alcoolosolubles » ne nous ont permis d'en isoler que des quantités très faibles. Par contre cette fraction fournit une forte proportion de phosphatides

1) *W. R. Bloor*, *J. Biol. Chem.* **68**, 33 (1926).

2) *W. R. Bloor* et *R. Snider*, *J. Biol. Chem.* **87**, 399 (1930).

3) *R. Snider* et *W. R. Bloor*, *J. Biol. Chem.* **99**, 555 (1933).

4) *R. G. Sinclair*, *J. Biol. Chem.* **92**, 245 (1931).

5) *R. G. Sinclair*, *J. Biol. Chem.* **111**, 261 (1935).

6) *R. G. Sinclair*, *J. Biol. Chem.* **134**, 71 (1940).

7) *Baumann*, *Klenk* et *Scheidegger*, *Erg. allg. Path.* **30**, 183 (1936).

8) *E. Epstein*, *Erg. allg. Path.* **33**, 280 (1937).

9) *E. Epstein*, *Virchow's Arch.* **306**, 53 (1940).

10) *Rutishauser* et *Favarger*, 7. Tagung der Schweiz. Pathologen 1941. Paraîtra dans la Revue Suisse de Médecine.

secondairement éthersolubles. Avant d'étudier certaines variations pathologiques dans la composition du foie et d'autres organes humains, il nous a paru nécessaire de comparer les résultats des méthodes analytiques des deux principaux groupes d'auteurs. Pour pouvoir le faire d'une façon assez rigoureuse et pour obtenir des fractions aussi peu altérées que possible, nous avons utilisé un appareil qui permet d'extraire l'organe à l'abri complet de l'oxygène. Quatre foies humains normaux et un foie pathologique (cas de Sprue) sont analysés par les deux méthodes.

Méthode A.

Bloor insiste déjà¹⁾ sur la nécessité d'éviter la présence d'air, les acides gras non saturés des lipides étant très sensibles à l'oxydation, tout particulièrement quand ils font partie d'une molécule de phosphatide²⁾. Cette oxydabilité est importante surtout à chaud³⁾, et l'extraction au percolateur préconisée par *Bloor* n'isole certainement pas de l'air d'une façon complète. Il était nécessaire d'améliorer la technique, car la connaissance aussi exacte que possible du degré de saturation des acides gras est très importante.

Après avoir rapidement réduit 100 g de foie en bouillie fine, on ajoute 150 cm³ d'alcool à 95° et filtre dans la douille d'un appareil de Soxhlet modifié (figure 1) en utilisant un tube de verre très large. Le liquide est recueilli au moyen de la tubulure accessoire A dans une fiole pleine de gaz carbonique. On remplit alors tout l'appareil de gaz carbonique par F en faisant le vide à plusieurs reprises. 200 cm³ d'alcool sont introduits par aspiration au moyen du tube C dans le ballon B, on ferme le robinet D et porte à l'ébullition. Le premier extrait alcoolique peut être ainsi recueilli par A, sans avoir subi l'ébullition. On répète cette opération 3 ou 4 fois, puis procède à l'extraction proprement dite en changeant l'alcool après 2, 6 et 10 heures. Le reste des lipides est extrait pendant la nuit. Le capillaire moyen G permet le passage d'un faible courant de gaz carbonique pendant toute l'extraction.

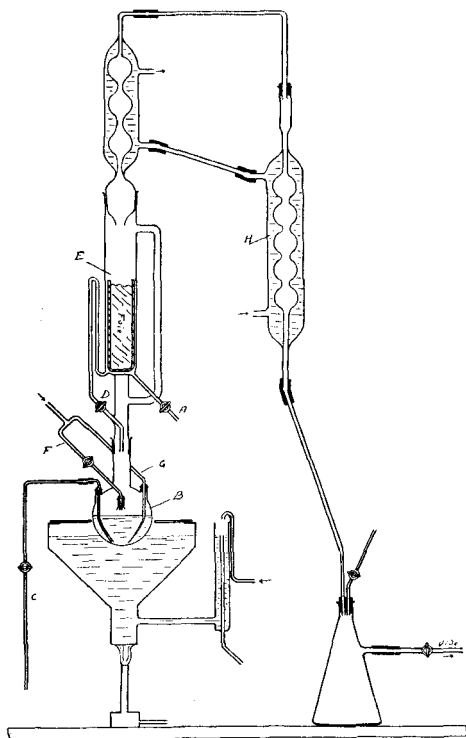


Fig. 1.

1) W. R. Bloor, J. Biol. Chem. **119**, 453 (1937).

2) Tait et King, Biochem. J. **30**, 285 (1936).

3) M. Mottier, Arch. Gen. **139**, 139 (1934).

La distillation de l'alcool au vide se fait dans l'appareil lui-même, une partie de l'alcool retombe dans le corps du *Soxhlet*, alors que le reste est condensé par le réfrigérant accessoire H. Il faut interrompre 2 ou 3 fois la distillation pour vider E et introduire dans B les premières portions de l'extrait alcoolique. Quand tout l'alcool a disparu (formation des gouttes d'eau sur les parois) on remplit de gaz carbonique, refroidit, puis introduit par C de l'éther sans peroxydes (purification d'après *Bloor*¹⁾ qui dissout les lipides. On le chasse par C dans un entonnoir à séparation plein de gaz carbonique, rince l'appareil à l'éther et continue l'opération comme *Sinclair*²⁾ en séparant les lipides solubles (fraction graisses neutres) et insolubles (fraction phosphatides) dans l'acétone additionnée de chlorure de magnésium. On sépare ensuite la partie insoluble dans l'éther absolu de la fraction phosphatides en laissant à 0° pendant 12 heures, et saponifie les deux fractions dans un courant d'azote. Pour la partie soluble dans l'acétone il suffit de faire bouillir le résidu d'évaporation 1 à 2 heures à reflux avec 20 cm³ d'hydroxyde de potassium à 20% dans l'alcool à 80%. Pour les phosphatides on prolonge l'opération 4 à 6 heures avec 50 cm³ d'hydroxyde de potassium. On suit les indications de *Sinclair* pour l'extraction et la purification de l'insaponifiable et des acides gras ainsi que pour la séparation des acides liquides (non saturés) et solides (saturés) au moyen des savons de plomb. A chaque étape de l'analyse on prend une partie aliquote des différentes fractions pour une mesure de poids et un indice d'iode (méthode de *Yasuda*³⁾). Les acides gras liquides sont alors fractionnés par bromuration. Comme les auteurs cités l'indiquent, la solubilité partielle des dérivés bromés empêche une séparation correcte, mais la teneur en brome mesurée par la méthode de *Brown et Beal*⁴⁾ et l'indice d'iode du mélange permettent de calculer assez exactement la valeur des fractions.

Méthode B.

Notre appareil permet de changer facilement le dissolvant pour les extractions successives à l'acétone, l'éther et l'alcool méthylique préconisées par *Klenk* pour l'analyse des organes dans la maladie de *Niemann-Pick*.

Chaque extraction est conduite comme ci-dessus et on élimine toute trace du dissolvant précédant en faisant le vide un certain temps. Les deux premiers extraits sont traités pour leur compte en vue de séparer les phosphatides, car l'acétone en enlève beaucoup, davantage même que ce qui passe dans l'éther. L'extraction par l'éther a été prolongée deux jours et plus sans qu'une quantité plus grande de phosphatides pût être extraite. L'alcool méthylique enlève tout ce qui reste comme lipides presque aussi facilement que le mélange chloroforme-alcool méthylique, ainsi qu'on peut le vérifier en traitant le résidu d'extraction par l'hydroxyde de potassium, puis en déterminant l'insaponifiable et les acides gras (substances non extraites: 5 à 8 mgr.). On distille l'extrait méthylique au vide, puis traite par l'éther sec sans peroxydes qui enlève la fraction dite « Phosphatides récupérés ». On la traite pour son propre compte en vue d'isoler les acides gras. La sphingomyéline a été recherchée sans succès dans le résidu aqueux. Une saponification prolongée n'a pas non plus permis de retirer de cette fraction une quantité appréciable d'acides gras.

Chaque opération est faite sous le gaz carbonique ou l'azote et on s'arrange à ce que les extraits ne soient jamais au contact de l'air ou trop exposés à la lumière.

RÉSULTATS.

Le premier tableau montre que les chiffres obtenus pour la fraction « Graisses neutres », surtout si on la calcule d'après les acides

¹⁾ W. R. *Bloor*, J. Biol. Chem. **82**, 279 (1929).

²⁾ R. G. *Sinclair*, J. Biol. Chem. **86**, 579 (1930).

³⁾ M. *Yasuda*, J. Biol. Chem. **94**, 401 (1931).

⁴⁾ *Brown et Beal*, Am. Soc. **45**, 1289 (1923).

Tableau 1.
Valeurs des différentes fractions de lipides en % du poids frais.
(Foies normaux: 1 à 4, cas de Sprue: 5.)

No.	Fraction Phosphatides	Ind. d'Iode	Fraction Graisses neutres	Ind. d'Iode	Acides gras Phosph.	Ind. d'Iode	Acides gras Graisses neutres	Ind. d'Iode	Phosphatides calculés	Phosphatides calc. % d. lipides	Graisses neutres calculées	Insaponifiable	Ind. d'Iode	Cholestérine libre	Ethers de la Cholest.	Fraction Graisses neutres calculée
1 A	2,44	83	1,19	118	1,37	123	0,82	112	1,88	67,4	0,91	0,303	133	0,21	0,05	1,21
1 B	1,17	88	1,31	102	0,67	119	0,82	114	0,925		0,91	0,33	155	0,22		1,24
Phosph. récup.					0,62	117			0,855							
Total					1,29				1,78							
2 A	2,78	84	1,46	101	1,37	126	0,875	95	1,88	66,0	0,97	0,38	155	0,23	0,045	1,35
2 B	2,17	75,5	1,58	135	1,04	127	0,91	92	1,43		1,01	0,37	189	0,22		1,38
Phosph. récup.					0,29	125			0,40							
Total					1,33				1,83							
3 A	2,39	85	1,29	109	1,23	124	0,85	93	1,69	64,2	0,94	0,31	142	0,27	0,05	1,25
3 B	2,02	81	1,31	107	0,97	119	0,86	96	1,33		0,95	0,32	161	0,26		1,27
Phosph. récup.					0,22	123			0,30							
Total					1,19				1,63							
4 A	2,52	83	1,35	130	1,56	125	0,81	99	2,15	70,7	0,897	0,43	185	0,36	0,06	1,33
4 B	1,70	71	1,38	125	0,806	130	0,87	104	1,11		0,96	0,41	202	0,35	0,06	1,37
Phosph. récup.					0,685	125			0,94							
Total					1,49				2,05							
5 A	1,61	61	6,22	77	1,10	68	5,20	70	1,52	20,8	5,75	0,17	120	0,13	0,03	5,92
5 B	0,94	58	6,36	76	0,78	69	5,27	71	1,07		5,82	0,14	151	0,125		5,96
Phosph. récup.					0,30	75			0,41							
Total					1,08				1,48							

Tableau 2.
Répartition des acides gras.

No.	% Ac. liquides des phosphatides	Ind. d'Iode	Ind. d'Iode Ac. solides	Rendement de la séparat.	% Ac. liquides Graisses neutres	Ind. d'Iode	Ind. d'Iode Ac. sol.	Rendement de la séparat.	% des Ac. gras des Phosphatides calculés en acide :				% des Ac. gras des Graisses neutres calculés en acide :			
									Oléique	Linoléique	Linoléique	Ara-chidique	Oléique	Linoléique	Linoléique	Ara-chidique
1	55,8	204	9,7	98,5	62,5	177	12,6	97,1	19,2	54,8	1,6	24,4	32,3	50,7	0,8	16,2
2	56,0	204	11,5	97,5	69,5	129	16,5	96,7	22,0	48,8	4,2	25,0	70,3	21,7	1,8	6,2
3 3, Phos. récupér.	58,5 57,9	203 201	9,6 8,8	97,2 98,7	63,3	141	13,1	98,3	26,8 28,1	41,5 40,9	0,9 1,3	29,8 29,7	66,5	20,1	1,1	12,3
4 A 4 B	58,7 58,2	206 204	7,9 13,3	98,2 97,8	63,1	158	15,5	98,5	24,3	46,4	2,4	26,9	54,2	28,1	1,7	16,0
5 A 5 B	52,7 51,6	123 141	6,8 7,7	98,2 98,8	72,5	98,5	11,3	99,9	75,5	17,9	1,4	5,2	83,5	8,8	0,6	7,9

gras et l'insaponifiable, concordent bien pour les deux méthodes, l'extraction mixte étant néanmoins un peu plus complète. Les indices d'iode sont variables pour l'insaponifiable, mais ceux des acides gras sont concordants. La fraction « Phosphatides » est bien supérieure à celle que l'on calcule en lécithine à partir des acides gras, elle comporte donc une certaine quantité d'impuretés. Le total des phosphatides extraits à l'éther et à l'alcool dans la méthode B correspond aux phosphatides extraits par la première méthode, mais la proportion des deux fractions est variable. Leurs indices d'iode sont peu différents et seuls ceux du cas de Sprue ont peut-être une signification. Les phosphatides qui résistent à l'extraction étherée sont donc simplement des phosphatides de même composition que les autres, mais liés à des protéines, associations qui, comme l'avait déjà vu *Liebermann*¹⁾ in vitro, sont décomposables par l'alcool mais non par l'éther. (Voir aussi *Hoppe-Seyler*²⁾).

La sphingomyéline et les cérébrosides n'existent pas en quantité suffisante dans les cas normaux pour pouvoir être dosés exactement par ces méthodes. Nous en avons toujours retiré une petite quantité (1 à 2 cgr., assez impurs) de la substance insoluble dans l'éther absolu qui se sépare de la fraction phosphatides, mais c'est là certainement une part seulement du tout. Le reste de cette substance est composé principalement de matières extractives hydrosolubles. Dans la méthode B on retire aussi un peu de sphingomyéline de cette même fraction phosphatides et le résidu aqueux de l'extraction méthylique en contient une petite quantité.

Séparation des acides gras liquides et solides. Nous avons toujours noté une séparation presque quantitative, et le « résidu collant » de *Snider* et *Bloor* est très petit dans tous les cas où il y en a un, et presque toujours inexistant. La modification essentielle apportée à la méthode étant l'exclusion des possibilités d'oxydation, il est permis de penser que les substances gênantes en question étaient justement dues à l'oxydation. Les émulsions stables sont également évitées.

Si le degré de saturation des acides gras des phosphatides offre une constance remarquable dans tous les cas normaux, on voit que la répartition des différents acides non saturés varie beaucoup plus. Elle est encore plus variable pour les graisses neutres qui dépendent davantage que les phosphatides de la composition du régime.

RÉSUMÉ.

Une méthode d'extraction des lipides du foie entièrement à l'abri de l'air est mise au point.

¹⁾ *Liebermann, Pflüger's Arch.* **54**, 573 (1893).

²⁾ *Hoppe-Seyler, Med.-Chem. Unters., Berlin* 1867, **2**, 133.

L'extraction alcoolique et l'extraction mixte à l'acétone, l'éther et l'alcool méthylique donnent des résultats concordants. Les phosphatides sont en partie non extractibles à l'éther, mais la proportion est variable et leur composition est identique à celle des phosphatides extractibles.

Deux tableaux donnent les valeurs des différentes fractions de lipides et leurs indices d'iode ainsi que la répartition des acides gras.

Genève, Institut pathologique.

127. Über Derivate des einseitig kernhydrierten Benzoins und Desoxybenzoins

von Paul Ruggli und Albert Businger.

(10. IX. 41.)

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese einseitig kernhydrierter Benzoin- und Desoxybenzoin-derivate, die als Ausgangsmaterial für die Darstellung einseitig hydrierter Stilbenderivate in Frage kommen. Beim Stilböstrol (p,p'-Dioxy- μ,μ' -diäthyl-stilben) würde z. B. eine einseitige Hydrierung die formale Ähnlichkeit mit dem Östradiol verbessern.

Unsere ersten Versuche benutzten zum Aufbau der einseitig hydrierten Desoxybenzoin-derivate die Reaktion von *Friedel* und *Crafts*. Aus Cyclohexyl-essigsäurechlorid und Anisol erhält man auf diesem Wege das kristallisierte p-Methoxy-hexahydro-desoxy-benzoin bzw. 1-Cyclohexyl-2-(p-anisyl)-äthanon-2 (I) vom Smp. 43°, von dem auch ein Oxim, Semicarbazon und Dinitro-phenylhydrazon dargestellt wurde. Analog erhält man aus dem Chlorid der p-(Methoxy-cyclohexyl)-essigsäure¹⁾ mit Anisol das beidseitig methoxylierte Produkt, d. h. das Hexahydro-desoxy-anisoin oder 1-(p-Methoxy-cyclohexyl)-2-(p-anisyl)-äthanon-2 (II) vom Smp. 79°, in dem jedenfalls die trans-Form vorliegt²⁾.



Im letzteren Falle wurde das Aluminiumchlorid zweckmässig durch Zinn(IV)-chlorid ersetzt, da sonst neben der festen Form, die mit maximal 25% Ausbeute erhalten wird, sehr viel von einer flüssigen Fraktion anfällt, die nicht glatt zerlegbar ist. Letztere

¹⁾ P. Ruggli, O. Leupin und A. Businger, *Helv.* **24**, 344 (1941).

²⁾ Ein Versuch, dieses Keton auch direkt aus p-(Methoxy-cyclohexyl)-essigsäurechlorid und Anisyl-magnesiumbromid darzustellen, gab flüssige Produkte von niederem Methoxylgehalt.