

Cercetari marine	I.N.C.D.M.	Nr. 34	261-267	2002
------------------	------------	--------	---------	------

OBTENTION DES CÉPHALINES DE L'HUILE DE FOIE DE QUELQUES ESPÈCES DE POISSONS MARINS

Florica BUSURICU et Felicia BURUIANA
Faculté de Médecine, Université "Ovidius", Constanta

ABSTRACT

From the liver of two Black Sea fish species (*Squalus acanthias* and *Trygon pastinaca*) it could be obtained the appropriate fish oil; by the oil processing it was isolated the lipidic fraction. The qualitative chromatographic analyse on a thin silicogel ledge marked out the kephalins. From the quantitative point of vue, the *Squalus acanthias* species has a greater content of kephalins (28.8 mg/dl lipidic fraction) compared to *Trygon pastinaca* species (4.81 mg/dl lipidic fraction).

KEY WORDS : *Squalus acanthias*, *Trygon pastinaca*, kephalins

INTRODUCTION

A cause de leur caractere amphypatique, les phospholipides sont des constituants (à un taux de 40%) des biomembranes, à côté des protides (60%), et participent aux processus de perméabilité sélective, dans le transport des lipides complètement hydrophobes dans le sang et le plasma (SERBAN & ROSOIU, 1992). Les phospholipides sont des constituants des lipoprotéines

plasmatiques, facilitant la solubilisation de la cholestérine libre et estérifiée et des triglycérides.

Les phospholipides sont des composantes des lipoprotéines, comme suit: dans les chylomicrones – à 6%, dans les VLDL - à 20%, dans LDL – à 24%, dans HDL – à 22% (MIHELE, 2001).

Les phospholipides des plusieurs espèces des poissons (de mer et d'eau douce) ont été étudiées, tout comme celles des invertébrés (gastéropodes, coelentérés, bivalves) depuis 1960 (NEVALAINEN *et al.*,2001). Il y a aussi de nombreuses études effectuées par des chercheurs roumains sur plusieurs espèces de poissons de la mer Noire; ces études incluent des déterminations de lipides totales et de phospholipides ou des acides gras dans la composition des phospholipides (MOLNAR *et al.*,1975).

Les poissons *Squalus acanthias* et *Trygon pastinaca* n'ont pas été étudiés du point de vue de leur composition biochimique et des activités biologiques de ces composantes, d'où la nouveauté de l'étude présente, dont le but était d'obtenir deux extraits phospholipiques, d'identifier par chromatographie en couche mince les céphalines et d'effectuer leur dosage spectrophotométrique à des longueurs d'onde comprises à $\lambda=720\text{nm}$. Les extraits ont été obtenus d'huiles isolées du foie des espèces de poissons.

MATÉRIEL

1. La matière première a été l'huile obtenue du foie des espèces *S.acanthias* et *T. pastinaca*.

2. Les réactifs utilisés pour l'extraction des phospholipides:

- une mixture chloroforme – méthanol (v/v) 2:1 pour extraction;
- une mixture chloroforme – méthanol - eau distillée (v/v) 3:48:47 pour le lavage.

3. Réactifs et appareillage pour la chromatographie en couche mince:

- une mixture chloroforme – méthanol - eau distillée (v/v) 65:25:4 pour le développement;
- mixture colorante contenant 0.5 g de molybdate d'ammonium; 1.5 ml volume est complété à 50 ml avec de l'acétone;
- plaque chromatographique en couche mince de silicagel – 0.2mm d'épaisseur;
- réservoir pour chromatographie;
- étuve.

4. Réactifs et appareillage pour le dosage des céphalines:

- acide perchlorique à 70%;

- acide nitrique concentré;
 - molybdate d'ammonium;
 - hydroquinone;
 - solution standard de phosphore à 5 mg%.
5. Colorimètre: Cintra UV-VIS

TECHNIQUE DE TRAVAIL

1. Extraction des phospholipides

La matière première est traitée (une part de matière dans 20 parts volume) avec la mixture contenant du chloroforme et du méthanol (v/v) 2:1. On agite pendant 15 minutes et on filtre avec du papier-filtre. L'extrait phospholipique obtenu est purifié comme suit: on introduit l'extrait dans l'entonnoir de séparation dans le rapport de 1:0.2 (v/v) avec l'eau distillée. La phase chloroformique est retenue. On lave l'extrait 2-3 fois avec la mixture de lavage et la phase inférieure est recueillie chaque fois (MORRIS, 1975).

2. Separation chromatographique

On a utilisé une méthode décrite dans la littérature spécialisée (HELMUT, 1969). Les échantillons sont appliqués sur la plaque de chromatographie (10-20:mol), on laisse sécher et on marque le point de départ. On développe avec la mixture contenant du chloroforme, du méthanol et de l'eau distillée (v/v) 65:25:4. On marque le front du solvant. Les spots sont mis en évidence par arrossage avec la mixture colorante. Les plaques sont séchées dans l'étuve à 105⁰C pendant 5-10 minutes. L'identification des phospholipides se fait par le calcul de la valeur du facteur de rétention - $R_f \times 100$ et la comparaison de la valeur obtenue avec les valeurs standard des phospholipides (HELMUT, 1969).

3. Dosage des céphalines

On a utilisé la méthode spectrophotographique (ODAGIU *et al.*, 1999) de détermination du phosphore sous la forme du complexe molybdénique. L'extrait phospholipidique (0.1ml), auquel on ajoute 0.2 ml d'acide perchlorique et 2 gouttes d'acide nitrique concentré, est minéralisé sur un bain à huile, à 180⁰C pour une durée de 15 minutes. On ajoute 2 ml d'eau distillée, 0.2 ml de molybdate d'ammonium et 0.2 ml de hydroquinone. Après 10 minutes les échantillons sont soumis à l'examen spectrophotométrique à

$\lambda=720\text{nm}$. En même temps on prépare d'une manière identique les échantillons standard de phosphore (solution contenant 5mg%) et un échantillon témoin. On calcule le phosphore lipidique en mg/dl d'extrait en multipliant la valeur du phosphore lipidique par le facteur 25, obtenant de cette façon le résultat pour les phospholipides en mg/dl d'extrait.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Analyse qualitative

Les extraits phospholipidiques isolés des huiles obtenues du foie des poissons *S.acanthias* et *T.pastinaca* contiennent des phosphatidil éthanolamines et des phosphatidilserines, des complexes qui sont appelés par certains auteurs "céphalines" (SERBAN & ROSOIU, 1992).

Les valeurs du facteur de rétention $R_f \times 100$ déterminées dans les échantillons analysés sont reproduites dans le tableau 2, en comparaison avec les valeurs des substances pures établies (Tableau 1) (HELMUT, 1969).

Tableau 1
Valeurs des $R_f \times 100$ pour les phospholipides pures

No.	Phospholipide	$R_f \times 100 = hR_f$
1	Lisolécithine	21 ± 4
2	Sphingomyéline	29 ± 5
3	Lécithine	39 ± 5
4	Céphalines (phosphatidil éthanolamine et phosphatidil serine)	57 ± 8
5	Cérébrosides	78 ± 8
6	Cardiolopines	92 ± 2

Une analyse des valeurs de $R_f \times 100$ obtenues montre que celles-ci sont de 61.63 ± 3.16 et respectivement de 58.04 ± 3.91 , correspondant aux valeurs standard de $R_f \times 100 = 57 \pm 8$ pour les céphalines. Donc le résultat confirme la présence des céphalines dans les huiles obtenues du foie des deux espèces de poissons étudiées.

Tableau 2
Valeurs $R_f \times 100$ obtenues à la séparation des céphalines des extraits phospholipidiques*

No.	Extrait phospholipidique	Valeur moyenne $R_f \times 100$ (x)	Déviations s_x	Coefficient variable v %
1	<i>Squalus acanthias</i>	61,63	7,73	12,54

2	<i>Trygon pastinaca</i>	58,04	9,32	16,06
---	-------------------------	-------	------	-------

* On a utilisé le test Student Cochrane; n = 8

2. Analyse quantitative

Les résultats obtenus au dosage des céphalines des extraits phospholipidiques sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3

Analyse quantitative des céphalines des extraits phospholipidiques

No.	Extrait phospholipidique	Phosphore lipidique mg/ml extrait/ml huile	Céphalines mg/dl extrait/ml huile
1	<i>Squalus acanthias</i>	1,15	28,84
2	<i>Trygon pastinaca</i>	0,192	4,807

En analysant les données, il apparaît que *S. acanthias* contient des céphalines en plus grande quantité (phosphore lipidique - 1.15mg/dl d'extrait et céphalines - 28.84 mg/dl d'extrait/ml huile) que *T. pastinaca* (phosphore lipidique - 0.192 mg/dl d'extrait et céphalines - 4.807mg/dl d'extrait/ml huile) (Fig. 1, 2 et 3).

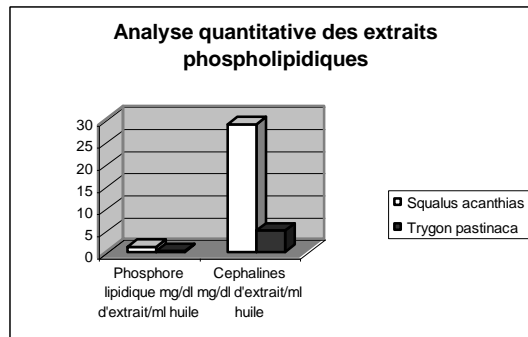


Fig.1 - Analyse quantitative des céphalines des extraits phospholipidiques

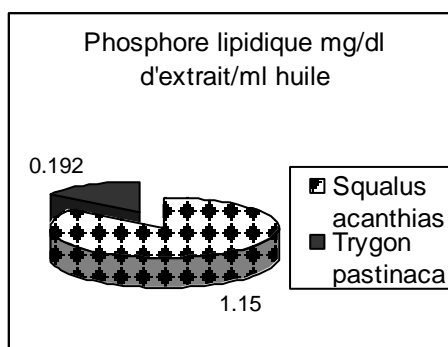


Fig.2 - Analyse quantitative du phosphore lipidique des extraits phospholipidiques

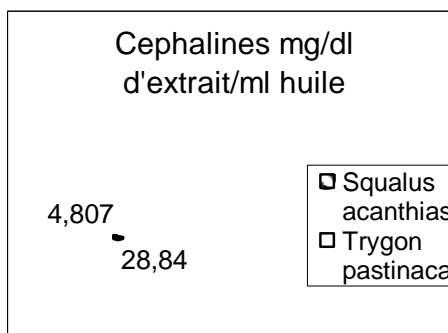


Fig.3 - Analyse quantitative des céphalines des extraits phospholipidiques

CONCLUSIONS

La mixture des phosphatidil éthanolamines et de phosphatidilserines, connue sous le nom de “céphalines” a été mise en évidence et dosée dans les extraits phospholipidiques des huiles isolées du foie des deux espèces de poissons de la mer Noire – *Squalus acanthias* et *Trygon pastinaca*.

BIBLIOGRAPHIE :

- HELMUT K., 1969 - *Aliphatic Lipids in Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*, My Egon Stahl Springer Verlag: 377-380.
- MIHELE D., 2001 - *Biochimie clinica. Compendiu*, Ed. Medicala, Bucuresti: 114-117.
- MOLNAR I.A., MÎRZA M., PANTELI C., 1975 - Sur les fractions lipidiques de *Mya arenaria* L. *Cercetari marine*, IRCM Constanta, **8**: 193-205.

- MOLNAR I.A., MÎRZA M., PANTELI C., 1976 - L'étude des composants métalliques des phospholipides obtenus à partir des mollusques bivalves *Mytilus galloprovincialis* Lmk. et *Mya arenaria* L. *Cercetari marine*, IRCM Constanta, **9**: 239-246.
- MORRIS K., 1975 - *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, (T.Work and E. Work eds.), American Elsevier Publishing Co., Inc., New York: 351-352.
- NEVALAINEN T.J., LLEWELLYN L.E., BENZIL J.A.H., 2001 - Phospholipase A₂ in marine invertebrates. *Rapp.Comm.int.Mer Médit.*, CIESM, **36**: 202.
- ODAGIU A., SALAJAN G., MIERLITA D., DIMA M., 1999 - Researches concerning the possibility of determination of phospholipids content from animal tissue, using as method the total phosphorus determination. *Current problems in cellular and molecular biology*, Ed. Risoprint Cluj-Napoca, **4**: 724-727.
- SERBAN M., ROSOIU N., 1992 - *Substante biologic active din organisme marine*, Ed.Acad. Române, Bucuresti: 104-110.