

Chimia 45 (1991) 342-345
 © Schweiz. Chemiker-Verband; ISSN 0009-4293

Etude de la composition des triglycerides plasmatiques par chromatographie en phase supercritique (SFC)

Luc Graber** et Claude Rohrbasser*

Abstract. The triglycerides were extracted from the human plasma and the composition was determined using SFC method. No noticeable difference was observed in the repartition among normal and high triglycerides levels subjects. There is no evident correlation between the triglycerides composition and a particular pathology.

1. Introduction

Jusqu'à aujourd'hui, les informations concernant la composition des triglycérides sanguins faisaient complètement défaut. La méthode que nous nous proposons d'utiliser permettra d'élucider partiellement le mélange de triglycérides, de fournir un aperçu de la répartition de ces derniers et éventuellement de tirer des conclusions se rapportant à la pathologie associée.

D'un point de vue clinique, l'intérêt se porte premièrement sur la connaissance de la répartition des triglycérides et non sur leur quantification, des tests enzymatiques assurant très bien cette tâche.

2. Matériels

2.1. Produits

Les triglycérides utilisés pour l'élaboration des soln. standards ont été obtenus auprès de la société *Sigma Chemical Co.*, St-Louis. Les solvants utilisés sont tous de type HPLC, ils ont été commandés auprès de *Riedel De-Haen AG*. Ils ont été conservés sur tamis moléculaire 4 Å.

2.2. Appareillages

La séparation des triglycérides par SFC a été réalisée à l'aide du système *Carlo-Erba SFC3000* avec injecteur manuel, la colonne chromatographique est de type capillaire (50 µm/0.2 µm) d'une longueur de 10 m comportant une phase stationnaire *DB-5* (phényle/méthyle) *Durabound* chimiquement liée fournie par *J&W Scientific Ca.*

L'acquisition et le traitement des données ont été effectuées sur *IBM PC-XT 286* à l'aide des logiciels *Maxima 3.3* et *Lotus 1-2-3 2.0*.

L'extraction des triglycérides du sérum a été rendue possible par l'utilisation d'un appareil *Vac-Elut* et de colonnes d'extraction solide-liquide *Bond-Elut* utilisant un adsorbant de silice greffée portant des groupe-

ments aminopropyles, conditionné en colonne de 500 mg et 100 mg produit par *Analytichem International Inc. Ca.*

2.3. Spécimen

Les sérums utilisés durant cette étude ont été fournis par le laboratoire de chimie clinique de l'hôpital de Fribourg CH (Dr. *F. Perriard*), leur collecte s'est effectuée selon les normes standards en application. Ils proviennent de patients anonymes en traitement à l'hôpital sus-mentionné. Les patients présentaient des cas



Luc-André Graber (20 août 1964).

Etudes:

- 1974-1980 Collège secondaire de Payerne section Mathématiques-Sciences
- 4 juillet 1980 Certificat d'études secondaires section Math.-Sciences (C)
- 1980-1984 Gymnase cantonal d'Yverdon (CESSNOV) section C
- 6 juillet 1984 Baccalauréat ès sciences Maturité fédérale type C
- 1984-1986 Immatriculation EPFL section chimie
- 1986-1990 Ecole d'ingénieurs de Fribourg (EIF), section chimie
- 10 novembre 1990 Diplôme de chimiste ETS

Expériences professionnelles:

- 9.88-3.89 Stage développement agrochimique *Ciba-Geigy*, Monthey.
- 3.89-6.89 Stage synthèse organique EIF
- 12.90-3.91 Collaborateur scientifique à l'EIF, prof. *C. Rohrbasser*.

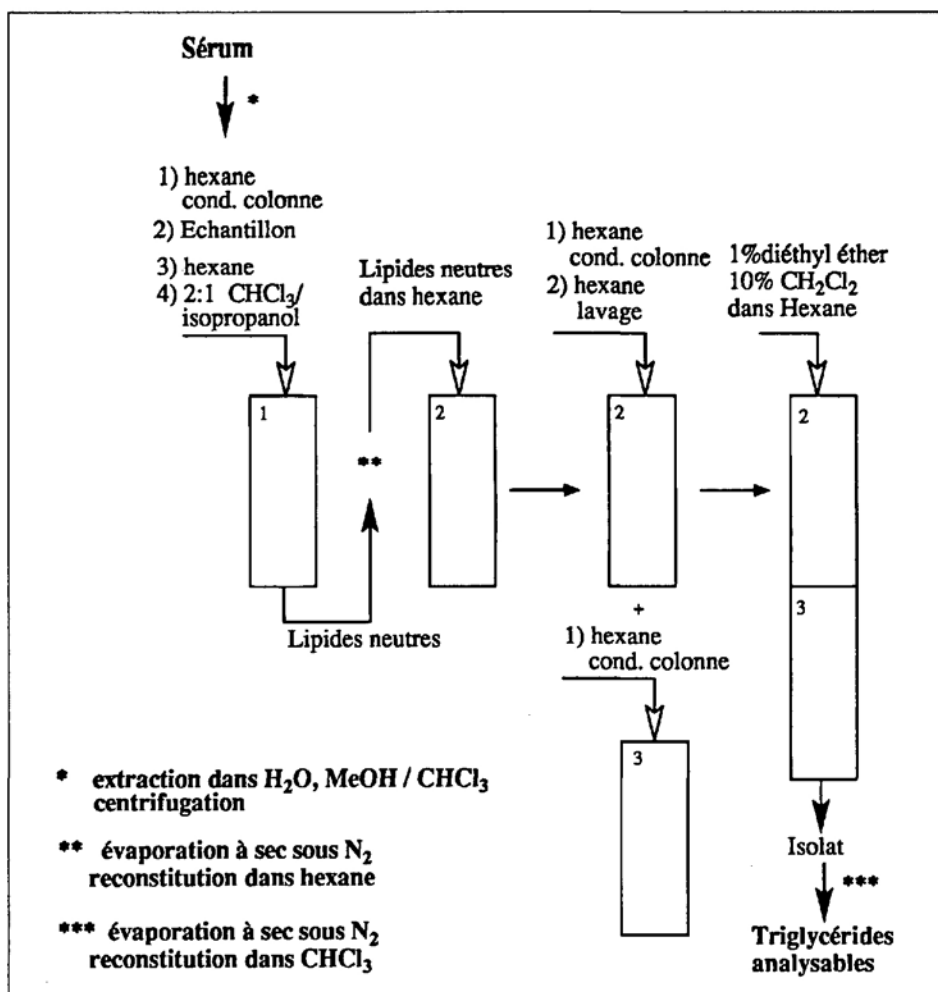


Fig. 1. Procédé d'extraction des triglycérides à partir d'un sérum humain par l'utilisation de colonnes greffées amino-propyles

*Correspondance: Dr. C. Rohrbasser
 Ecole d'ingénieurs de Fribourg
 Section de chimie
 4, rue du Musée, CH-1700 Fribourg

** Prix Max Lüthi 1991 de l'Association Suisse des Chimistes.

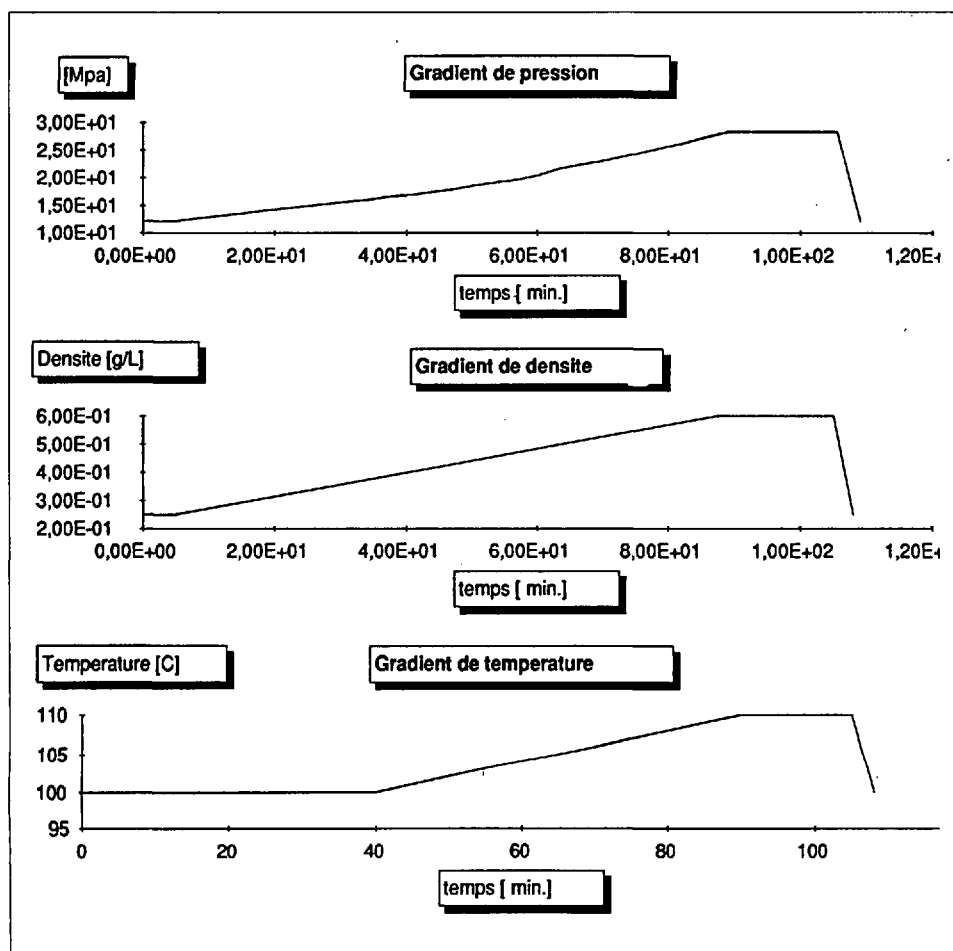


Fig. 2. Programme de température, pression, densité utilisé pour la séparation chromatographique. Le paramètre est calculé à partir des variables choisies température, densité

g/lmin compris entre 250 g/l et 600 g/l débutant 5 min après le début du cycle d'analyse auquel nous avons surimposé un gradient linéaire de temp. de pente 0.2°/min débutant 40 min après le début de l'analyse et faisant passer la temp. de 100 à 110°. Ces conditions ont été déterminées empiriquement en utilisant les produits standards. Le gradient de temp. a été rendu nécessaire pour l'obtention d'une bonne résolution (>1) des triglycérides de poids moléculaire important (>600).

4. Resultats

4.1. Chromatographie

Comme on peut le constater ci-dessous (fig. 3) la séparation d'un mélange synthétique de triglycérides provenant de standards purs contenant les composés comportant trois esters saturés identiques de la tricaproïne (C6 pM 386.53) à la tristéarine (C18 pM 891.51) ainsi que les composés comportant un mélange d'esters, de masse molaire intermédiaire, soient: le 1,2-dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycérol (C12:0, C12:0, C14:0) pM 667.1, le 1,2-dimyristoyl-3-l-auroyl-rac-glycérol (C12:0, C14:0, C14:0) pM 695.1, le 1,2-dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycérol (C14:0, C14:0, C16:0) pM 751.2, le 1,2-dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycérol (C16:0, C16:0, C14:0) pM 779.3, le 1,2-distéaroyl-3-myristoyl-rac-glycérol (C18:0, C18:0, C14:0) pM 835.4, le 1,2-distéaroyl-3-palmitoyl-rac-glycérol (C18:0, C18:0, C16:0) pM 863.4, a été réalisée avec, pour chaque pic, une résolution supérieure à 1. On notera que l'ordre d'éluion des divers produits correspond à l'ordre ascendant des masses molaires des différents triglycérides.

4.2. Sérum

Une distribution moyenne des triglycérides a été établie à l'aide d'un pool de sérums issus de personnes normales (figs. 4 et 5).

d'hypertriglycéridémies plus ou moins prononcées (de 5 à 70 mm/l), d'hypercholestérolémie (de 3.3 à 7.8 mm/l), d'hyperglycémie (de 10.5 à 20.6 mm/l) et quelques cas de dysfonctionnement du foie présentant un taux élevé de gamma-GT (de 325 à 1709 U.I.). Les doses de sérums destinés à l'analyse ont été stockées dans des tubes en verre de 15 ml centrifugeables et hermétiquement clos, puis congelés jusqu'à leur utilisation.

num de CHCl₃ (200 µl) afin de procéder à l'injection de l'échantillon (fig. 1).

Chaque étape de l'extraction peut être contrôlée par TLC. Solvant: AcOH/Et₂O/hexane (1:30:70 v/v/v) révélateur: spray 3.5% acide phosphomolybdique; plaques: 10/10 cm silica gel G W 254.

3. Méthodes

3.1. Extraction

Pour un volume de sérum contenant environ 1 mg de triglycérides totaux (TG), déterminé par test enzymatique, nous ajoutons 1.5 fois ce volume de CHCl₃ et de MeOH, puis 0.1 ml d'une soln. 1 g/l de nonanoïne (C9) dans CHCl₃ utilisé comme standard interne et destiné à évaluer le rendement de l'extraction. Après 15 min de centrifugation, la phase inférieure est récupérée et passée sur la première colonne d'extraction (500 mg) préalablement conditionnée par 4 ml de hexane. Nous procédons au lavage de la colonne par 2 ml de hexane puis à l'éluion de l'échantillon par 4 ml d'un mélange 2:1 (v/v) de CHCl₃ et de i-PrOH. La présence d'eau dans la phase org. peut entraîner la non rétention des lipides neutres. En général, une partie de ces lipides (esters de cholestéryle et triglycérides) est éluée durant le lavage, le reste (cholestérol, mono-, di-, triglycéride) est entraîné par le solvant d'éluion. Après évaporation sous N₂ et à temp. amb., l'échantillon est reconstitué dans un volume minimum de hexane. Il est ensuite passé sur la seconde colonne (100 mg) préconditionnée par 1 ml de hexane, celle-ci est ensuite lavée par 1 ml de hexane. Nous fixons sous cette seconde colonne, une troisième préconditionnée par 1 ml de hexane, et procédons à l'éluion des TG par 2 puis 6 ml d'une soln. 1% (v/v) Et₂O, 10% (v/v) CH₂Cl₂ dans l'hexane. Cette éluion fractionnée permet l'élimination dans la première fraction des esters de cholestéryles résiduels. On notera, cependant, la coélution d'une très faible part des TG. La seconde fraction est évaporée à sec sous N₂ et à basse temp., puis reconstituée dans un volume mini-

3.2. Chromatographie

Nous avons utilisé les conditions d'analyse suivantes (fig. 2), un gradient de densité linéaire de pente 0.004

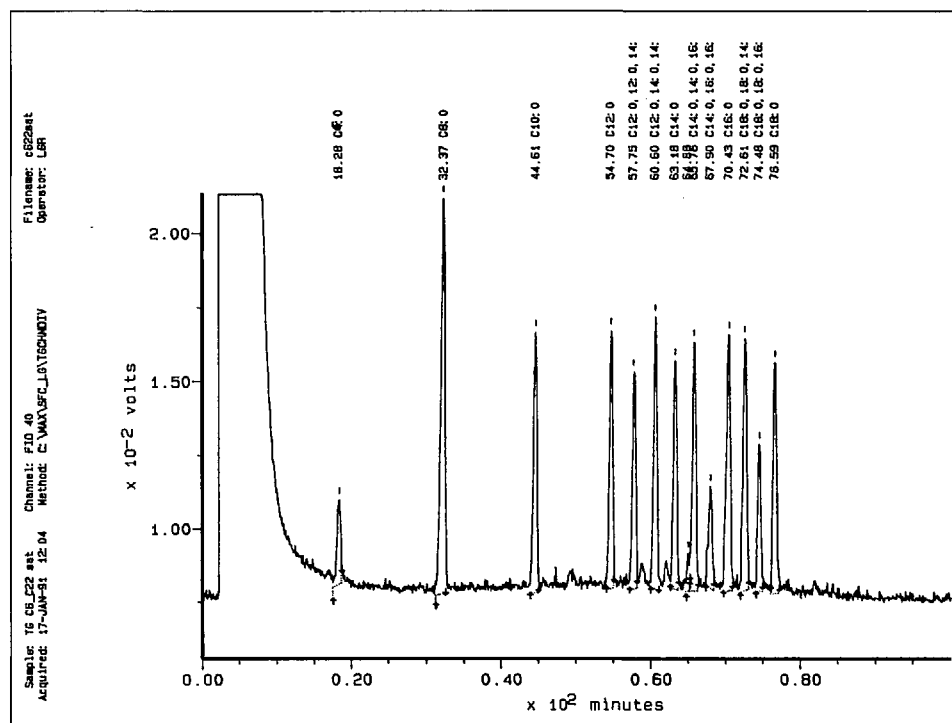


Fig. 3. Mélange de triglycérides purs de C6 à C18

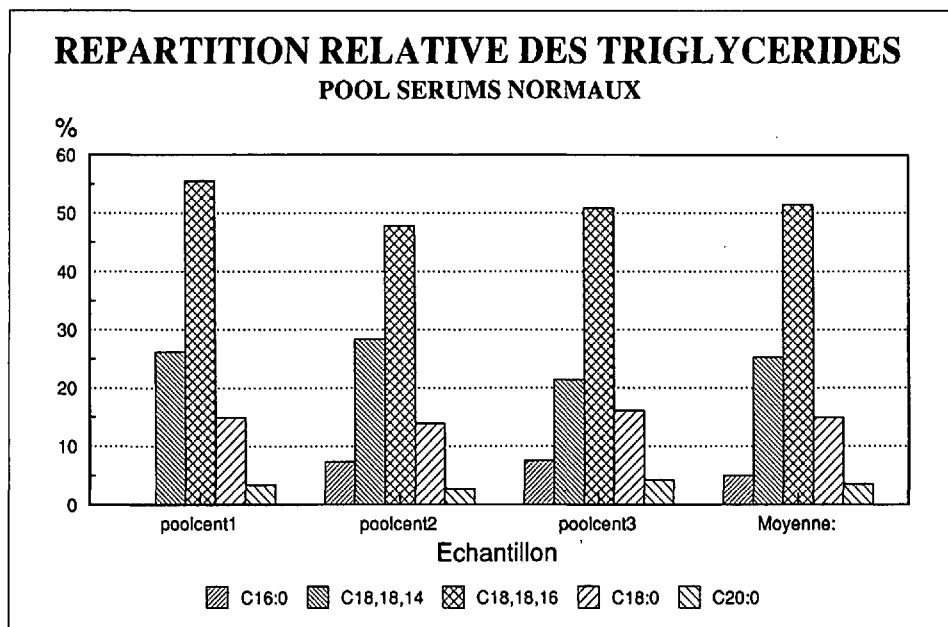


Fig. 4. Pool de sérums issus de patients ne présentant pas d'hyperlipémie, composition moyenne

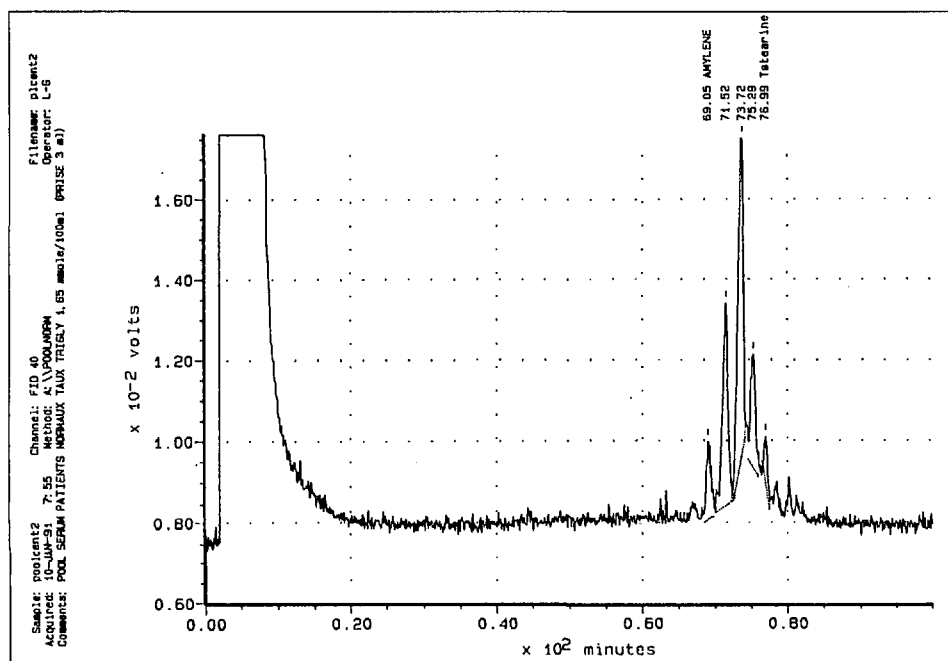


Fig. 5. Chromatogramme du pool de référence

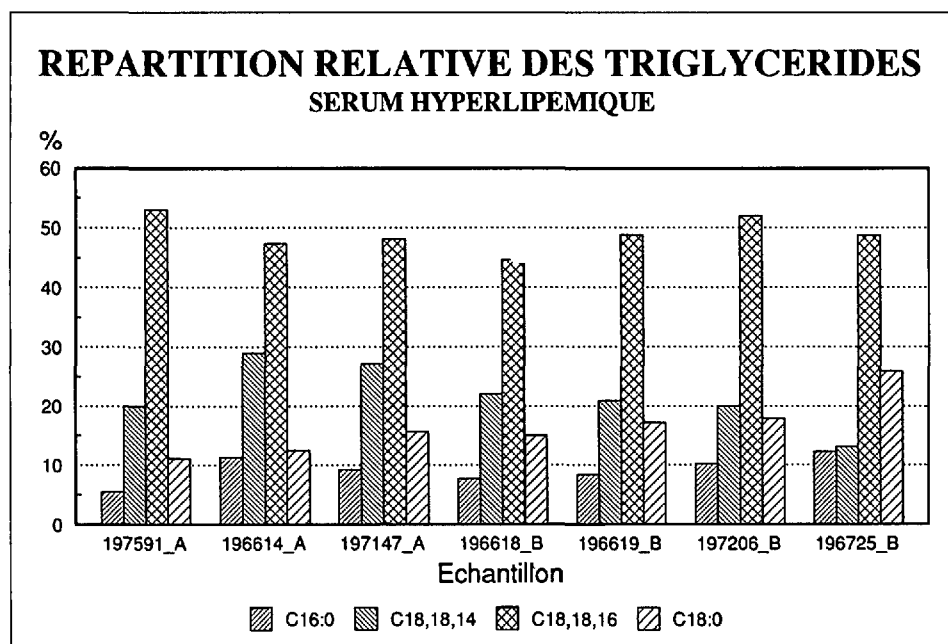


Fig. 6. Répartition des différents triglycérides dans des sérums hyperlipémiques

Comme on le constate ci-dessous, cette distribution moyenne se rapproche fortement des différents cas observés.

L'examen des chromatogrammes obtenus à partir de cas d'hypertriglycéridémies a montré la similitude de la composition et de la répartition relative des différents triglycérides présents dans le sérum pour tous les cas analysés (figs. 6 et 7). On notera la prépondérance des composés (C18:0, C18:0, C16:0), 45 à 55% du total, (C18:0, C18:0, C14:0) 20 à 27%, et de la tristéarine de 12 à 18% du mélange. On voit que ces trois produits forment à eux seuls de 78 à pratiquement 100% de la quantité de triglycérides présents dans le sérum. Il faut, de plus, remarquer qu'il existe une corrélation directe entre le pourcentage total de ces trois composés principaux et le taux de l'hypertriglycéridémie et/ou cholestérolémie.

Quelques cas de dysfonction du foie (figs. 8 et 9) ont montrés le même type de profil triglycéridémique alors que les patients en question ne présentaient pas d'hyperlipémie mais un taux de gamma-GT supérieur à la norme.

Les cas d'hyperglycémie examinés n'ont pas permis de tirer une conclusion claire, vu le petit nombre de sérums particuliers analysés. On observe cependant une composition similaire du mélange de triglycérides, bien que les rapports des différents produits présentent une distribution qui n'est pas fixe.

5. Commentaires

5.1. Extraction

Cette méthode très délicate à mettre en œuvre est fiable du point de vue de la composition des triglycérides. C'est à dire que les quantités relatives des produits sont conservées au cours du procédé d'extraction. On n'observe aucune extraction sélective de l'un ou l'autre des triglycérides soit dans les échantillons de sérum soit dans les mélanges synthétiques réalisés à l'aide des standards purs.

Cependant, d'un point de vue quantitatif, la récupération des produits extraits reste peu reproductible, l'exécution de l'extraction nécessitant un matériel bien adapté, ainsi qu'un savoir-faire très important. Cette méthode d'extraction nécessite une très grande précision dans le dosage des mélanges de solvants destinés aux différentes étapes d'extraction. Une faible variation de la polarité du milieu entraîne certainement l'échec de l'opération. De même, si les évaporations n'ont pas été réalisées complètement, en particulier, s'il reste des traces d'eau lors du prétraitement de l'échantillon, on peut être assuré que la rétention des lipides n'aura pas lieu.

Le temps nécessaire à l'accomplissement de l'extraction dépend directement de l'équipement utilisé pour l'évaporation des solvants. La durée de l'extraction peut varier de une à trois h jusqu'à l'obtention de l'échantillon final injectable

La méthode de base a été développée à partir de mélanges de standards purs. Puis sa compatibilité avec des échantillons de tissus de mammifères a été testée sur de l'adipose bovine riche en triglycérides.

On peut supposer que la répartition des classes de lipides présents dans l'échantillon, en particulier la quantité de cholestérol, peut jouer un rôle non négligeable quant à la rétention des tryglycérides, surtout si l'on est proche de la limite de charge des colonnes d'extraction.

6. Conclusion

Si la séparation des différents triglycérides peut être considérée comme bonne, en revanche aucune information nous permettant de distinguer si l'excès de triglycérides est dû à une source endogène ou exogène n'a pu être mis en évidence. Il n'est pas non plus possible à la vue des résultats de relier la composition des triglycérides à une pathologie particulière.

Reçu le 28 juin 1991

[1] R.M. Smith, 'Supercritical fluid chromatography', Royal Society of Chemistry, Chromatography monographs, 1989.
 [2] M.D. Palmieri, *J. Chem. Educ.* **1988**, 65, A254.
 [3] M.D. Palmieri, *J. Chem. Educ.* **1988**, 66, A141.
 [4] D.W. Later, Dj. Bishop, E.D. Lee, J.D. Henion, R.C. Wieboldt, *LC-GC International* **1987**, 1, 36.
 [5] R.D. Smith, R.W. Gale, J.L. Fulton, *LC-GC International* **1988**, 1, 46.
 [6] 'Handbook of sorbent extraction technology', Analytichem International Inc., Harbour City, 1988.
 [7] M.A. Kalzny, L.A. Duncan, M.V. Merritt, D.E. Epps, *J. Lipids Res.* **1985**, 26, 135.
 [8] M.J. Graber, 'Separation of lipids classes from tissues extracts', m289, ICT AG.
 [9] P.A. Harris, 'Rationale of method developement', Analytichem International Inc., Harbour City, 1988.
 [10] Séminaire ICT Bale, juin 1990.

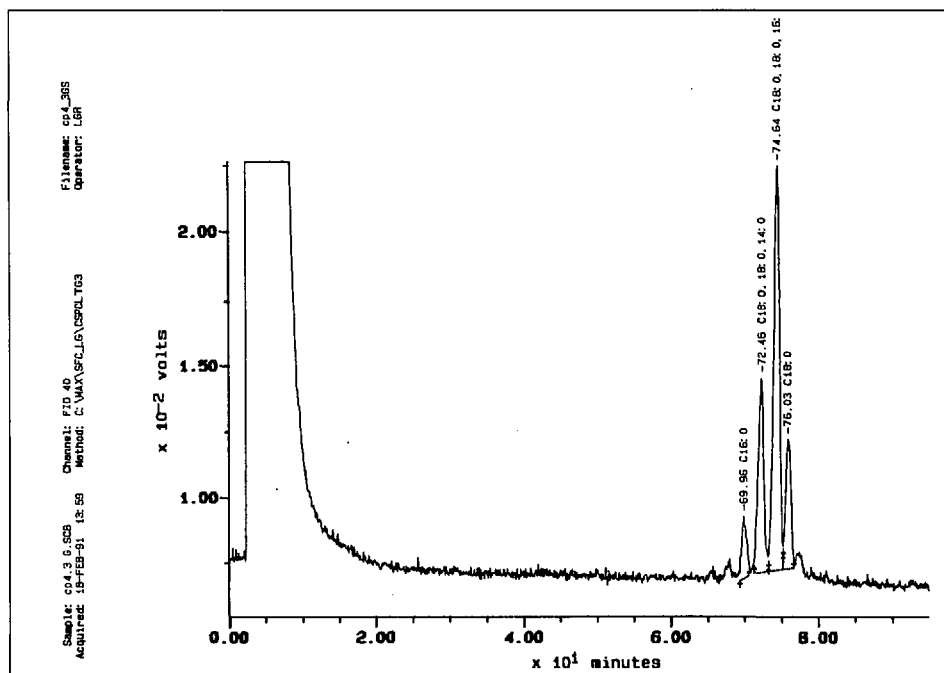


Fig. 7. Chromatogramme d'un sérum de patient fortement hyperlipémique, plus de 50 mmol

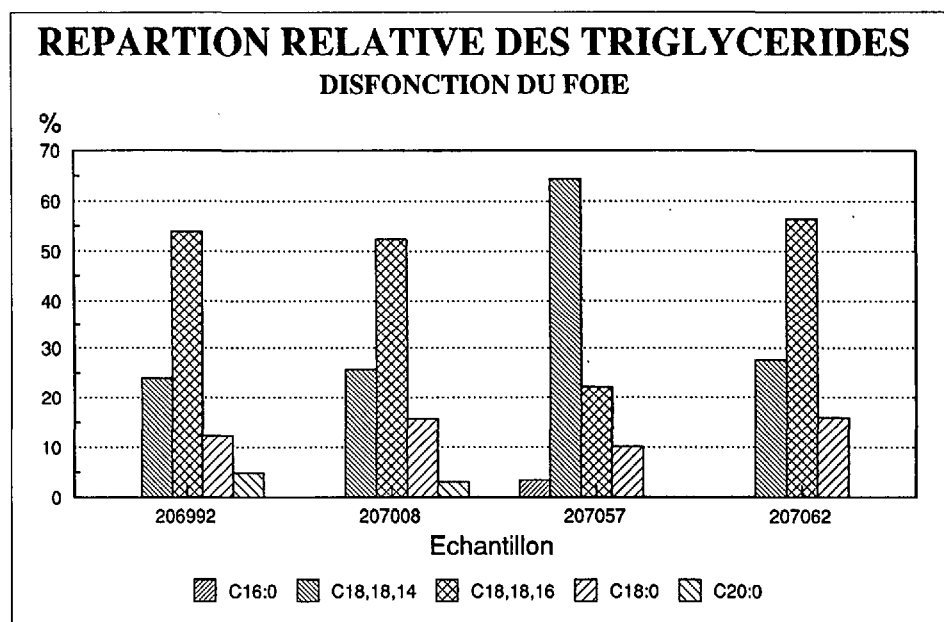


Fig. 8. Répartition des triglycérides dans des sérums comportants un taux de gamma-GT supérieur à la normale

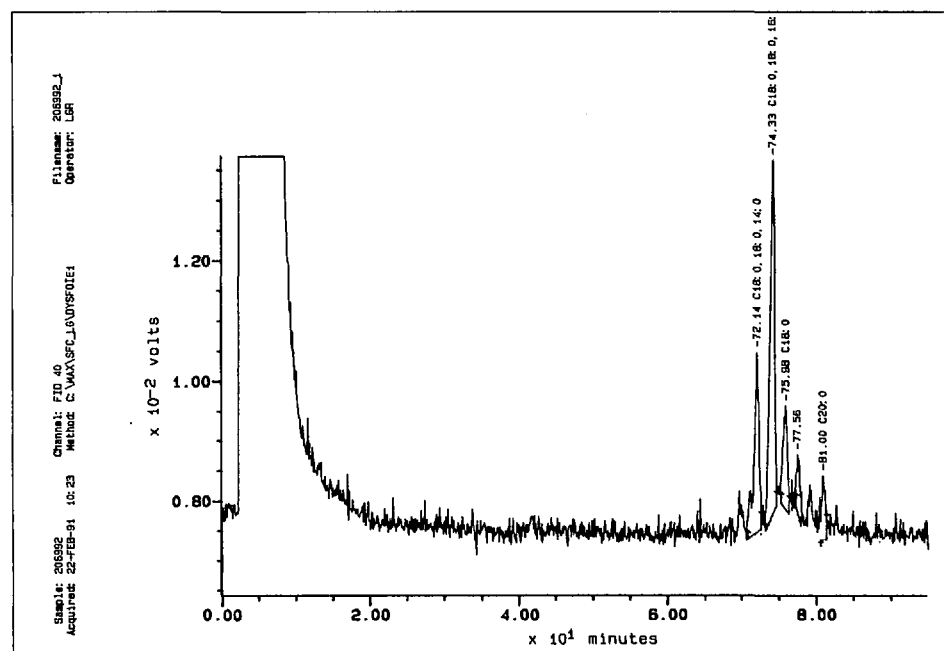


Fig. 9. Chromatogramme d'un patient avec un taux de gamma-GT anormal