

**ESTUDI PER CROMATOGRAFIA GAS-LÍQUID D'ESTERS
METÍLICS D'ÀCIDS GRASSOS D'ADULTS SANS ***

Comunicació presentada el dia 18 de gener de 1973
pels doctors

**C. PASCUAL i MOSTAZA
M. E. CUSÓ i TORELLÓ**

i

A. COROMINAS i VILARDELL

Del Laboratori Central de Bioquímica de la Facultat de Medicina
de la Universitat de Barcelona
(Cap del Servei: Dr. A. Corominas i Vilardell)

* Treball realitzat amb l'ajut 2.2.6. del «III Plan de Desarrollo».

INTRODUCCIÓ

Aquest estudi forma part del programa que té per objecte d'establir els valors normals del lípids del sèrum en persones sanes.

Comparant les diferents classes de lípids sèrics, veiem que uns dels components, els àcids grassos, han estat poc estudiats, probablement a causa de les dificultats de la tècnica i de la poca informació que donen sobre les alteracions del metabolisme lipídic. La cromatografia de gasos només fa possible d'establir un diagnòstic categòric en el cas de la malaltia de Refsum, perquè permet de detectar un àcid gras anòmal anomenat àcid fitànic.

D'altra banda, creiem que l'interès fonamental de l'estudi dels àcids grassos del sèrum està en la variació de la composició d'aquests àcids que té lloc en canviar substancialment la dieta, ja que aquesta afecta directament els nivells de colesterol i triglicèrids, que estan íntimament relacionats amb les malalties que dins la societat occidental causen el nombre més elevat de defuncions, com l'arteriosclerosi i la isquèmia coronària.

La present comunicació la dividim en dues parts: en la primera parlarem de les possibles causes d'error durant el procés analític, i en la segona presentarem els nostres resultats.

POSSIBLES CAUSES D'ERROR EN L'ESTUDI DELS ÀCIDS GRASSOS

Dividim els errors analítics que es poden cometre en tres parts:

- A) *Presa de mostra i conservació.*
- B) *Preparació de la mostra:*
 - a) Extret lipídic.
 - b) Hidròlisi.
 - c) Metilació.
- C) *Cromatografia i càlcul:*
 - a) Introducció de la mostra a l'aparell.
 - b) Càlcul dels cromatogrames.
 - c) Identificació dels diferents àcids grassos presents.

A) Presa de mostra i conservació:

La presa de mostra la fem per punxada a la vena, i és molt important de tenir en compte les condicions de dejuni. En el nostre cas, ha estat establert entre 10 i 12 hores.

Si no és possible de començar a treballar tot seguit, hom pot guardar el sèrum o l'extret lipídic durant uns quants dies, congelat a -20°C .

Avançant-nos una mica, direm que els esters metílics poden ésser conservats a -20°C , sota atmosfera de nitrogen, durant un mes. Nosaltres ho hem provat i no hi hem observat diferències.

B) Preparació de la mostra:

Comprèn diferents passos que estudiarem separatament, bo i procurant de tenir cura de tots els possibles errors i explicant la manera d'evitar-los.

a) Extret lipídic: Seguim el mètode de Folch i Pi. El principal error és d'ordre quantitatiu, puix que hom no pot tenir la seguretat que l'extracció sigui total. En el nostre cas això no és d'una gran importància, perquè es tracta de fer una anàlisi qualitativa i semiquantitativa.

b) Hidròlisi: Per tal d'alliberar els àcids grassos esterificats, sometem l'extret obtingut anteriorment a una hidròlisi amb potassa alcohòlica.

En aquest pas del procés es poden produir pèrdues per ebullició deficient, però, i també en el nostre cas això és més greu, hi ha el perill que la hidròlisi i la saponificació no siguin completes. Mitjançant repetides proves i comprovacions amb cromatografia de capa fina, nosaltres hem arribat a la conclusió que la millor manera de dur a terme aquesta reacció, per tal que sigui total, és tractar l'extret lipídic amb potassa alcohòlica al 10 % durant tres hores a reflux suau. A temperatures inferiors a 100°C , el procés és difícil d'estandarditzar. A més, cal afegir sempre uns mg de pirogallol o bé uns μl . de solució alcohòlica de BHT (2,6-ditert-butil-p-cresol) per tal d'evitar l'oxidació dels àcids presents, puix que aquest és un altre perill existent. Cal tenir en compte, però, que en el cas de fer servir BHT com a antioxidant, posteriorment apareixerà un pic en el cromatograma prop del C_{14} . En la separació dels esterols lliures i extracció dels àcids grassos que segueix la hidròlisi, també es poden produir pèrdues.

c) Metilació: En aquest procés, igual que en el d'abans, la principal causa d'error és que la reacció no sigui total; per exemple, ha estat com-

provat que, en el cas de metilació amb diazometà, cal la presència de metanol lliure, tal com indica SCHLENK segons STEIN i collab.¹¹, contràriament a d'altres autors que diuen que no cal.

D'altra banda, és possible que apareguin pics estranys (artefactes) quan s'empra el mètode de metilació esmentat més amunt. Aquests cossos estranys (polímers i altres compostos desconeguts) poden ésser eliminats per cromatografia en capa fina d'adsorció. Nosaltres hem estudiat aquesta operació, i l'error comès en la recuperació és inferior a l'error del mètode cromatogràfic.

Per aquestes raons i per la rapidesa que comporta, nosaltres utilitzem el complex trifluorur de bor-metanol com a agent de metilació, i fins ara no hem tingut problemes per formació d'artefactes ni per reacció defectuosa.

C) Cromatografia gasosa i càlcul:

Els errors comesos en aquesta darrera etapa de l'anàlisi són els que més hem estudiat i controlat.

Des del començament ja suposem que les condicions de treball són les més convenients: temperatures de forn i de blocs d'injecció prou altes per tal que la vaporització sigui instantània i total, i columna amb un nombre de plats teòrics suficient per a obtenir bones separacions.

Les possibles causes d'error són:

a) *Injecció defectuosa.* Produeix una deformació i un eixamplament dels pics que pot induir a error a l'hora de fer els càlculs. Per tal que una injecció pugui ésser considerada «bona», ha d'ésser molt ràpida i amb un «coixí» d'aire al començament. D'aquesta manera, la mostra entra a la columna amb un «front» uniforme.

b) *Factor de resposta i reproductibilitat de l'aparell.* Les principals causes d'error en una anàlisi amb cromatografia gas-liquid es troben aquí.

En primer lloc, cal treballar en el marge on la resposta del detector és lineal, puix que, en cas contrari, la sensibilitat no seria la mateixa per a les diferents substàncies que conté la barreja injectada i per tant seria errònia la relació entre els % que hom calcularia. Per a treballar dins el marge adequat, cal no introduir una quantitat exagerada de mostra a l'aparell.

A més, en una sèrie d'anàlisis repetides, els resultats obtinguts no sempre coincideixen. Aquest és el problema més difícil de solucionar, per tal com pot ésser degut a diverses causes, tant del detector en si, com de l'amplificador, com del senyal de fons de l'aparell. L'única manera de reduir

els errors comesos és fer proves repetides amb una mateixa mostra i veure la mitjana dels resultats i la desviació que això representa ⁹.

c) *Càlcul dels cromatogrames.* La manera més acurada de mesurar i quantificar els registres gràfics obtinguts, és mitjançant un integrador acoblat directament a la sortida de l'amplificador, però no tothom disposa d'aquest estri.

Per tal de fer un càlcul aproximat de les àrees dels pics, hi ha diferents mètodes, com és ara els de triangulació, rectangulació, tres amplades seleccionades, etc.

En el cas dels esters metílics, la manera d'introduir menys error és utilitzar el mètode de rectangulació, amb el qual hom no calcula l'àrea sinó una magnitud que li és proporcional i, per tant, proporcional a la concentració de cada compost en la mostra.

d) *Identificació.* Hom la fa per mitjà de patrons; de les rectes de calibració obtingudes a partir d'aquests (longitud de cadena equivalent); de diferents índex tabulats (els més coneguts són els de Kovats); etc.

Els errors possibles en aquest darrer estadi del procés són de tipus qualitatiu, i la millor manera d'evitar-los és disposar d'un gran nombre de patrons i comparar-los amb els resultats que es troben a la bibliografia per tal de poder confirmar les hipòtesis fetes.

PROVES DUTES A TERME PER A ESTUDIAR ELS ERRORS

Per tal de trobar l'error mitjà que hom pot cometre durant tot el procés analític que hem descrit, des de la presa de mostra fins a la introducció en el cromatògraf i el càlcul posterior, nosaltres hem fet una sèrie de 9 estudis amb el mateix sèrum i seguint en tots els casos un procediment idèntic d'anàlisi. Els valors obtinguts per als diferents àcids grassos, i els errors totals corresponents, són els següents:

Àcid	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:3}	C _{20:4}
Valor mitjà	0,20	1,13	22,62	2,10	7,94	24,24	29,23	1,63	7,25
D. S.	0,13	0,11	0,45	0,14	0,91	0,40	1,84	0,47	0,42
L. C. 95 %	0,09	0,08	0,33	0,10	0,68	1,05	1,38	0,35	0,31

Aquests resultats creiem que són molt interessants, puix que hom pot veure que les desviacions standard i els límits de confiança presenten un valor bastant baixos. L'error relatiu que això suposa només és més gran del 5 % en el cas dels components minoritaris i en l'àcid esteàric (de l'ordre del 8 %), la qual cosa és bastant lògica, per tal com els pics petits són els més difícils de mesurar amb precisió.

D'això concloem que els mètodes emprats per a fer aquestes determinacions són correctes.

RESULTATS OBTINGUTS EN L'ESTUDI DELS ÀCIDS GRASSOS DEL SÈRUM

Hom ha procedit a l'estudi dels esters metílics dels àcids grassos totals i dels glicèrids del sèrum de 50 adults sans d'ambdós sexes, compresos entre els 15 anys i els 74 anys d'edat. Nosaltres considerem sa aquell individu que no és obès i que, en ésser interrogat, diu que no ha tingut recentment cap malaltia; n'excloem les dones embarassades i les que prenen hormones sexuals, per tal com està ben demostrat que, en tots dos casos, resta afectat el metabolisme lipídic.

Els 50 adults que abans hem esmentat han estat distribuïts així:

21 homes compresos entre els 17-65 anys i 30 dones compreses entre 15-74 anys. Els resultats obtinguts han estat els següents:

— Àcids grassos totals:

Els components majoritaris son: l'àcid palmític ($24,00 \pm 8,06 \%$), l'oleic ($24,55 \pm 9,14 \%$) i el linoleic ($24,83 \pm 14,88 \%$); en proporció més petita hem trobat: esteàric ($10,72 \pm 5,50 \%$) i araquidònic ($6,38 \pm 5,36 \%$), i, en proporció encara més petita; palmitoleic ($2,57 \pm 1,80 \%$), mirístic ($1,32 \pm 1,21 \%$) i eicosatrienoic ($1,44 \pm 2,68 \%$); en proporcions inferiors a $1,1 \%$ tenim el làuric, els C_{17} i altres no identificats.

— Àcids grassos dels glicèrids:

Els majoritaris són: oleic ($32,95 \pm 15,06 \%$) i palmític ($24,39 \pm 7,16 \%$); en proporció mitjana trobem linoleic ($17,16 \pm 7,88 \%$) i esteàric ($9,81 \pm 6,38 \%$); en proporcions encara més petites, mirístic ($2,38 \pm 2,18 \%$) i araquidònic ($2,22 \pm 4,8 \%$); i finalment, en proporcions inferiors a 1% : làuric, C_{17} , $C_{17:1}$ i d'altres.

Cal fer un comentari a part de l'àcid araquídic (C_{20}), puix que en alguns sèrums n'hem trobat en proporcions molt elevades; la proporció més gran de totes fou trobada en uns glicèrids que tenien un 45% d'araquídic. Per tal d'assegurar-nos que no es tractava d'un artefacte, fou cromatografiada la mostra per cromatografia en capa fina d'adsorció, per tal de purificar-la. Aquesta operació no eliminà l'esmentat àcid gras. En un dels casos hom pogué estudiar, cinc mesos després, el sèrum de la mateixa persona, i hi fou trobat un nivell absolutament normal. Per tant, hom no pogué

escatir si es tractava d'un àcid o bé d'un artefacte que no podia ésser eliminat per la cromatografia en capa fina. L'estudi d'aquest punt serà motiu d'un proper treball.

Tot seguit parlarem de la influència dels factors dieta, edat i sexe sobre els àcids grassos. De tots tres factors, la dieta és sens dubte el que té una influència més gran sobre la composició del lípids sèrics, i, dins d'aquests, són els glicèrids els més directament influïts. Per això hi hem centrat el nostre treball.

Els estudis duts a terme per ANTONIUS³, AHRENS¹ i BLOMSTRAND⁴ entre 1960 i 1961, ja demostraren que era possible de canviar el patró dels àcids grassos del sèrum, administrant la mateixa dieta durant un temps relativament llarg. D'altra banda, ja el 1959, DOLE i col·lab.⁵ trobaren diferents nivells d'àcid linoleic entre els nord-americans (33,5 %) i els britànics (12,4 %). Ja més recentment, ALLING i col·lab.² han trobat nivells d'àcid linoleic a la població sueca amb les mateixes dades que les que trobaren HALLGREEN i col·lab.⁸ vuit anys abans; segons ALLING aquestes diferències són degudes a l'increment del contingut d'aquest àcid a les margarines sueques, durant el període esmentat.

Abans de passar a l'estudi comparatiu dels resultats obtinguts per nosaltres amb els obtinguts en altres països, diguem que, dissortadament, en alguns treballs no han estat especificats massa bé els mètodes analítics emprats o les característiques dels cromatògrafs, i, en altres, el nombre d'individus estudiat és massa petit per a fer una anàlisi estadística dels resultats. Per aquests motius, només podrem fer l'estudi comparatiu entre els nostres resultats i els obtinguts a Alemanya per SCHRADER^{12, 13, 14}, a Dinamarca per DYERBERG⁶ i a Txecoslovàquia per FELT⁷. Els resultats d'aquests autors es troben recollits a la taula I. A la taula II recollim els nostres resultats donats per al conjunt de la població, per a homes, per a dones i per edats (adults majors de 45 anys i menors). L'estudi de la significació estadística dels diferents resultats considerats, feta mitjançant el test de Student, es troba recollit a la Taula III.

Remarquem que tots els autors troben considerables variacions per a un mateix àcid gras d'un individu a un altre.

De l'estudi d'aquests resultats podem concloure que els patrons dels glicèrids sèrics no tan sols resten afectats quan hom sotmet l'individu a una dieta estrictament controlada, sinó també quan aquest pren una dieta lliure, però que presenta diferències en la seva composició. Aquest seria el cas dels diferents patrons d'àcids grassos dels glicèrids sèrics trobats en els diferents països considerats.

Si recordem la relació entre l'arteriosclerosi i els nivells de lípids sèrics, i entre aquests i la quantitat i qualitat dels greixos ingerits (recordem que els àcids grassos poliinsaturats fan baixar el nivell de colesterol) po-

TAULA I

Comparació dels resultats obtinguts per autors de diferents països en l'estudi dels àcids grassos dels glicèrids

AUTOR	PAIS	NOMBRE D'OBSERVACIONS	SEXE	EDAT	ÀCIDS GRASSOS (%)							
					C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:3}	C _{20:4}
SCHRADER (1960)	Alemanya	16	♂ i ♀	18-43 a.	1,59	28,13	7,60	3,70	36,80	12,24	0,87	3,06
		15	♂ i ♀	46-71 a.	1,77	29,44	7,80	4,25	36,11	10,91	1,05	2,33
BANG (1968)	P. Baixos	10	♀	35-62 a.	1,80	27,30	5,20	5,50	35,50	14,50		
		18	♂	23-69 a.	1,40	29,40	5,70	6,10	42,40	11,30		
DYERBERG (1968)	P. Baixos	31	♂ i ♀	25-71 a.	1,50	28,30	5,60	5,80	39,70	12,60	0,30	0,10
		25	♂ i ♀	mitjana 40 a	1,60	26,10	5,80	4,80	45,40	15,00		
FELT (1968)	Txecosl.	25	♂ i ♀	mitjana 40 a	1,60	26,10	5,80	4,80	45,40	15,00		

TAULA II/a

*Àcids grassos del sèrum **

	TOTALS	GLICÈRIDS
C ₁₄	1,32 ± 1,21	2,38 ± 2,18
C ₁₆	24,00 ± 8,06	24,39 ± 7,16
C _{16:1}	2,57 ± 1,80	4,00 ± 2,44
C ₁₈	10,72 ± 5,50	9,81 ± 6,38
C _{18:1}	24,55 ± 9,14	32,95 ± 15,06
C _{18:2}	24,83 ± 14,88	17,19 ± 7,88
C _{20:3}	1,44 ± 2,68	< 1,00
C _{20:4}	6,38 ± 5,36	2,22 ± 4,80

* Valors percentuals ± 2. D. S.

drem calibrar l'interès que presenta l'estudi de les modificacions que poden produir-se, tant en quantitat com en composició, en els diferents lípids sèrics, en variar la dieta.

Per finalitzar, tractarem breument dels factors edat i sexe. Nosaltres no hem trobat cap diferència entre els valors mitjans d'homes i de dones. Tampoc no hem trobat variació de la composició del greixos amb l'edat. SCHRADE^{12, 13, 14} ha trobat que l'augment dels triglicèrics amb l'edat es tradueix en un valor més gran dels àcids grassos saturats (esteàric i palmític) que dels insaturats, principalment linoleic i araquidònic. BAKER trobà diferències significatives entre homes i dones; aquestes darreres tenien nivells de mirístic, palmític, palmitoleic i oleic més baixos que els homes. Els experiments d'INSULL¹⁰ sobre la composició del teixit adipós humà, el portaren a concloure que l'edat i el sexe afecten poc la composició dels triglicèrids del teixit esmentat i que aquesta depèn fonamentalment de la dieta.

TAULA II/b

Experiència personal: Valors dels diferents àcids grassos de glicèrids

NOMBRE D'OBSERVACIONS	SEXE	EDAT	ÀCIDS GRASSOS (%)							
			C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:3}	C _{20:4}
51	♂ i ♀	15-74 a.	2,38	24,39	4,07	9,81	32,95	17,19	0,36	2,22
21	♂	17-71 a.	2,82	25,46	4,23	10,45	31,19	17,81	0,33	2,39
30	♀	15-74 a.	2,08	23,31	3,80	9,20	33,62	16,76	0,41	2,11
32	♂ i ♀	15-45 a.	2,54	24,36	4,07	9,73	34,39	16,21	0,28	1,78
17	♂ i ♀	45-74 a.	2,22	23,68	4,07	9,86	30,35	17,68	0,45	3,09

TAULA III

Diferències entre els resultats de diferents autors

AUTOR	ACIDS GRASSOS (%)							
	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:4}	
DYERBERG - FELT	N. S.	++	N. S.	+	+++	++	+++	
DYERBERG - E. P.	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	
FELT - E. P.	++	+	+++	+++	+++	N. S.		
SCHRADE - E. P. (45 a.)	++	++	+++	+++	N. S.	+		
SCHRADE - E. P. (45 a.)	N. S.	+++	+++	+++	+	++	N. S.	

N. S. No significatiu.
 + Significatiu.
 ++ Molt significatiu.
 +++ Altament significatiu.

BIBLIOGRAFIA

1. AHRENS, E. H., JR., INSULL, W., JR., HIRSCH, J., STOFFEL, W., PETERSON, M. L., FARQUHAR, J. W., MILLER, T. i THOMASSON, H. J.: *The effect on human serum lipids of a dietary fat, highly unsaturated but poor essential fatty acids.* «Lancet», 1: 115 (1959).
2. ALLING, C., DEUCKER, S. J., SVENNERHOLM, L. i TICHY, J.: *Serum lipids in chronic alcoholics.* «Lancet», 2: 312 (1967).
3. ANTONIIS, A. i BERSCHN, I.: *The influence of diet on serum triglycerides.* «Lancet», 1: 3 (1961).
4. BLOMSTRAND, D. i DAHLBACK, O.: *The Fatty acid composition of Human thoracic duct lymph lipids.* «J. Clin. Invest.», 39: 1185 (1960).
5. DOLE, V. P., JAMES, A. T., WEBB, J. P. W., RIZACK, M. A. i SURMAN, M. F.: *The Fatty Acid Patterns of Plasma during alimentary lipemias.* «J. Clin. Invest.», 38: 1544 (1959).
6. DYERBERG, J.: *Fatty Acid composition of the Plasma lipids in hypothyroid subjects.* «Acta Med. Scand.», 184: 441 (1968).
7. FELT, V. i HUSEK, P.: *Fatty Acid composition of Serum lipid fractions in Thyroid disease.* «Clin. Chim. Acta», 23: 331 (1969).
8. HALLGREEN, B., STENHAGEN, S., SVANBORG, A. i SVENNERHOLM, L.: *Gas-Chromatographic Analysis of the Fatty Acids composition of the Plasma lipids in normal and diabetic subjects.* «J. Clin. Invest.», 39: 1424 (1960).
9. HINCHEN, J. D.: *Statistic in Analytical Chemistry.* «J. Gas Chrom.», 5: 642 (1967).
10. INSULL, W. JR. i BARTSCH, G. E.: *Fatty Acid composition of Human adipose tissue related to age, sex and race.* «Am. J. Clin. Nutr.», 20: 13 (1967).
11. STEIN i colab.: *Gas-liquid Chromatography of Fatty Acid and derivatives. Lipid Chromatographic Analysis.* Vol. 1. Ed. G. Marinetti, M. Dekker, Nova York (1967).
12. SCHRADER, W., BOHLE, E., BIEGLER, R., MEDER, V. i TEICKER, R.: *Gas-chromatographische Untersuchungen der Serumfettsäuren des Menschen. I Mitt.: Über die Fettsäurenzusammensetzung des Serumfettes beim Gesunden, Arteriosklerotiker und Diabetiker.* «Klin. Wschr.», 38: 126 (1960).
13. SCHRADER, W., BOHLE, E., BIEGLER, R., MEDER, V. i TEICKER, R.: *Gas-chromatographische Untersuchungen der Serumfettsäuren des Menschen. III Mitt.: Die Fettsäuren der Cholesterinester, Phospholipide und Triglyceride, sowie die unverstärkten Fettsäuren bei Gesunden und Arteriosklerosekranken.* «Klin. Wschr.» 38: 739 (1960).
14. SCHRADER, W., BOHLE, E., BIEGLER, R. i HARMUTH, E.: *Fatty Acid composition of lipid fraction in Diabetic Serum.* «Lancet», 1: 285 (1963).