

# 脂肪酸代谢预处理及其检测方法的研究进展

李美艳<sup>1,2</sup>, 赵庆豪<sup>3</sup>, 刘丽清<sup>1</sup>综述, 王爱武<sup>1,2,△</sup>审校(1. 山东大学附属省立医院, 济南 250021; 2. 山东中医药大学, 济南 250355; 3. 山东大学医学院, 济南 250021)

【关键词】 脂肪酸代谢; 前处理方法; 甲酯化方法; 色谱分析

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 06. 055 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)06-0848-02

脂肪酸是指一端含有一个羧基的长的脂肪族碳氢链, 是机体主要能量来源之一。脂肪酸根据碳链的长短可分为短链、中链、长链脂肪酸; 根据饱和度的不同可分为饱和、单不饱和、多不饱和脂肪酸。人和动物体内脂肪酸主要是长链脂肪酸, 其来源一是机体自身合成, 二是食物供给。脂肪酸在生命过程中具有非常重要的作用。研究表明, 诸如高血压、血脂紊乱、肥胖、胰岛素抵抗、心脑血管疾病及肿瘤等多种疾病都与脂肪酸代谢异常有关<sup>[1-4]</sup>, 因而脂肪酸代谢的研究越来越受到重视。本文对脂肪酸代谢检测常用的前处理方法、甲酯化方法及色谱分析条件等综述如下。

## 1 脂肪酸代谢检测的前处理方法

**1.1 动物组织脂肪酸检测的前处理** 组织脂质的提取方法多采用经典的 Folch 法, 具体方法是首先称取一定量的组织, 加入一定的氯仿/甲醇混合溶剂进行匀浆, 再加入蒸馏水离心处理<sup>[5]</sup>。也有研究者先用生理盐水进行匀浆, 再用氯仿/甲醇进行脂质提取。禹晓等<sup>[6]</sup>研究  $\alpha$ -亚麻酸对高脂模型大鼠组织脂肪酸代谢的影响。称取 0.10 g 组织(肝脏、脑、肾及心), 放入玻璃手动均质器中, 加入 5 mL 氯仿/甲醇(2:1), 缓慢均质 1 min, 过滤定容至 5 mL。再加 1 mL 蒸馏水混匀, 3 000 r/min 离心 15 min, 除去溶剂上相, 再用氯仿/甲醇/水(3:48:47)冲洗溶剂界面 3 次, 下相及部分冲洗液加入甲醇后融为一相, 氮气( $N_2$ )吹干,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存至分析。张侃等<sup>[7]</sup>对大鼠脑组织中必需脂肪酸进行研究。称取脑组织 5 g, 加入 3 mL 氯仿/甲醇(1:2), 搅拌 2 min, 加氯仿 5 mL 搅拌 30 s。再加蒸馏水 5 mL 搅拌 30 s, 抽滤, 用少量氯仿洗涤残渣。所得滤液静置分层, 分离, 得油层待酯化分析用。李霖<sup>[8]</sup>选用  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存下的 80~120 mg 大鼠肝脏组织放入匀浆器中, 加 1 mL 生理盐水研磨成匀浆, 分两次加氯仿 2 mL, 甲醇 1 mL, 合并 2 次提取液, 下相用  $N_2$  吹干后置  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存备用。

**1.2 血清脂肪酸检测的前处理** 血清中的游离脂肪酸能初步反映机体代谢是否紊乱, 且由于血清标本制作过程简单, 关于血清脂肪酸的研究也较多。崔瑞芳<sup>[9]</sup>将收集到的一  $80\text{ }^\circ\text{C}$  保存的血液标本于室温下静置 1 h 凝固后, 在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清, 每份标本 200  $\mu\text{L}$ , 分装后冻存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  备用。宋虎等<sup>[10]</sup>将血清标本 100  $\mu\text{L}$  加入 300  $\mu\text{L}$  氯仿/甲醇(1:3), 涡旋振荡 30 s, 混合液于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  沉淀 10 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  16 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 200  $\mu\text{L}$  待衍生化用。

**1.3 血浆脂肪酸检测的前处理** 血浆中游离脂肪酸的种类和浓度可以反映某些疾病与脂肪酸的关系, 为进一步研究脂肪酸代谢做好基础。谭斌斌<sup>[11]</sup>提取人体血浆中脂肪酸时, 将收集

到的血液标本立即以 3 000 r/min 离心 10 min, 分离所得血浆置  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存待衍生化用。

**1.4 红细胞膜脂肪酸检测的前处理** 红细胞膜是包裹在红细胞外, 具有磷脂双分子层结构的天然生物膜, 虽然其本身并不具有脂质合成的能力, 但其脂质代谢受红细胞生理状态的影响。杨芳等<sup>[12]</sup>吸取血液 500  $\mu\text{L}$ , 按 1:30 比例加入 10 mmol/L pH=7.4 的低渗三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液于 15 mL 试管中, 轻摇混匀后放置  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中溶血后, 于  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 9 000 r/min 离心 30 min, 弃上层血清, 再重复洗涤离心 3 次, 得乳白色红细胞膜。取 100  $\mu\text{L}$  乳白色红细胞膜于 1 mL 磷酸盐缓冲液中, 加入内标十九碳烷酸 500  $\mu\text{L}$  ( $0.1\text{ mg/mL}$ ), 再加入 2 mL 氯仿/甲醇混合液(2:1), 剧烈震荡 1 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取全部氯仿层, 移至玻璃试管,  $N_2$  吹干备用。

**1.5 尿液脂肪酸检测的前处理** 检测尿液中脂肪酸组成具有无创伤性、方便等优点, 尿液常常用于体内脂肪酸的检测。元冬娟等<sup>[13]</sup>取 15 mL 健康人晨尿于 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液 5 mL, 加 15 mL 氯仿/甲醇(2:1)溶液, 涡旋 2 min, 在室温静置 60 min 后取下层至密闭管,  $N_2$  吹干备用。

## 2 甲酯化方法

脂肪酸的甲酯化方法主要包括酸处理法、碱处理法、三氟化硼方法等。不同的甲酯化方法适用对象有所不同, 所用试剂的浓度、甲酯化温度和时间等条件都会影响到脂肪酸的检测。

**2.1 酸处理法** 酸催化法一般采用硫酸-甲醇( $H_2SO_4/MeOH$ )溶液进行甲酯化。李海静等<sup>[14]</sup>取正常人血清 200  $\mu\text{L}$ , 加入 2.5%  $H_2SO_4/MeOH$  溶液 1 mL, 在  $60\text{ }^\circ\text{C}$  条件下水浴 90 min, 加 1.5 mL 生理盐水溶液和 1 mL 正己烷, 振荡混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上层正己烷层  $N_2$  吹干, 正己烷复溶进样。韩莉娟<sup>[15]</sup>将分别含有酯化脂肪酸和非酯化脂肪酸的提取液吹干后, 立即加入衍生化试剂 5%  $H_2SO_4/MeOH$  溶液 500  $\mu\text{L}$ , 密封反应体系中加热至  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , 反应 30 min。待反应完毕后, 放冷至室温, 加入 200  $\mu\text{L}$  的水。以正己烷 500  $\mu\text{L}$  萃取衍生化产物脂肪酸甲酯, 上清液移至进样瓶中, 定容为 500  $\mu\text{L}$ , 待进样分析用。徐小作等<sup>[16]</sup>取血清 0.5 mL, 加入 10%  $H_2SO_4/MeOH$  1 mL, 涡旋振荡混匀, 置  $60\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 1 h, 取出冷至室温, 加入正己烷和饱和氯化钠溶液各 2 mL, 涡旋混匀 3 min, 静置 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层正己烷 1.0 mL,  $N_2$  吹干, 待进样分析用。

**2.2 碱处理法** 碱衍生方法一般常用的为氢氧化钾-甲醇( $KOH-MeOH$ )衍生法。孙莲等<sup>[17]</sup>将芜菁子油 32 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加丙酮定容, 精密吸取 100  $\mu\text{L}$  至刻度试管,  $N_2$  吹

干。加 0.4 mL, 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇(KOH-CH<sub>3</sub>OH)溶液, 60 °C 恒温水浴皂化 30 min, 待油珠完全溶解, N<sub>2</sub> 吹干备用。暴雪等<sup>[18]</sup> 将文冠果种仁油约 80 mg 置 25 mL 量瓶中用丙酮溶解并稀释至刻度。精密量取 50 μL, 加 0.4 mL, 0.5 mol/L KOH-CH<sub>3</sub>OH, 振荡 1 min, 60 °C 水浴 30 min。冷却后, 加异丙醇/正庚烷/冰醋酸(40:10:1)溶液 2.5 mL, 涡旋 1 min, 间断超声 2 min, 室温下放置 10 min, 再精密加正庚烷 1 mL, 水 1.5 mL, 涡旋 1 min, 间断超声 2 min, 离心 10 min 后精密吸取上清液 0.5 mL, N<sub>2</sub> 吹干备用。

**2.3 三氟化硼方法** 三氟化硼方法进行甲酯化时, 一般选用三氟化硼-甲醇(BF<sub>3</sub>/MeOH)溶液。伍金华等<sup>[19]</sup> 优选脂肪酸甲酯化方法, 在甲酯化试管中依次加入 1 mL 正己烷, 80 μL 含十七烷酸甲酯内标物的无水甲醇溶液以及干燥后的细胞膜沉淀物, 混匀后加入 14% 的 BF<sub>3</sub>/MeOH 2 mL, 立刻充氮气密封。在 100 °C 条件下水浴 60 min, 冷却后加入 0.5 mL 的三蒸水, 2 000 r/min 离心 5 min。取上清液, N<sub>2</sub> 流吹下浓缩至 20 μL, -20 °C 保存备用。Abu 等<sup>[20]</sup> 在测量二十碳五烯酸/二十二碳六烯酸指数时, 将血液处理得到的脂肪酸提取液中加入 25% 的 BF<sub>3</sub>/MeOH 溶液 1 mL, 在 80 °C 水浴条件下加热 60 min, 冷却至室温后, 将脂肪酸甲酯萃取到己烷保存备用。

### 3 脂肪酸检测的分析方法

**3.1 气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法** 对于大多数的脂肪和脂肪酸而言, GC-MS 方法是其最佳的分析方法, 也是比较常用的。不同的研究者采用的色谱柱不太相同, 其程序升温等分析条件及检测到的脂肪酸也不同。吴毅等<sup>[21]</sup> 采用 Inowax (0.32 mm×30 m, 0.25 μm) 弹性石英毛细管色谱柱, 程序升温, 初温 110 °C 保持 3 min, 以 2 °C/min 升温至 164 °C, 保持 10 min, 再以 8 °C/min 升温至 210 °C, 保持 10 min。检测到月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、α-亚麻酸、亚油酸、γ-亚油酸等 9 种脂肪酸。芮雯等<sup>[22]</sup> 以 GC-MS 方法, 采用 DB-5 色谱柱(30 m×50 μm×0.25 μm) 色谱柱, 程序升温为 60 °C, 初温保留 2 min, 以 30 °C/min 升至 120 °C, 再以 3 °C/min 升温至 250 °C, 保持 20 min。检测到 14 种脂肪酸成分, 其中蜈蚣藻以棕榈酸为主, 带形蜈蚣藻以二十碳二烯酸为主。王秀琴等<sup>[23]</sup> 用采用 DB-5(60 m×0.25 mm, 0.25 μm) 毛细管色谱柱, 程序升温: 柱起始温度 50 °C, 以 3 °C/min 升到 230 °C 保持 20 min 检测到亚油酸、油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、α-亚麻酸、山萘酸、亚油酸、花生酸、二十碳烯、焦油酸等 11 种脂肪酸成分。

**3.2 高效液相色谱与质谱联用(HPLC-MS)方法** 近年来一些研究者也尝试用 HPLC-MS 方法对某些脂肪酸进行分析。采用柱前衍生-高效液相色谱法检测脂肪酸水平, 可以避免气相色谱法较高柱温引起的成分不稳定。常用的衍生化试剂有二溴苯乙酮、2-硝基苯胍盐酸盐等。王晓丽等<sup>[24]</sup> 以 HPLC-MS 方法, 采用 Kromasil C<sub>8</sub> 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长 254 nm, 以甲醇/乙腈/水(60:30:10)为流动相等度洗脱, 柱温为室温, 流速为 110 mL/min。一次基线分离得到 α-亚麻酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸 4 种脂肪酸, 建立注射用沙棘籽油的脂肪酸水平检测的方法。杨必成等<sup>[25]</sup> 采用 YMCJ, sphere ODS-H<sub>80</sub>(250 mm×4.6 mm, 4 μm) 色谱柱, 乙腈-水梯度洗脱, 体积流量为 1.00 mL/min, ELSD 漂移管温度 85 °C, 气体为空气, 气体体积流量为 3.0 L/min, 柱温为 35 °C。检测到亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸、棕榈酸 4 种脂肪酸化合物。

### 4 小结与展望

本文系统总结了常用的脂肪酸检测的前处理方法、甲酯化方法、定量分析方法。脂肪酸代谢检测的标本包括动物组织、血清、血浆、血红细胞、尿液等标本; 不同的标本前处理方法有所不同, 即使同一标本采用不同的甲酯化方法及分析方法所得的脂肪酸种类和水平也会有所不同。因此, 研究中必须针对不同的实验对象和实验目的进行方法优选。

常用的前处理方法称取一定的组织, 经 Folch 试剂(氯仿/甲醇=2/1)进行匀浆提取脂质。由于用氯仿易挥发, 有研究者先用生理盐水进行匀浆, 再用氯仿/甲醇进行脂质提取。

甲酯化方法有酸处理法、碱处理法和三氟化硼法等, 其中酸处理法既适于游离脂肪酸, 又适合于结合态脂肪酸(脂肪); 碱法甲酯化只适合于脂肪; 由于三氟化硼法很难将脂类完全提取, 不太常用。以硫酸/甲醇溶液进行甲酯化方法最为常用, 以 80 °C 反应 60 min 为最佳反应条件。

脂肪酸分析方法以 GC-MS、HPLC-MS 最为常用。GC-MS 法一般需要先先将脂肪酸采用酸催化法与碱催化法制备脂肪酸甲酯化产物, 具有谱库大, 速度快, 节省流动相, 普通实验室即可实现, 成本低等优点, 因此最为常用, 但此方法具有定量不够准确, 灵敏度欠佳, 稳定性差等缺点; HPLC-MS 法具有较高的灵敏度, 节省了甲酯化处理过程, 近年来比较常用, 但需要采用柱前衍生处理, 衍生过程需在氢氧化钾、冠醚及相转移催化剂的存在下于苯或甲苯中完成, 进样前需进行繁琐的预处理, 费时、费力。

综合文献分析, 临床医学上很多疾病和脂肪酸的变化有密切关系, 肌体器官生理和病理变化往往会引起体内脂肪酸成分的改变, 检测机体中脂肪酸的水平, 对研究不同条件下血脂代谢情况, 诊断某种脂肪酸水平异常引起的疾病以及调整补充肌体所需、改善营养疗效等方面具有重要意义。因此对脂肪酸代谢的检测对及时了解脂肪酸代谢疾病非常重要, 更方便、快捷、准确的脂肪酸检测方法还有待研究者的进一步探讨。

### 参考文献

- [1] Suburu J, Gu Z, Chen H. Fatty acid metabolism: Implications for diet, genetic variation, and disease[J]. Food Bioscience, 2013, 12(4): 1-12.
- [2] Murphy RA, Mourtzakis M, Mazurak VC. N-3 polyunsaturated fatty acids: The potential role for supplementation in cancer[J]. Curr Opin Clin Nutr, 2012, 3(15): 246-251.
- [3] 马晓丽, 田兰, 李琳琳, 等. 基于气相色谱的血清中游离脂肪酸代谢轮廓分析区分糖尿病与正常人[J]. 分析科学学报, 2013, 5(29): 615-620.
- [4] Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJ, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review [J]. Diabet Med, 2012, 29(5): 567-577.
- [5] Sin HG, Jens R, Francisco J, et al. Accumulation of retinol in the liver after prolonged hyporetinolemia in the vitamin A-sufficient rat [J]. J Lipid Res, 2005, 46(4): 641-649.
- [6] 禹晓, 邓乾春, 黄凤洪, 等. α-亚麻酸对高脂模型大鼠组织脂肪酸代谢的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 25-34.
- [7] 张侃, 曾琳, 龙在云, 等. 必需脂肪酸对大(下转第 863 页)

### 3 讨 论

目前 ICG 在眼科的用途越来越广泛,在超生乳化手术、视网膜手术及 ICG 介导的激光治疗等方面得到了空前的发展<sup>[5]</sup>。ICG 无毒、药物安全性良好,其不良反应比荧光素钠少,主要表现为轻微的不适、恶心、呕吐、皮肤瘙痒、发热及 ICG 注射液的血管外渗漏等,且极少有引起过敏性休克的报道<sup>[6]</sup>。但是,由于眼底疾病多为中老年患者,视力差、配合欠佳,并且合并糖尿病、高血压的患者所占比例较高,使护理工作具有复杂性和高风险,给护理工作带来了新的挑战。

本研究对试验组患者采取整体护理干预。在患者检查前仔细询问过敏史及既往病史,耐心讲解,做好细致的护理准备并做好详细的登记。详细的登记便于检查后发生不良反应时及时查找相关信息,患者发生迟发反应时能及时与医护人员联系,还有利于药物不良反应的上报<sup>[7]</sup>。在检查过程中准确配制溶液和皮试液,严格遵守护理操作规范进行皮试和静脉注射。此外,由于 ICG 检查在暗室进行,易给患者造成陌生感和不适应,带给患者压力;加之患者对检查程序不够清楚,尤其不了解检查的必要性、安全性、可靠性,并担心造影剂会产生不良反应等,常引起患者强烈的焦虑反应,而良好的沟通对提高诊断技术有非常好的效果<sup>[4,8]</sup>。因此,在保证医护患的良好配合与严密观察药物不良反应的基础上,更加注重对患者进行心理护理和情感支持。本研究结果显示,试验组患者不良反应的发生率明显低于对照组,护理满意度明显高于对照组,组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

综上所述,整体护理干预可有效地降低了患者 ICG 药物不良反应的发生率,保障患者的安全,同时提高患者对医护工作的满意度。

### 参考文献

- [1] 彭士荣,张立萍. 吲哚菁绿血管造影技术在脑血管病手术中的应用[J]. 护士进修杂志,2008,23(23):2156-2157.
- [2] 葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:59.
- [3] 黄娟,邓伏芝,康凯燕. 吲哚菁绿血管造影和荧光素眼底血管造影同步检查的护理配合[J]. 中国实用护理杂志,2005,21(3):39-40.
- [4] 王美钗,楼继先. 荧光素钠和吲哚菁绿混合眼底血管造影检查的护患沟通技巧[J]. 现代中西医结合杂志,2003,12(24):2715-2716.
- [5] 杨文艳,康艳伟,李兰. 吲哚菁绿在眼科的临床应用研究进展[J]. 重庆医学,2012,41(36):3900-3902.
- [6] 罗汉平,邹桂芳,王峥嵘. 眼底吲哚菁绿血管造影检查的护理[J]. 护理学杂志,2004,19(20):44-45.
- [7] 余时智. 荧光素钠注射液的不不良反应观察与护理干预措施[J]. 检验医学与临床,2011,8(11):1386-1394.
- [8] 刘晓红,楚更五,贾福军. 护理心理学[M]. 北京:人民军医出版社,2004:126-128.

(收稿日期:2014-08-08 修回日期:2014-11-18)

(上接第 849 页)

- 鼠脑组织中 EPA\_DHA 水平的影响及意义[J]. 第三军医大学学报,2005,12(27):1213-1215.
- [8] 李霖. 大鼠非酒精性脂肪性肝病肝脏脂肪酸谱的研究[D]. 杭州:浙江大学医学院,2007:27-29.
- [9] 崔瑞芳. 高效液相色谱检测血清胆固醇酯 n-3 脂肪酸指数[D]. 北京:北京协和医学院,2010:15-16.
- [10] 宋虎,彭俊生,杜艳平,等. 胃癌血清脂肪酸和脂肪酸酰胺水平的变化及其意义[J]. 实用医学杂志,2011,16(27):2947-2950.
- [11] 谭斌斌. 2 型糖尿病患者血浆中脂肪酸代谢谱的研究[D]. 长沙:中南大学,2010:18-20.
- [12] 杨芳,李忠霞,郑琳,等. 气相色谱法检测人红细胞膜反式脂肪酸水平[J]. 华南预防医学,2012,6(38):64-66.
- [13] 元冬娟,康景轩,周克元,等. 尿液中脂类的萃取及健康人脂肪酸成分的分析[J]. 第四军医大学学报,2009,30(19):2021-2024.
- [14] 李海静,吴胜明,李显,等. 人血清中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报,2008,11(27):37-38.
- [15] 韩莉姐. 基于 GC/MS 技术的脂肪酸代谢轮廓谱方法和应用研究[D]. 上海:华东理工大学,2009:23-24.
- [16] 徐小作,李行方,钟伟燕,等. 人血清中 7 种多不饱和脂肪酸检测方法研究[J]. 黑龙江医学,2010,34(1):30-32.
- [17] 孙莲,孟磊,马合木提,等. GC-MS 法及柱前衍生 HPLC 法检测芫菁子中油脂的组成和水平[J]. 华西药学杂志,2011,1(26):62-64.

- [18] 暴雪,高英,玉荣,等. 柱前衍生化-HPLC 法检测文冠果种仁油中脂肪酸水平[J]. 北方药学杂志,2012,9(1):3-4.
- [19] 伍金华,温鹏强,蔡春,等. 一种红细胞膜脂肪酸甲酯化的改良方法[J]. 现代预防医学,2008,22(35):4461-4463.
- [20] Abu EO, Oluwatowoju I. Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,2009,80(4):189-194.
- [21] 吴毅,李晓东,罗晓清,等. 衍生化 GC-MS 同时检测鱼腥草药材中 9 种脂肪酸的水平[J]. 中国药学杂志,2009,44(7):545-547.
- [22] 芮雯,岑颖洲,伍秋明. 蜈蚣藻和带形蜈蚣藻脂肪酸成分和无机元素含量分析[J]. 广东药学院学报,2010,26(1):48-50.
- [23] 王秀琴,李军,李岚,等. GC-MS 分析不同产地天仙子及其炮制品中的脂肪酸成分[J]. 中华中医药学刊,2013,31(31):166-168.
- [24] 王晓丽,杨明明,迟娜,等. 柱前衍生化-HPLC 法同时检测注射用沙棘籽油中脂肪酸的水平[J]. 沈阳药科大学学报,2010,27(10):808-812.
- [25] 杨必成,刘海,杨义芳,等. HPLC-ELSD 检测油菜花粉抗前列腺增生活性部位中 4 种脂肪酸类化合物[J]. 中草药,2012,10(43):1967-1970.

(收稿日期:2013-08-22 修回日期:2013-10-22)