

色谱法研究胃肠外营养中脂肪酸乳剂 对大鼠多不饱和脂肪酸代谢的影响

赵玉兰 李楠 唐云* 顾倬云*

(解放军总医院实验仪器中心 *普通外科 北京 100853)

摘要 运用色谱法测定了红细胞膜磷脂脂肪酸的组成。首先用双向薄层色谱分析法分离和提纯膜中的类脂,然后运用毛细管气相色谱法分析其中的组分。类脂中加入 $G_{17:0}$ 作内标,硫酸-甲醇液进行甲酯化处理后,上样测试。在 350mg/L 到 800mg/L 的范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.99。方法具有稳定性好、灵敏度高、重复性好、操作相对简便的特点,在研究胃肠外营养中脂肪酸乳剂对大鼠多不饱和脂肪酸代谢的影响中,取得了较好的效果。

关键词 色谱法,胃肠外营养,脂肪酸乳剂,多不饱和脂肪酸,大鼠

1 前言

亚油酸 ($C_{18:2n-6}$) 和 α -亚麻酸 ($C_{18:3n-3}$) 是必需脂肪酸 (EFA, essential fatty acid)。应用葡萄糖氨基酸系统肠外营养 (total parenteral nutrition, TPN), 可以纠正蛋白质和能量缺乏所致营养不良, 同时也出现必需脂肪酸缺乏 (EFAD, essential fatty acid deficiency)。TPN 中应用长链脂肪乳剂 (LCT, long-chain triglycerides) 后, 由于其含有丰富的 EFA, 因此它既能为机体提供能量, 又可纠正和预防 EFAD。但是过量的供给 LCT, 会导致过量的亚油酸抑制 $\Delta 6$ 去饱和酶, 使得不饱和程度更高, 链更长的衍生物水平下降^[1,2]。为了观察不同剂量的 EFA 对红细胞膜磷脂脂肪酸组成的影响, 参考有关文献^[3-5], 我们建立了色谱法测定红细胞膜磷脂脂肪酸组成的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HP 5890/5971 气-质联用仪。色谱柱: HP Ultra-2 (25m \times 0.2mm \times 0.33 μ m)。交联 5% 苯基甲基硅烷。所有试剂均为 Sigma 公司产品。

2.2 红细胞膜的制备

将 4mL 血液收集在肝素抗凝管中, 立即在 4 $^{\circ}$ C 下以 1000r/min 的转速离心 10min。将红细胞 (RBC, red blood cell) 悬浮在 pH 7.6 的 Tris 缓冲液中 (RBC : Tris 缓冲液 = 1 : 2, V/V), 轻轻倒转,

混合均匀后, 在 4 $^{\circ}$ C 下以 1000r/min 的转速离心 10min, 除去上层液体, 仅留下 RBC。重复洗涤 3 次, 尽可能地除去粘附在 RBC 表面的血浆成分。洗净后的 RBC 重悬在 Tris 中, 比溶为 50%。

RBC 膜通过低渗溶解法得到^[6]。将 4 $^{\circ}$ C 下 pH 7.6 的低渗 Tris 缓冲液加入到洗净的 RBC 悬液中 (RBC : 低渗 Tris = 1 : 1.2), 混合后静置 5min, 在 4 $^{\circ}$ C 下以 2000r/min 的转速离心 20min, 倾去上层液体, 避免损失膜。重复 4 至 6 次, 直到膜溶液变为无色液体为止。

2.3 红细胞膜脂的薄层色谱分析

2.3.1 膜类脂的提取^[7]

取 RBC 膜液 1mL, 加入 3mL 氯仿 : 甲醇 (1 : 2) 混合物, 振荡 2min; 再依次加入 1mL 氯仿和 1mL 蒸馏水, 分别振荡 30s。过滤后, 在分液漏斗中静置分层, 收集含所有类脂的有机层 (氯仿层) 和前次合并。

2.3.2 双向薄层色谱分析

用自制硅胶 G 薄层板 (20cm \times 20cm), 双向展开。每块板用 20g 硅胶 G (青岛海洋化工厂), 240mg 羧甲基纤维素钠 (ROCH₂COONa)。

第一相展开系统: 氯仿 : 甲醇 : 氨水 : 水 = 80 : 26 : 15 : 3 (V/V);

第二相展开系统: 氯仿 : 甲醇 : 丙酮 : 乙酸 : 水 = 78 : 20 : 4 : 3 : 0.4 (V/V)。碘蒸气显色, 参考类脂标准品及文献^[8,9]的图谱进行定性。

2.4 类脂中脂肪酸含量的气相色谱测定

2.4.1 制取薄层板上的磷脂酰乙醇胺(PE, phosphatidyl ethanolamine)和磷脂酰胆碱(PC, phosphatidyl choline)

用 1 : 1 的氯仿-甲醇萃取,以 1 000r/min 的转速离心 5min,共萃取 3 次,合并萃取液,氮气吹除溶剂。加入 C_{17:0}内标 100μg 和硫酸-甲醇液(5 : 95, V/V) 10mL,甲酯化后,沸水回流 90min,冷却后用正己烷萃取脂肪酸甲酯(共 3 次),用 C_{17:0}作内标,氮气吹除溶剂,在 4℃下保存。

2.4.2 气相色谱条件

HP-气质联用仪,载气为氮气,分流比为 60 : 1,柱前压为 0.25MPa。柱初温为 60℃,持续 2min;以 20℃/min 的速率升至 170℃,保持 3min;再以 3℃/min 的速率升至 228℃,保持 3min,共运行 32.83min,溶剂效应进样时间 0.2min。样品进样前用正己烷稀释,进样量为 1μL。

2.5 动物分组

10 周龄雄性 Wistar 大鼠由军事科学院动物中心提供。40 只大鼠随机分为 5 组:

Sham 组(假手术组):右颈静脉结扎后,不插管,

自由饮食、饮水。

NS 组(生理盐水组):0.9%NaCl 以 330mL/kg.d 持续静脉输入,自由饮食。

LCT 组(长链脂肪酸组):TPN 液体中由 10% Intralipid(华瑞制药有限公司)提供 30%非蛋白热卡。

MCT/LCT 组(中长链脂肪酸组):TPN 液体中由 10%Lipofundin MCT/LCT(德国贝朗医疗有限公司,其中 MCT 占 50%,LCT 占 50%)提供 30%的非蛋白热卡。

GS 组(葡萄糖组):TPN 液体中完全由葡萄糖提供非蛋白热卡。

3 结果与讨论

红细胞膜类脂的双向薄层色谱分离图见图 1,红细胞膜的 PE 和 PC 的脂肪酸气相色谱图见图 2 和图 3。PE 脂肪酸组成的变化见表 1,PC 脂肪酸组成的变化见表 2,PC 脂肪酸比率的变化见表 3。脂肪酸组分含量测定采用内标法定量,相关系数均大于 0.99,线性范围为 350~800mg/L。

表 1 磷脂酰乙醇胺类脂中脂肪酸的变化

Table 1 Changes in major fatty acids (% , total) of erythrocyte PE in rats

Group	12 : 0	14 : 0	16 : 0	18 : 2	18 : 1	18 : 0	20 : 4
Sham	2.3±0.4	2.8±0.4	15.5±1.0	9.5±1.0	16.2±0.8	16.9±1.1	36.7±1.3
NS	2.0±0.5	2.7±0.5	15.8±1.2	9.6±1.3	16.7±1.2	17.2±1.7	36.0±1.6
LCT	1.7±0.2 ²⁾	2.5±0.2	15.5±1.5	9.5±1.7	16.5±1.7	17.8±1.5	36.6±1.4
MCT/LCT	3.2±0.6 ²⁾⁴⁾	0.4±0.2 ²⁾⁴⁾	15.7±1.1	9.0±1.0	15.9±0.8	16.2±1.1	36.1±1.3
GS	2.5±0.3 ⁴⁾	3.0±0.3 ⁴⁾	16.1±0.8	8.3±0.8 ¹⁾³⁾	17.5±1.1 ¹⁾	17.1±1.1	35.7±1.9

1)与 Sham 组比较(compare with Sham), P < 0.05; 2)与 Sham 组比较(compare with Sham), P < 0.01; 3)与 LCT 组比较(compare with LCT), P < 0.05; 4)与 LCT 组比较(compare with LCT), P < 0.01。

表 2 磷脂酰胆碱类脂中脂肪酸的变化

Table 2 Changes in major fatty acids (% , total) of erythrocyte PC in rats

Group	12 : 0	14 : 0	16 : 0	18 : 2	18 : 1	18 : 0	20 : 4
Sham	1.4±0.3	2.3±0.3	41.7±0.8	18.3±1.0 ²⁾	11.2±0.8 ⁴⁾	14.1±0.6	11.2±0.8
NS	1.3±0.4	2.4±0.2	40.9±2.0	18.7±0.7 ²⁾	10.8±0.8 ⁴⁾	14.6±0.4	11.3±0.9
LCT	1.3±0.3	2.5±0.5	41.4±1.8	22.7±1.2	10.3±1.2 ⁴⁾	15.0±1.4	6.8±1.8
MCT/LCT	1.4±0.3	2.4±0.4	40.9±1.8	18.3±1.7 ²⁾³⁾	11.1±1.2 ⁴⁾	15.1±1.3	10.9±1.8
GS	1.4±0.4	2.3±0.3	39.7±1.5 ¹⁾	17.0±0.9 ²⁾	14.6±0.8	13.9±0.7	11.0±1.0 ²⁾

1)与 Sham 组比较(compare with Sham), P < 0.01; 2)与 LCT 组比较(compare with LCT), P < 0.01; 3)与 GS 组比较(compare with GS), P < 0.05; 4)与 GS 组比较(compare with GS), P < 0.01。

表3 磷脂酰胆碱类脂中脂肪酸的比率变化

Table 3 Fatty acids ratios in erythrocyte PC		
Group	18 : 1/18 : 0	20 : 4/18 : 2
Sham	0.81 ± 0.07	0.61 ± 0.07
NS	0.75 ± 0.07	0.60 ± 0.07
LCT	0.69 ± 0.09 ¹⁾	0.06 ± 0.08 ²⁾
MCT/LCT	0.74 ± 0.08	0.60 ± 0.09
GS	1.06 ± 0.10 ²⁾	0.65 ± 0.08

1) 与 Sham 组比较 (compare with Sham), $P < 0.05$;
 2) 与 Sham 组比较 (compare with Sham), $P < 0.01$ 。

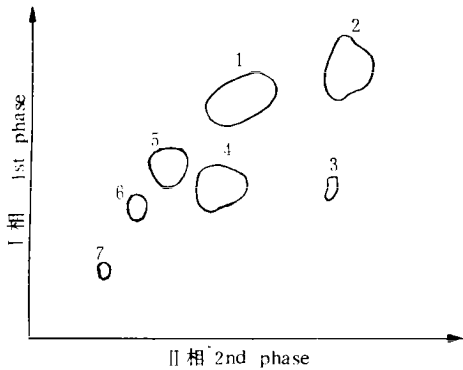


图1 双向薄层色谱分离红细胞膜类脂

Fig. 1 Two-dimensional thin-layer chromatogram of the total lipids on erythrocyte membranes

1. PC, 2. PE, 3. 磷脂酸 (PA, phosphatidic acid), 4. 磷脂酰丝氨酸 (PS, phosphatidylserine), 5. 神经鞘磷脂 (SM, sphingomyeline), 6. 红细胞糖苷脂 (GL, globoside), 7. 上样点 (point of sample loading)。

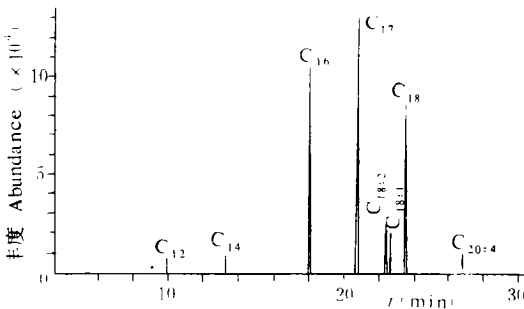


图2 红细胞膜上磷脂酰乙醇胺的脂肪酸色谱图

Fig. 2 The gas chromatogram of fatty acids in PE on erythrocyte membranes

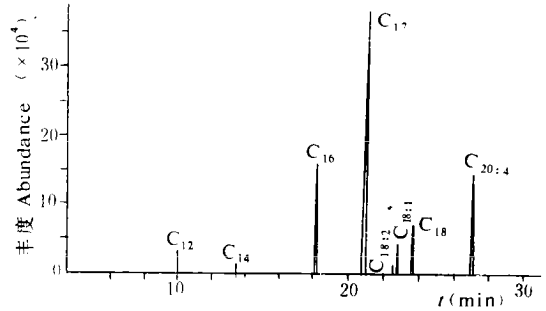


图3 红细胞膜上磷脂酰胆碱的脂肪酸色谱图

Fig. 3 The gas chromatogram of fatty acids in PC on erythrocyte membranes

本法具有稳定性好、灵敏度高、重复性好、操作相对简便的特点。临床标本提取类脂后,放入-20℃冰箱可保存1个月。从表1,2,3可以得到以下结论:脂肪乳剂中脂肪酸与RBC膜磷脂的脂肪酸组成有重要关系,无EFA的TPN可导致EFAD,加入MCT/LCT及LCT可预防EFAD。但是过量的EFA摄取将抑制 $\Delta 6$ 去饱和酶的活性,以部分MCT代替LCT可以减轻酶活性的抑制。

参 考 文 献

- Innis S. Lipids, 1986;21:132
- Martinez M. Lipids, 1987;22(3):133
- George M P, Stefanie C, Henri B. Methods Enzymol, 1981;72:8
- 师治贤, Kenneth C K, Charles W G. 生物化学与生物物理学报, 1987;19(4):296
- Rogiers V. J Chromatogr, 1980;182:27
- Hanahan D U, Ekholm J E. Methods Enzymol, 1974; 31(8):911
- Bligh E G, Dyer W J. Can J Biochem Physio, 1959;37 (8):911
- Ruitenbeek W. Clin Chim Acta, 1978;89:99
- 唐建华, 卢义钦, 傅敏庄. 湖南医科大学学报, 1991;16 (3):283

Study on the Effect of Lipid Emulsion on the Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids in Rats for Total Parenteral Nutrition

Zhao Yulan, Li Nan, Tang Yun* and Gu Zhuoyun*

(Center of Instrument, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100853)

Abstract A method for the determination of polyunsaturated fatty acids in erythrocyte membrane phospholipid by chromatography was established. At first two-dimensional thin-layer chromatography on silica gel G was used for extraction and purification of lipids from biological materials. Blood samples were collected and centrifuged at 4°C. Plasma and white blood cells were removed and RBCs were washed with a Tris buffer at pH 7.6. Membranes of RBCs were obtained through osmosis. Membranes were precipitated after centrifugation at 4°C. Lipids of all RBC membrane fractions were extracted with chloroform : methanol (1 : 2, V/V). The neutral lipids, phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl ethanolamine (PE) were separated by TLC using home made plate. Each plate contained 20g silica and 240mg ROCH₂ COONa and was developed two dimension ally. The phospholipid fraction was identified after comparison with a standard of phospholipids visualized by treated with iodine vapors. Phospholipids were transmethylated with methanol : chloroform (1 : 1, V/V) and then they were methylesterified in sulfuric acid : methanol (5 : 95, V/V). Capillary gas chromatography was applied to determine various fatty acids. Initial column temperature was 60°C and held for 2 minutes, followed by a increase rate of 20°C/min until 170°C. After 3 minutes at 170°C, the temperature was programmed to 228°C with 3°C/min, and held for 3 minutes. With C_{17:0} as an internal standard, the fatty acids in lipid emulsion on the metabolism in 40 Wistar mice were assayed. A good linear relationship of standards was found in the range of 350mg/L to 800mg/L. All the coefficients of correlation were larger than 0.99. It is a sensitive, stable and relatively rapid method. Our results showed that the beneficial effects of TPN (total parenteral nutrition) with MCT/LCT (middle-chain triglycerides/long-chain triglycerides) were exerted in polyunsaturated fatty acids metabolism.

Key words chromatography, total parenteral nutrition, lipid emulsion, polyunsaturated fatty acids, rat

欢迎订阅 1997 年《岩矿测试》

《岩矿测试》杂志创刊以来,以报道与岩矿分析测试和分析科学相关的新技术、新方法、新理论和新设备等研究成果为主,同时传播和交流有关岩矿测试方面的实践经验。主要栏目有:研究报告、研究简报、实验技术、仪器研制、综述、新技术新知识介绍、问题讨论、经验介绍和科技信息等。适于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校分析化学专业的师生阅读。

《岩矿测试》为中文(化学类)核心期刊,曾荣获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科协优秀学术期刊三等奖,地矿部优秀科技期刊一等奖,北京市优秀科技期刊全优奖。

《岩矿测试》为国内外公开发行人物,国内统一刊号 CN 11-2131/TD,国际标准刊号 ISSN 0254-5357,国际 CODEN 码 YACEDJ。国内邮发代号 2-313,国际书店发行代号 Q4089,广告经营许可证 京西工商广字 0037。本刊为季刊,1997 年定价 5.00 元/本,全年 20.00 元。漏订的读者可与编辑部直接联系。

《岩矿测试》编辑部地址:北京阜外百万庄路 26 号,中国地质科学院院内,邮政编码:100037,电话:010) 68311133-2181。