技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)05-0699-04

母乳中多不饱和脂肪酸的 RP-HPLC 测定方法研究

方志娥,陆 巍,曲 斐,颜 波,易珍奎,尚京川
(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立测定母乳中亚油酸(Linoleic acid,LA)、α-亚麻酸(α-Linolenic acid,ALA)、花生四烯酸(Arachidonic acid,AA)、二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid,DHA)的高效液相色谱法。方法:经液-液萃取并衍生提取母乳中的不饱和脂肪酸后,采用 Agilent SB-C18(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相为乙腈:水 =83:17,流速 1.0 ml/min,柱温 30℃,紫外检测波长 254 nm 进行。结果:ALA 在 50~350 μg/ml、LA 在 200~1 500 μg/ml、DHA 在 10~80 μg/ml 和 AA 在 20~160 μg/ml 范围内浓度与峰面积呈良好的线性关系,r 均大于 0.999;前三者的最低检测限均为 0.2 μg/ml,后者为 0.4 μg/ml;高、中、低浓度的平均回收率在 92.65%~100.70%以内,精密度 RSD ≤ 5.67%。结论:本方法快速、准确且灵敏,满足临床和不同生物样品中多不饱和脂肪酸的含量测定。

【关键词】高效液相色谱法;多不饱和脂肪酸;母乳
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-09

Determination of polyunsaturated fatty acid in human breast milk by reverse phase high performance liquid chromatography

FA GN Zhi-e, et al
(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a simultaneous determination of linoleic acid (LA), α-linolenic acid (ALA), arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) in human breast milk by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Methods*: The method of liquid-liquid extraction and derivation from human breast milk was used in a HPLC analysis. The column was Agilent SB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile: water (83:17, v/v) at 1.0 ml/min with UV detection at 254 nm and the column temperature was 30℃. *Results*: The standard curves were linear over the ranges of 50~350 μg/ml for α-linolenic acid, 200~1 500 μg/ml for linoleic acid, 10~80 μg/ml for docosahexaenoic acid and 20~160 μg/ml for arachidonic acid, respectively. The good linearity can be obtained over their concentration range(r>0.999). The minimum detectable

作者介绍:方志娥(1984-),女,硕士,研究方向:药物分析。
通讯作者:尚京川,男,副教授,E-mail:sjc20@126.com。
基金项目:国家自然科学基金(编号:NSFC30700775)。

HER2 and K-RAS analyses in sclerosing hemangioma of the lung[J]. Am J Surg Pathol, 2007,31(10):1512-1520.

[6] 董孟杰,李少林,任庆兰,等.^{99m}Tc-EGF 的直接法合成及其在荷 C6 动物体内生物学分布[J].核化学与放射化学,2008,30(1):36-40.

[7] 李林法,主编.肿瘤靶向分子影像[M].北京,科学出版社,2006.98-125.

[8] Goldenberg D M,Chatal J F,Barbet J,et al.Cancer imaging and therapy with bispecific antibody pretargeting[J].Update Cancer Ther,2007,2(1):19-31.

[9] Egri G,Takáts A.The immunodiagnosis of lung cancer with monoclonal antibodies[J]. Med Sci Monit,2005,11(9):296-300.

[10] Hage R,de la Rivière A B,Seldenrijik C A,et al.Update in pulmonary carcinoid tumors:a review article[J].Ann Surg Oncol,2003,10(6):697-704.

[11] Oh M J,Choi J H,Kim I H,et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma[J].Clin Cancer Res,2000,6:4760-4763.

[12] Kim H G,Kassis J,Souto J C,et al.EGF receptor signaling in prostate morpho-genesis and tumorigenesis[J]. Histol Histopathol,1999,14(4):1175-1182.

[13] Chandrika J,Piyathilake,Andra R,et al. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung[J]. Clin Cancer Res,2002,8(3):734-744.

[14] Peter T R,Hironobu K,Robert A,et al.Amplification and overexpression of the cyclin DI and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer[J].J Cancer Res Clin Oncol,1999,125:61-70.

[15] Jan Brabender, Kathleen D,Danenberg,et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is corelated with survival[J].Clinical Cancer Research,2001,7(7):1850-1855.

(责任编辑:关蕴良)

limits of ALA, LA and DHA were all 0.2 μg/ml, and AA was 0.4 μg/ml. The average recovery of the method was 92.65% ~ 100.70% and the RSD was lower than 5.67%. *Conclusion*: The HPLC method in this assay is rapid, direct and sensitive, which can be successfully applied to quantity the detection of polyunsaturated fatty acid of different biological samples as well as in clinic.

【Key words】HPLC; Unsaturated fatty acid; Breast milk

依据脂肪酸的饱和度,可将其分为饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸及多不饱和脂肪酸。其中多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid,PUFA)是一类含有两个或两个以上双键且碳原子数为 16~22 的直链脂肪酸,主要分为 n-3 和 n-6 系脂肪酸;n-3 系脂肪酸包括 α-亚麻酸(α-Linolenic acid, ALA)及其衍生物二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA),n-6 系脂肪酸包括亚油酸(Linoleic acid,LA)及由它可衍生出的花生四烯酸(Arachidonic acid,AA)。母乳中含有婴儿所必需、但体内又不能自身合成的多不饱和脂肪酸,尤以 n-3 和 n-6 系列脂肪酸最为重要,约占多不饱和脂肪酸总量的 60% ~ 90%, 对婴儿的脑和视网膜的发育有着非常重要的作用[1]。

目前国内有大量采用 HPLC 法测定血浆、血清或者细胞膜[2-5]中脂肪酸,但关于母乳中多不饱和脂肪酸的测定尚未见报道。本文采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对 4 种多不饱和脂肪酸进行分离测定,为研究母乳中的营养成分提供测定方法,同时为新生儿合理喂养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

选择 2008 年 2 ~ 8 月重庆医科大学附属儿童医院儿童保健科 35 例已健康正常分娩的乳母。连续收集每位乳母产后 12 d 的初乳和一个月以后的成熟乳。所有标本均在上午采集,用手挤法采集乳汁,采集后立即盖紧容器,置于 -20℃ 冰箱保存待测定。

1.2 主要试剂与仪器

LA、ALA、AA 和 DHA(美国 NUCHEK 公司);甲醇为色谱纯;正已烷、三乙胺、磷酸、ω-溴代苯乙酮、丙酮和醋酸均为分析纯;氮气;双蒸水。

SHIMADZHU LC-2010A(class-vp6.0 工作站);Sartorious BS210S 电子天平(德国 Sartorious 公司);KA-1000 离心机(上海安亭科学仪器厂);SK-1 快速混匀器(江苏国华仪器厂);THZ-82A 型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 对照品溶液配制 分别精密称取适量 ALA、DHA、AA 和 LA 4 种脂肪酸对照品于容量瓶中,用乙腈稀释至刻度线,得到浓度均为 1.0 mg/ml,使用前取适量的 4 种不饱和脂肪酸对照品溶液混合,制得标准储备溶液。上述对照品溶液均避光、冷藏保存。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:Agilent SB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相为乙腈:水 =83:17;流速:1 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样体积:10 μl。

1.3.3 母乳样品的处理 精密移取母乳 200 μl, 加入 500 μl 甲醇及 1 ml 正已烷,混匀,再加入 1 mol/L 磷酸 0.1 ml,震荡 5 min,经离心(3 000 r/min)15 min;移取 950 μl 正已烷上相于另一干燥试管中,加入 1 mol/L 磷酸 50 μl,震荡 5 min,再次离心 1 min,移取 900 μl 正已烷相,此步重复 2 步,合并正已烷上相于干燥的尖底玻璃试管中。合并的正已烷相中加入 20 mg/ml ω-溴代苯乙酮的丙酮溶液 10 μl 及 20 mg/ml 三乙胺的丙酮溶液 10 μl,震荡 1 min,水浴(90℃)25 min,冷却后,加入 5 mg/ml 醋酸丙酮溶液 10 μl,震荡 1 min,再次水浴(90℃)25 min,25℃~30℃下经氮气吹干仪吹干,残留物用流动相 200 μl 复溶,震荡 1 min,转移至寸管中,以备 HPLC 分析。

2 结 果

2.1 不饱和脂肪酸的色谱图

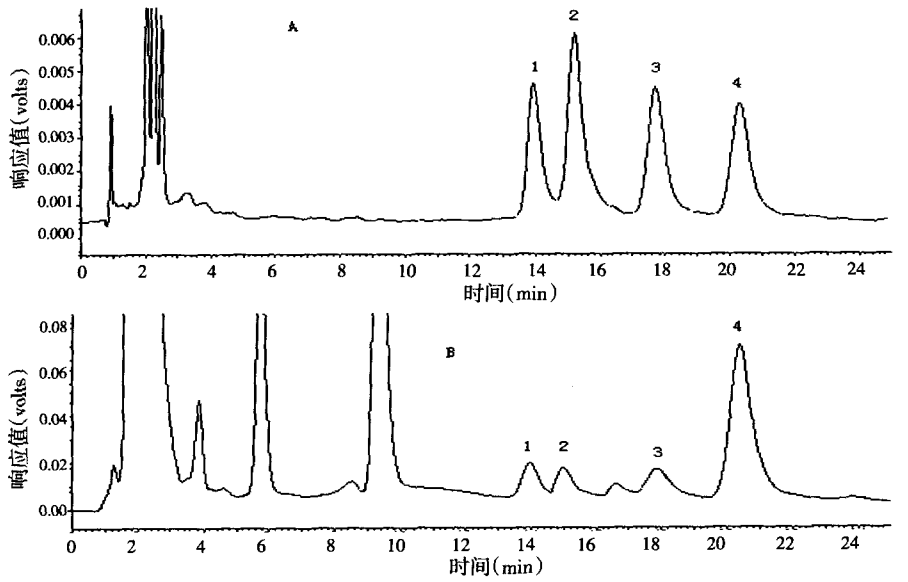
在选定的色谱条件下, 对 ALA、DHA、AA 和 LA 的色谱分离情况进行考察,所得色谱图见图 1,4 种不饱和脂肪酸均有效分离,保留时间 ALA 为 14 min、DHA 约为 15 min、AA 约为 18 min、LA 约为 20 min。

2.2 标准曲线及检测限

精密吸取 ALA、DHA、AA 和 LA 标准混合储备溶液,用乙腈稀释成一系列浓度,按"1.3.3 母乳样品的处理"操作,取 10 μl 注入高效液相色谱仪记录峰面积, 建立标准曲线,4 种不饱和脂肪酸的回归方程及相关系数见表 1。结果表明:不饱和脂肪酸在其线性范围内呈良好的线性关系,相关系数 $r > 0.999$。按色谱峰信噪比 S/N=3 为标准,ALA、DHA、LA 三者的最低检测限均为 0.2 μg/ml,AA 的最低检测限为 0.4 μg/ml。

2.3 回收率与精密度

分别加入适量储备对照品溶液于等量母乳中, 制备低、中、高 3 种浓度的母乳样品各 5 份,按"1.3.3 母乳样品的处理"操作并分析,以上各样品于同日内进样 5 次测定,另取上述样品,按同法操作,每天测定 1 次,连续测定 5 d。进样 10 μl,测定其样品峰面积,按回归方程计算对应浓度,及其回收率与精密度。4 种不饱和脂肪酸低、中、高 3 种浓度的母乳回收率在 92.65% ~ 100.70%以内,精密度 RSD≤5.67%。其



A- 标准品;B- 母乳样品

1. ALA;2.DHA;3. AA;4. LA

图 1 不饱和脂肪酸的标准品和母乳色谱图

表 1 4 种不饱和脂肪酸的线性方程及相关系数

组分	回归方程	相关系数 r	线性浓度(μg/ml)
ALA	y=1 635.8c-3 641.7	r=0.999 0	50、100、200、300、350
DHA	y=25 810c-3 943.8	r=0.999 9	10、20、40、60、80
AA	y=13 808c-16 852	r=0.999 8	20、40、80、120、160
LA	y=9 701.3c+31 254	r=0.999 7	200、400、800、1 000、1 200、1 500

表 2 母乳中不饱和脂肪酸的回收率与精密度(n=5)

组分	本底值 (μg/ml)	加入量 (μg/ml)	测定值 (μg/ml)	回收率 (μg/ml)	RSD%	平均回收率%
ALA	52.31	50	101.48 ± 2.19	105.01	3.99	99.74
		100	150.78 ± 5.43	98.50	3.60	
		250	291.54 ± 8.75	95.72	3.00	
DHA	30.78	10	40.82 ± 1.52	92.48	5.67	92.65
		20	48.99 ± 2.35	91.14	4.80	
		40	68.51 ± 2.81	94.32	4.10	
AA	65.11	20	85.14 ± 2.42	101.93	3.83	99.42
		50	114.03 ± 2.96	97.80	2.60	
		80	143.90 ± 3.17	98.52	2.20	
LA	540.56	200	739.8 ± 18.71	105.12	3.36	100.70
		350	885.5 ± 25.68	98.54	2.90	
		700	1 229.69 ± 29.52	98.45	2.40	

表 3 样品的测定结果(μg/ml,n=35)

	ALA	DHA	AA	LA
初 乳	54.52 ± 18.03	30.13 ± 10.56	63.88 ± 20.99	553.51 ± 104.78
成熟乳	65.41 ± 14.91	40.11 ± 14.96	76.68 ± 23.76	665.24 ± 155.63

测定结果见表 2。

3 样品测定

取母体分娩后 12 d 内分泌的乳汁（初乳）和一个月以后分泌的乳汁（成熟乳）各 0.2 ml，按“1.3.3 母乳样品的处理”操作并分析，进样 10 μl，结果见表 3。

4 讨 论

由表 3 可知，母乳中 4 种不饱和脂肪酸的含量随着泌乳期的延长而增加，其中 LA 的含量最高，其次为 AA 和 ALA，而 DHA 的含量最低。初乳中的 DHA 含量最低，与张伟利等[6]报道不符，因 ALA 主要来源于植物油，DHA 主要富含于深海鱼类，而在内陆地区乳母长期使用大豆油、花生油等植物油，而较少摄入深水鱼和鱼油的膳食习惯，导致 DHA 的含量较低。DHA 在发育期的脑组织和视网膜组织中含量很高，对胎儿脑发育十分重要[7]。所以孕期及哺乳母亲应适量食些富含 DHA 食品如海洋鱼类，进而更有利于婴儿的正常发育。

目前生物体内脂肪酸的分离测定大多采用气相色谱法[8-11]，但由于多不饱和脂肪酸的热稳定性较差，在其衍生过程中可能会异构化或者氧化，使气相的广泛应用受到很大限制，进而改用高效液相色谱法测定。HPLC 条件较温和，可避免衍生过程的异构化；采用紫外检测器检测脂肪酸时，其响应值与分子的不饱和度有关，依次为 ALA、DHA、AA 和 LA，与 Adosh Mehta 的报道一致[8]。

陈江虹等[12]总结了用 HPLC 测定脂肪酸的紫外检测衍生剂，几乎采用柱前衍生法将脂肪酸衍生成酯，实验表明，这种方法可提高脂肪酸的检测灵敏度。本实验采用酸性较弱的磷酸酸化血浆，提取后不需加碱中和提取液，然后用 ω－溴代苯乙酮和三乙胺作为衍生剂和催化剂，使实验过程得以简化。

Abushufa R 等[13]报道衍生化反应是否完全直接影响着脂肪酸含量的测定结果。在实验过程中，优化其衍生化条件，当衍生温度低于 80℃时，脂肪酸的衍生不足够彻底，同一浓度的样品紫外检测响应值较温度高于 80℃的衍生方法的响应值低；当衍生时间大于 15 min 时，反应物浓度趋于稳定，且对不饱和脂肪酸的降解无明显影响，最终选择其衍生条件温度 90℃，时间为 25 min。上述实验数据表明，此提取方法回收率较高，结果准确可靠。

（易珍奎为重庆医科大学 2005 级药学本科生）

参 考 文 献

[1] 吴克刚，杨连生，柴向华.母乳中的多不饱和脂肪酸[J].中国乳品工业，2000，28(4)：22.

[2] 金贞燕，姜熙罗.反相高效液相色谱法测定血浆中游离脂肪酸组成[J].白求恩医科大学学报，1993，19(2)：212.

[3] 吴海福，张宏伟，毕茂华，等.高效液相色谱测定血清中的游离脂肪酸[J].肠外与肠内营养，1995，2(2)：122.

[4] 黄作君，徐 刚，黎月玲，等.高效液相色谱法测定大鼠血浆中游离脂肪酸浓度[J].广东药学院学报，2004，20(6)：656.

[5] 杨刚毅，邱鸿鑫，邓华聪，等.高效液相色谱法分离人红细胞膜脂肪酸的研究[J].重庆医科大学学报，1996，21(1)：10.

[6] 张利伟，吴圣楣，钱继红，等.母乳中二十二碳六烯酸及花生四烯酸含量的观察[J].中国围产医学杂志，2002，5(1)：52.

[7] 戚秋芬，张利伟，吴圣楣，等.长链多价不饱和脂肪酸与婴儿营养[J].临床儿科杂志，1998，14(2)：132.

[8] Mehta A，Oeser A M，Carlson M G.Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high performance liquid chromatography[J]. Chromatography B，1998，719(20)：9.

[9] Taylor A J，Pandov H I，Lawson N.Determination of erythrocyte fatty acids by capillary gas liquid chromatography[J].Ann Clin Biochem，1987，24(3)：293.

[10] 张 瑛，刘仲熊.早产儿长链多价不饱和脂肪酸水平及相关因素研究[J].中华儿科杂志，1999，37(2)：73.

[11] 王传丰，陈瑞冠，刘 红，等.脂肪组织和血浆标本中脂肪酸的气相色谱分析[J].营养学报，1990，12(4)：398.

[12] 陈江虹，刘国清，尹家无，等.HPLC 测定脂肪酸的紫外检测衍生试剂[J].云南化工，2001，28(2)：18.

[13] Abushufa R，Paul R，Weinkove C.Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC[J].Clin Chem，1994，40(9)：1707.

（责任编辑：关蕴良）