维普资讯 http://www.cqvip.com

第21卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.1
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

# 高效液相色谱法分离人红细胞膜脂肪酸的研究

第一医院内科 杨刚毅 邱鸿鑫 邓华聪 汪恕萍 张晓萍

提 要 本文建立了用高效液相色谱法(HPLC)分离人红细胞膜脂肪酸的方法。选用2-溴苯乙酮为衍生剂、18-冠醚-6为催化剂，用$C_{18}$反相柱分离，流动相采用甲醇-乙腈-水，正十七酸($C_{17:0}$)为内标，紫外测定波长为254nm，于60min内分离了人红细胞膜含有的八种主要脂肪酸。

关键词 高效液相色谱法(HPLC)；红细胞膜；脂肪酸
中图分类号 R446.1

红细胞膜脂肪酸的检测，目前国内外主要采用气相色谱(GC)及薄层色谱(TLC)法等[1,2]。这些方法存在许多问题；如分离效果差，灵敏度低、定量不准确等。为此，我们采用2-溴苯乙酮为衍生剂、18-冠醚-6为催化剂、甲醇-乙腈-水为流动相，建立了在$C_{18}$柱上一次分离人红细胞膜八种主要脂肪酸的高效液相色谱法。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 岛津LC-6A高效液相色谱仪，配以SPD-6AV紫外检测器及C-R3A数据处理装置。Beckman L8-60M超速冷冻离心机，脂肪酸标准品、18-冠醚-6、2-溴苯乙酮及抗氧化剂2.4-二特丁羟甲苯(BHT)等试剂均购自美国Sigma公司，为色谱纯级。色谱纯乙腈购自天津试剂厂。其余试剂均为分析纯，用前须重蒸过滤。

**1.2 标准品的准备** 脂肪酸标准溶液包括：$C_{22:6}$、$C_{20:5}$、$C_{22:5}$、$C_{20:4}$、$C_{18:2}$、$C_{16:0}$、$C_{18:1}$、$C_{17:0}$、$C_{18:0}$九种脂肪酸。分别用乙腈制备，浓度范围0.4-1.5mg/ml。取一定量各类脂肪酸制成混合标准液，以酚酞为指示剂，用0.05MKOH乙醇溶液中和至终点，纯氮吹干，留待酯化。

**1.3 样品前处理** 1.RBC膜的制备及膜脂提取：取肝素抗凝血2ml，2000rpm离心5min，吸去上层血浆，以生理盐水洗涤红细胞3次，去除表层白细胞，按1:40比例加入pH7.4、10mol的低渗Tris-HCl缓冲液，使之溶血。再于4℃、12000rpm离心15min，重复洗涤离心4次，得乳白色RBC膜。

取0.35 ml膜悬液，加入内标正十七酸($C_{17:0}$)50μl(0.328 mg/ml)，再加入3ml氯仿—甲醇混合液(2:1 V/V，含BHT30 mg/100ml)，振荡1 min，2000rpm离心10min，吸取全部下层相，移至具塞螺口试管，纯氮吹干。2、脂肪酸钾盐的制备：于上述试管中加入0.5MHCl-甲醇溶液0.5ml，置80℃水浴1h。取出冷却后，加入1MKOH溶液(80%甲醇、20%$H_2O$)0.5ml，再于80℃水浴1h皂化。取出冷却后用HCl-甲醇中和至酚酞终点，于40℃水浴下氮气吹干，得淡红色脂肪酸钾盐。

**1.4 酯化** 经上述处理的脂肪酸标准品及样品内加入70μl 2-溴苯乙酮的乙腈溶液(10mg/ml)及18-冠醚-6的乙腈溶液(2.64mg/ml)再加入乙腈160μl，置80℃水浴20min，冷却后加入70μl醋酸-乙腈溶液(1:500 V/V)，再加热5min，氮气吹干。用甲醇1ml重溶，进样10μl。

## 2 结果与讨论

**2.1 HPLC条件的选择** 采用$C_{18}$反相色谱柱，150×4.6mmID，粒径5μm(美国PE公司产)，分别配置不同比例的甲醇-乙晴-水作流动相，对各种脂肪酸进行分离。发现当甲醇-乙腈-水为43：43：14，流速0.8ml/min、柱温25℃时，可分离12种脂肪酸，但需时长达90min以上，且乙腈用量大，温度适应范围窄，不利于临床大批量样品的分析。经筛选，当流动相为甲醇-乙腈-水(70：20：

维普资讯 http://www.cqvip.com

10)，流速 0.6ml/min、柱温 35℃时，已完全能分离人 RBC 膜中八种主要脂肪酸，且仅需 60min，乙腈用量少，温度适应范围宽，故采用了后者。

各脂肪酸标准色谱图见图 1，RBC 膜脂肪酸色谱图见图 2，各酸保留时间及校正系数见表 1。

### 2.2 RBC 膜的皂化与衍生化方法评价

我们在 RBC 膜提取液中加入了抗氧化剂 BHT，这有利于防止因血红蛋白衍生物存在而诱导不饱和脂肪酸产止自发氧化。在本体系中，BHT、酚酞、2－溴苯乙酮等、均在洗脱过程的前 12min 内流出，而 18－冠醚－6 无紫外吸收，故均不与脂肪酸发生色谱干扰。另外，我们将膜提取液皂化前于 80℃酸化 1h，这有利于鞘磷脂的水解，因鞘磷脂中脂肪酸与鞘氨醇经酰胺键结合得较牢固，碱皂化不易破坏[3]。我们发现，皂化时温度控制在 75～85℃较佳，高于 85℃时，花生四烯酸等多不饱和脂肪酸降解增加，使其峰高降低且杂峰增多。皂化完成后，用 HCl 中和过剩的 KOH 至关重要，过酸过碱均使 18－冠醚－6

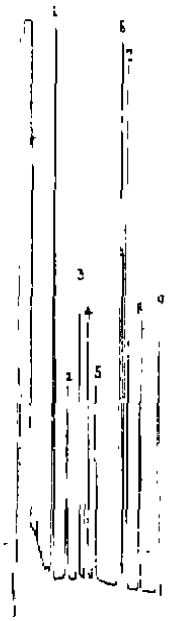


图 1 各标准脂肪酸苯乙酮酯色谱图

1＝C12：0 2＝C20：5 3＝C22：6 4＝C20：4
5＝C18：2 6＝C16：0 7＝C18：1 8＝C17：0
9＝C18：0

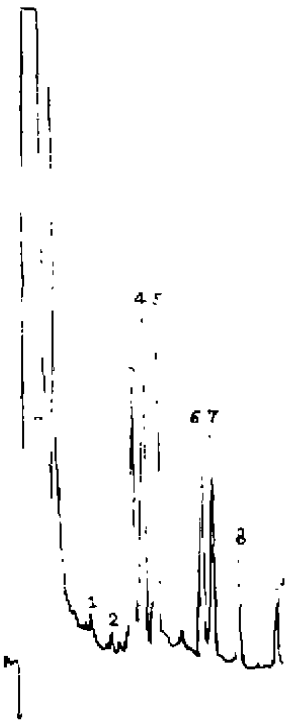


图 2 红细胞膜脂肪酸苯乙酮酯色谱图

1＝C12：0 2＝C20：5 3＝C22：6 4＝C20：4
5＝C18：2 6＝C16：0 7＝C18：1 8＝C17：0
9＝C18：0

表 1 脂肪酸苯乙酮酯的保留时间及校正因子

| FA | 12:0 | 20:5 | 22:6 | 20:4 | 18:2 | 16:0 | 18:1 | 17:0 | 18:0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RT | 17.11 | 22.60 | 27.14 | 29.63 | 32.47 | 41.53 | 43.49 | 48.76 | 55.52 |
| f | 0.320 | 0.327 | 0.506 | 0.700 | 0.302 | 0.605 | 0.599 | 1 | 0.922 |

FA－脂肪酸 RT－保留时间 f－校正因子

维普资讯 http://www.cqvip.com

的作用受影响而致峰高降低，杂峰增多。中和反应后应将溶剂尽量吹干，因甲醇及水的残留将影响衍生化反应进行。

本文用冠醚作相转移催化剂，使酯化反应活化能降低，衍生化反应速度快，产率高（>97%），无副反应，生成物纯度高。多种非质子性溶剂均可作为反应介质。我们用乙腈，效果较佳，脂肪酸衍生化的最佳条件为80℃ 20min。当温度低于70℃时，峰高降低。反应时间大于15min，峰高达最高，我们选用20min。反应完毕后加入醋酸主要是中和残余衍生剂，避免其与柱子反应[4]。

2.3 **内标选择** 鉴于人体内不含正十七酸，且从本色谱图看$C_{16:0}$酸以前存在较多小杂峰，而在$C_{18:1}$酸后杂峰少而基线稳，故选十七酸为内标定量较为准确。

2.4 **人RBC膜脂肪酸构成** 国内有关人RBC膜脂肪酸构成的报道甚少[5]，且均采用气相色谱法（GC）测定。我们发现这些报道与国外用HPLC测定的报道有较大差异[3]。这主要因GC法分析脂肪酸有以下几方面的缺陷。

2.4.1 GC法灵敏度差，分离效果差，定量准确度差。

2.4.2 长碳链酯不易气化，且不饱和脂肪酸在气化温度高时热降解及双键迁移增加。

2.4.3 甲酯化时可产生异构和形成无机酸等[6]。

HPLC法灵敏度高，分离效果好，定量准确，测定时温度低而易于控制，这就极大地减少了测定误差。

经分离鉴定，我们发现人RBC膜主要含有$C_{12:0}$、$C_{20:5}$、$C_{22:6}$、$C_{20:4}$、$C_{18:2}$、$C_{16:0}$、$C_{18:1}$、$C_{18:0}$等八种脂肪酸（见图2）。这与国外有关报道基本一致[3]。在各酸含量方面，$C_{20:4}$含量最高、其次为$C_{18:2}$。这与国外报道略有差异，主要可能因处理方法不一致。我们发现当膜样品血红蛋白残留较多、未加入BHT、室温放置过久、皂化温度过高时，均使$C_{20:4}$和$C_{18:2}$等多不饱和脂肪酸峰高降低，这与其氧化降解有关。

本文建立了一种快速、简便、可靠、经济的分离人RBC膜脂肪酸的方法，这对于科研及临床应用都有较高的实用价值。

## 参考文献


1. 唐建华，等．湖南医科大学学报 1991;16(3):283
2. A.Q.Deng,et al.Diabetes 1991;40:1645
3. G.J.Engelmann.et al.J Chromatogr 1988;432:29
4. Tomes Hanis,et al.J Chromatogr 1988;452:443
5. 潘华珍，等．色谱 1985;3:107
6. 罗建张，等．中华预防医学杂志 1992;5:303


（收稿日期 1995-10-09）

# METHODOLOGICAL RESEARCH FOR THE ANALYSIS OF FATTY ACIDS OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE BY HPLC

*Yang Gangyi, et al*

Dept. of Internal Medicine, The First Hosoital

A high-performance liquid chromatographic method was established for examining fatty acids in human erythrocyte membrane. The fatty acids were derivatized with 2-bromoacetophenone The reaction was catalyzed by 18-Crown-6. The fatty acid esters were analysed on a C18 reversed-phase column with methanol-acetonitrile-water as a mobile phase and heptadecanoic acid(17:0) as the internal standard. The compounds were detected at 254 nm. The eight kinds of fatty acids in human erythrocyte membrane were separated within 60 min.

KEY WORDS HPLC; Erythrocyte membrane; Fatty acids