

# 血清总磷脂脂肪酸组分的固相萃取-气相色谱法分析

谭力<sup>1,2</sup>, 鞠焜先<sup>\*1</sup>, 黎介寿<sup>2</sup>, 周敏<sup>3</sup>, 李小双<sup>3</sup>, 柳晓泉<sup>3</sup>

(1. 南京大学化学系, 生命分析化学教育部重点实验室, 南京 210093;

2. 南京军区总医院普通外科研究所, 南京 210002;

3. 中国药科大学药代研究中心, 南京 210009)

**摘要:**以硅胶基质为固定相, 建立了固相萃取-气相色谱(SPE-GC)分离检测血清总磷脂中脂肪酸含量的方法。优化了SPE的洗脱方式及甲醇洗脱量, 探讨了衍生化步骤的优化条件。该法对磷脂中各脂肪酸组分测定的线性相关系数约为0.999, 回收率在80%左右; 日内误差小于4.8%, 日间误差小于8.9%。用固相萃取柱分离磷脂简单、快速、有效, 用气相色谱检测磷脂中脂肪酸组分方法稳定、可靠。

**关键词:**磷脂; 脂肪酸; 固相萃取柱; 气相色谱

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>; O658.2      **文献标识码:** A

## 1 前言

血清磷脂能反映人中期饮食脂肪的摄入, 在流行病学中是脂肪吸收的一种生物指标。研究磷脂组分, 检测血清中脂类含量的变化, 可以阐明细胞的生理过程和病理现象, 有助于脂类代谢疾患的诊断和治疗。磷脂中脂肪酸组分的测定方法一般是先进行样品中总脂的提取和磷脂分离, 再皂化释放磷脂上结合的脂肪酸, 并经脂肪酸衍生化后进行气相色谱测定。分离磷脂的常规方法是用Folch法<sup>[1]</sup>提取总脂, 进一步用薄层色谱分离磷脂<sup>[2-7]</sup>。该法由于操作复杂, 样品易丢失, 重复性差并且受薄层板面积的限制, 不能同时用于处理较多数量的样品。用氨基基硅胶柱固相萃取法可实现组织中的脂类化合物的分离检测<sup>[8-10]</sup>。这些方法使用多种溶剂分段洗脱出中性脂、游离脂肪酸和极性脂, 步骤烦琐。

本文采用硅胶固相萃取柱萃取, 只使用氯仿和甲醇两种溶剂, 便能方便简单的洗去中性脂、游离脂肪酸而获得磷脂。同时, 通过改进关键实验步骤, 不需皂化步骤, 不仅速度快, 而且可以在短时间内连续处理较多数量的样品。方法操作简单, 重复性好, 结果的可靠性得到提高。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

HP4890型气相色谱仪, 配备火焰离子化检测器(FID)、HP3398A色谱工作站(美国, Agilent公司); HP1100 series型高效液相色谱仪(美国, Agilent公司)。固相萃取柱: 硅胶填充, 3 mL/500mg(江苏汉邦科技有限公司)。

各种脂肪酸标准品、磷脂标准品(美国, Sigma公司); 氯仿、甲醇、正己烷(色谱纯)(德国, Merck公司); 三氟化硼-乙醚溶液(美国, Fluka公司)。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 样品前处理** 取0.5 mL血清或血浆, 加入2 mL甲醇, 充分混匀, 再加入4 mL氯仿, 振荡, 然后以

收稿日期: 2004-12-15      修回日期: 2005-03-11

基金项目: 国家杰出青年科学基金(No. 20325518); 国家重点基础研究发展规划(2003CB515502)

通讯联系人: 鞠焜先, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为生物分析化学。

3 000 r/min 离心 10 min, 吸取下层萃取液, 40℃ 氮气吹干; 残渣用 2 mL 氯仿溶解后, 过柱分离磷脂。

固相萃取小柱先用 2 mL 甲醇洗涤, 4 mL 氯仿活化。样品过柱后, 小柱用 4 mL 氯仿洗涤; 2 mL 甲醇浸泡 30 min 后过柱, 收集洗脱液, 再加 2 mL 甲醇重复这一步骤, 合并两次步骤所得洗脱液, 40℃ 下氮气吹干。残渣中加入 20  $\mu$ L 内标正十七酸 (1 mg/mL), 1 mL 三氟化硼-乙醚: 甲醇溶液 (1:3, V/V) 于 75℃ 水浴反应 30 min, 取出冷却至室温后, 再加入 0.5 mL 水和 1.5 mL 正己烷, 振荡, 再以 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 氮气吹干, 50  $\mu$ L 氯仿溶解, 进样 2  $\mu$ L。

**2.2.2 气相色谱条件** HP-FFAP 石英毛细管色谱柱 (30 m  $\times$  0.32 mm I. D., 0.25  $\mu$ m) (美国, Agilent 公司); 载气: 高纯氮气 (99.999%); 进样器温度: 250℃; 检测器温度: 300℃; 进样量: 2  $\mu$ L; 载气柱头压: 10 psi; 程序升温: 起始 110℃, 8℃/min 升温至 180℃, 保持 10 min, 6℃/min 升温至 230℃, 保持 8 min, 10℃/min 升温至 250℃, 保持 3 min。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 固相萃取条件的优化

**3.1.1 洗脱方法及洗脱量** 磷脂的甲醇洗脱一般采用重力法。分别取 1.5 mg/mL 的磷脂酰胆碱 (PC) 标准品 100  $\mu$ L, 流经活化过的 SPE 柱, 氯仿洗涤后, 用不同量的甲醇洗脱, 分别用 4、8、10、12、16、20 mL 甲醇洗脱并收集洗脱液, 浓缩后进入高效液相色谱系统, 参照文献 [11] 的方法测定各磷脂的含量, 其含量与不经 SPE 柱直接进入 HPLC 的同量磷脂比较, 计算洗脱回收率。

图 1 为甲醇用量对磷脂洗脱回收率的影响。用超过 12 mL 的甲醇洗脱, 回收率可达 95% 以上。如果在用甲醇洗脱时, 将 SPE 柱下端封口, 用甲醇浸泡 SPE 柱 30 min, 依次收集经 2、4、6、8 mL 甲醇浸泡后的洗脱液, 6 mL 甲醇洗脱回收率即达 95% 以上, 因此, 用甲醇适当地浸泡 SPE 柱, 能提高萃取效率。

以磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰丝氨酸 (PS)、鞘磷脂 (SM) 和血样分别代替 PC 进行试验, 也均得出相同的结论。各磷脂经过浸泡洗脱方式的回收率和重现性见表 1。可见, 该方式不仅回收率高, 重现性好, 而且节约溶剂, 也节省了进一步处理时吹干溶剂的时间, 具有更好的应用价值。

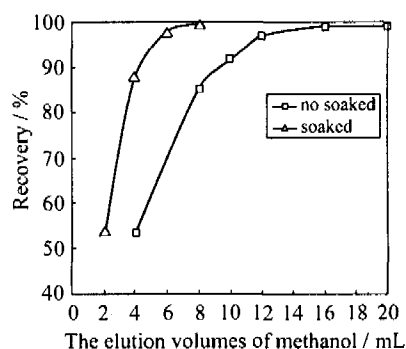


Fig. 1 Effect of methanol on elution model and elution volumes

Table 1 The recoveries and RSDs of phospholipids by solid-phase extraction

Phospholipid	Recovery (%)	RSD (% , n=3)
Phosphatidylcholine (PC)	97.8 $\pm$ 3.2	3.2
Phosphatidylethanolamine (PE)	91.5 $\pm$ 4.4	4.8
Phosphatidylglycerol (PG)	100.6 $\pm$ 3.2	3.2
Phosphatidylinositol (PI)	97.0 $\pm$ 5.3	5.5
Phosphatidylserine (PS)	80.5 $\pm$ 1.6	4.0
Sphingomyelin (SM)	99.8 $\pm$ 4.9	4.9

**3.1.2 磷脂的 SPE 分离效果** 取血样按照实验方法进行处理。过 SPE 柱后分别收集氯仿溶液和甲醇洗脱液, 薄层色谱分离在文献 [5] 的基础上有所改进, 薄层板为 Merck 硅胶 G 板, 展开剂 1: 正己烷: 乙醚 (4:1, V/V); 展开剂 2: 氯仿: 甲醇: 水: 冰乙酸 (48:27:5:1, V/V/V/V), 碘熏法显色。结果显示, 过柱后的氯仿溶液中只含有胆固醇、中性酯、游离脂肪酸和其它脂类物质, 而甲醇洗脱液中仅含有磷脂。

**3.1.3 SPE 柱的重复使用** 同一份血清样品分成 4 份, 分别过同一 SPE 小柱。收集每份甲醇洗脱液后, 小柱充分用氯仿、甲醇洗涤。甲醇洗脱液分别衍生化后进行脂肪酸测定。4 份结果的 RSD 为 3.66%, 具有很好的重现性。因此, 每根 SPE 柱至少可重复使用 4 次。

#### 3.2 衍生化步骤

为了使衍生化步骤得以进行, 通常需用皂化反应释放出磷脂中结合的脂肪酸。皂化反应中常用的碱

有氢氧化钾、氢氧化钠或甲醇钠<sup>[12-16]</sup>。由于衍生化步骤需在酸性和非水条件下进行,磷脂中加入碱后需再用酸中和,并用有机溶剂提取皂化产物。这些步骤导致回收率降低。本文分别取 150  $\mu\text{g}$  PC 标准品,用五种方式进行实验,优化衍生化过程,避免了皂化步骤。这五种方式分别是:A)加入 1 mL 三氟化硼-乙醚:甲醇溶液(1:3,V/V),置水浴 30 min;B)加入 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 1 mL,置 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min,然后再按照 A 进行;C)加入 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 1 mL,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1 h 后加入 2 mol/L 盐酸 0.3 mL 中和,用正己烷-异丙醇(4:1,V/V)溶液提取脂肪酸,吹干,按照 A 进行;D)加入 0.5 mol/L 甲醇钠-甲醇溶液 1 mL,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min,按照 A 进行;E)加入 2.5 mol/L 氢氧化钠 0.1 mL,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min,用 2 mol/L 盐酸调 pH 至酸性,用正己烷-异丙醇(4:1,V/V)溶液提取脂肪酸,按照 A 进行。衍生化后,分别用正己烷萃取脂肪酸甲酯,测定脂肪酸总量,如图 2 所示。

三氟化硼是很强的催化剂,磷脂在该催化剂的作用下能与甲醇反应释放出脂肪酸甲酯,而无需皂化步骤,因此,选用三氟化硼为衍生剂。从图 2 可知,A 法测定的脂肪酸总量明显高于 C、D、E 三种方法,略高于方法 B。可见,A 法具有较高的回收率,并省去了皂化步骤,操作简单。

### 3.3 方法学验证

血样磷脂中以磷脂酰胆碱(卵磷脂,PC)含量最高,故选择考察 PC 中的脂肪酸含量以进行方法的验证。

**3.3.1 标准曲线与线性范围** 分别配制浓度为 3、15、30、75、150、300、600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PC 标准品溶液,按照实验方法以正十六碳酸甲酯(C16:0)、十六碳一烯酸甲酯(C16:1n7)、正十八碳酸甲酯(C18:0)、十八碳一烯酸甲酯(C18:1n9)、十八碳二烯酸甲酯(C18:2n6)、二十碳四烯酸甲酯(C20:4n6)和二十二碳六烯酸甲酯(C22:6n3)峰面积与内标峰面积比对浓度作标准曲线,其相关系数列于表 2。可见,在上述浓度范围内各脂肪酸与内标峰面积比与浓度具有很好的线性关系。

**3.3.2 精密度** 取混合血样,按实验方法在同一天,以及以后两天取样进行处理,测定其中的磷脂脂肪酸含量,结果列于表 2。日内变异系数小于 4.8%,日间变异系数小于 8.9%。可见,建立的方法具有可接受的精密度。

**3.3.3 血样回收率** 取 500  $\mu\text{L}$  血清加入 20  $\mu\text{L}$  PC (1.5 mg/mL),按实验方法进行处理,测定原有磷脂中脂肪酸的含量以及加入标准品后的脂肪酸含量,计算回收率,三次平均结果见表 2。正十六碳酸甲酯和十八碳二烯酸甲酯的回收率略低,为 62%和 73%,其它脂肪酸的回收率均大于 80%。

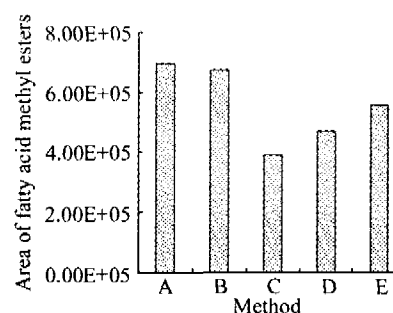


Fig. 2 Comparison of the analytical results obtained with different treatment methods

Table 2 The validation of proposed method

Fatty acids symbol	Correlation coefficients ( $r^2$ )	CV within-day (% , $n=5$ )	CV between-day (% , $n=3$ )	Recovery (% , $n=3$ )
C16:0	0.9996	4.8	6.6	62
C16:1n7	0.9993	2.4	7.9	82
C18:0	0.9994	2.4	4.2	84
C18:1n9	0.9996	4.3	6.2	85
C18:2n6	0.9996	4.5	7.2	73
C20:4n6	0.9999	4.1	8.9	93
C22:6n3	0.9991	2.6	6.9	92

### 3.4 血清样品分析

图 3 分别为标准脂肪酸甲酯色谱图和某一短肠综合症病人的血清磷脂脂肪酸经固相萃取-衍生化处理后的色谱图。从图 3 中可知,各种脂肪酸甲酯用本文提出的固相萃取-衍生化方法处理后能实现基线分离。实验结果表明,该法完全适用于临床要求。

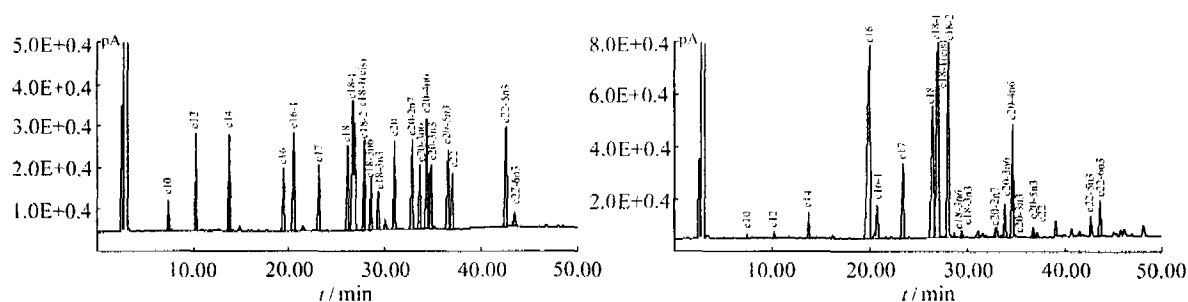


Fig. 3 Chromatograms of fatty acids in standard (A) and sample (B) solutions after methyl ester derivatization

### 参考文献:

- [1] Folch J, Lees M, Stanley G. J. Biol. Chem. [J], 1957, **226**: 497.
- [2] Hoving E B, Prins J, Rutgers H M, Muskiet F A J. J. Chromatogr. Biomed. Appl. [J], 1988, **434**: 411.
- [3] Korte K, Casey M L. J. Chromatogr. Biomed. Appl. [J], 1982, **232**: 47.
- [4] Kolarovic L, Fournier N C. Anal. Biochem. [J], 1986, **156**: 244.
- [5] ZHANG Shu-feng(张抒峰), CHANG Li-wen(常理文). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 1994, **22**(4): 345.
- [6] Weerheim A M, Kolb A M, Sturk A, Nieuwland R. Anal. Biochem. [J], 2002, **302**: 191.
- [7] HE Hai-bo(何海波), ZHANG Wei-nong(张维农), DA Shi-lu(达世禄), FENG Yu-qi(冯钰琦). J. Anal. Sci. (分析科学学报)[J], 2004, **20**: 97.
- [8] Kaluzny M A, Duncan L A, Merritt M V, Epps D E. J. Liq. Res. [J], 1985, **26**: 135.
- [9] Pinkart H C, Devereux R, Chapman P T. J. Micro. Method[J], 1998, **34**: 9.
- [10] Ruiz J, Antequera T, Andres A I, Petron M J, Euriel E. Anal. Chim. Acta[J], 2004, **520**: 201.
- [11] Terry L K, Kurt C N, Arthur A S. J. Lipid Res. [J], 1983, **24**: 1398.
- [12] Guan Z Z, Grunler J, Piao S, Sindelar P J. Anal. Biochem. [J], 2001, **297**: 137.
- [13] Ingalls S T, Xu Y, Hoppel C. J. Chromatogr. B[J], 1995, **666**: 1.
- [14] Chen S H, Chuang Y J. Anal. Chim. Acta[J], 2002, **465**: 145.
- [15] Eder K, Reichlmayr-Lais A M, Kirchgessner M. J. Chromatogr. [J], 1992, **607**: 55.
- [16] Vincent P D, Meinertz H. J. Biochem. [J], 1960, **235**: 2595.

## Analysis of Fatty Acid of Phospholipids in Serum by Solid Phase Extraction-Gas Chromatography

TAN Li<sup>1,2</sup>, JU Huang-xian<sup>\*1</sup>, LI Jie-shou<sup>2</sup>, ZHOU Min<sup>3</sup>, LI Xiao-shuang<sup>3</sup>, LIU Xiao-quan<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science (Education Ministry of China),  
Nanjing University, Nanjing 210093;

2. Research Institute of General Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002;

3. Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**Abstract:** A analytical method for fatty acids profile of phospholipids in serum samples was developed by solid extraction column of silica gel-gas chromatography (SPE-GC). The model of elution and the amount of methanol used for solid phase extraction were optimized. A derivatization method without saponification step of the sample was proposed. The linearity of the measurement was good with the coefficients of more than 0.999. The recoveries of fatty acids were about 80%. Within-day and between-day RSD were less than 4.8% and 8.9%, respectively. The method for separation of phospholipids was simple, rapid and effective compared with thin-layer chromatography. Gas chromatographic detection was a stable and efficient method for the determination of fatty acids of phospholipids in serum samples.

**Keywords:** Phospholipids; Fatty acids; Solid phase extraction; Gas chromatography