

游离脂肪酸对模型胆汁相平衡的影响

葛美珍, 刘元冲, 张 敏, 安学勤

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

[关键词] 高效液相色谱法, 模型胆汁, 脂肪酸, 相平衡, 稳定性

[中图分类号] O642.4⁺2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)03-0122-03

0 引言

随着饮食结构的改变, 胆结石的发病率也不断增加, 其中大多数为胆固醇结石. 胆结石及其引发的胆绞痛、急性胆囊炎、胰腺炎以及其它胆道并发症严重地危害着人民群众的健康, 因此, 对胆固醇结石成因的研究和防治具有十分重要的意义. 近十年来, 人们对胆固醇结石的成因做了大量的研究, 但是, 绝大多数的研究都从动力学的角度考虑胆结石的生成速率以及影响结石生长速率的主要因素, 研究各种外界因素对模型胆汁热力学平衡的影响及其胆结石的生成还鲜见报道. 已有研究表明, 饮食中游离脂肪酸会影响胆固醇的新陈代谢^[1], 比较胆固醇结石患者和正常人胆汁中的游离脂肪酸的含量和分子种类发现, 在胆固醇结石患者胆囊胆汁内, 饱和脂肪酸的含量显著高于正常人^[2], 可能影响胆汁中脂浓度的改变^[3]. 本文以 $\text{Sm all}^{[4, 5]}$ 模型胆汁热力学为基础, 利用我们前期开拓的同时测定模型胆汁中胆汁酸、卵磷脂和胆固醇的高效液相色谱法^[6], 采用热力学研究手段和相平衡研究方法, 考察了各种游离脂肪酸对模型胆汁稳定性的作用影响, 研究了它们的浓度对模型胆汁热力学平衡的影响.

1 实验部分

根据实验要求配制一系列不同组分的胆固醇过饱和溶液的模型胆汁样品, 其主要的实验步骤为: 称取一定量的胆固醇、卵磷脂、胆汁酸盐, 混合于三角烧瓶中, 分别称取适量的硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸于 25 mL 三角烧瓶中, 用体积比为 2:1 的氯仿-甲醇溶液溶解, 溶解后的溶液放置于旋转蒸发仪中在 40℃ 恒温水浴中旋转蒸发, 使溶剂挥发, 样品成玻璃态或粘稠状后, 抽真空至恒重. 在该体系中加入一定量的 NaCl 水溶液 (0.15 mol/L), 使总脂浓度达 10%, 然后充满 N_2 气, 在密封条件下 65℃ 水浴震荡 1 h, 逐渐冷却至 37℃, 在恒温水浴中保持 5 d.

使用美国 Agilent 公司生产的 1100 高效液相色谱系统, Lichrospher C18 柱 (Column 4.6 × 150 mm, Media 10 nm ~ 5 μm), G1315B 型 DAD 检测器. 选用不同配比的甲醇、乙腈、乙酸钠 磷酸缓冲溶液作为流动相, 采用梯度洗脱法, 同时分析检测模型胆汁中胆固醇、卵磷脂和胆酸盐的浓度, 根据测试结果, 绘制胆固醇饱和胆汁曲线的三角相图.

2 结果与讨论

2.1 不同的游离脂肪酸对胆固醇饱和溶解度的影响

在模型胆汁中添加不同的游离脂肪酸 (硬脂酸、油酸、 α -亚麻酸和亚油酸) 配制模型胆汁饱和溶液, 根

收稿日期: 2007-03-28 修回日期: 2007-04-20

基金项目: 国家自然科学基金 (20273032, 20673059, 20573056)、江苏省高新技术研究计划 (BG2005041) 资助项目.

作者简介: 葛美珍 (1973—), 女, 硕士研究生, 主要从事物理化学的学习与研究. E-mail: gmeizhen@yahoo.com.cn

通讯联系人: 安学勤 (1951—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事物理化学的教学与研究. E-mail: anxueqin@njnu.edu.cn

据高效液相色谱分析检测的结果, 绘制胆固醇饱和和溶解度三角相图, 如图 1~4 所示 (图中标号 1 为一相区, 标号 2 为两相区)。比较以上 4 个相同浓度 (7 mmol/L) 不同游离脂肪酸的模型胆汁体系的相图可以看出: 在三角相图中胆固醇饱和曲线的左边 (富含胆汁酸) 的胶束区域^[7], 各种游离脂肪酸对胆固醇的饱和和溶解度曲线无明显影响, 而在三角相图中胆固醇饱和曲线的右边的泡囊区域^[7], 各种游离脂肪酸对模型胆汁的影响明显不同, 硬脂酸和油酸的加入使模型胆汁的一相区变小, 而亚麻酸和亚油酸的加入使模型胆汁的一相区变大, 即: 加入硬脂酸和油酸减小模型胆汁中胆固醇的溶解度, 使胆固醇的饱和曲线收缩; 而加入亚麻酸和亚油酸增加胆固醇的溶解度, 使胆固醇的饱和曲线扩大。

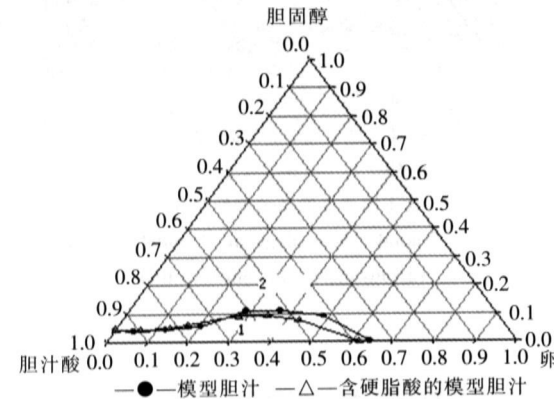


图 1 含硬脂酸的模型胆汁三角相图

Fig.1 Triangle phase diagram of model bile with stearic acid

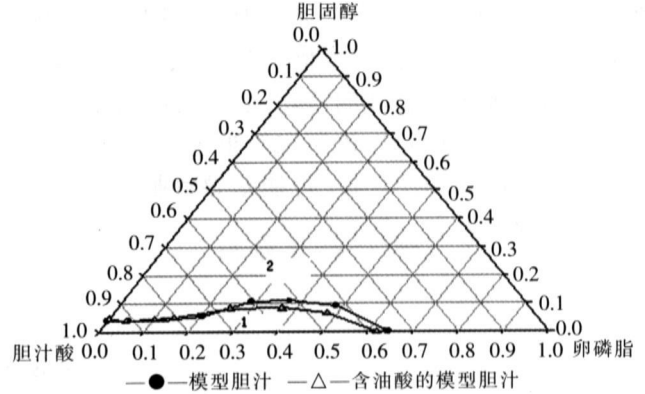


图 2 含油酸的模型胆汁三角相图

Fig.2 Triangle phase diagram of model bile with oleic acid

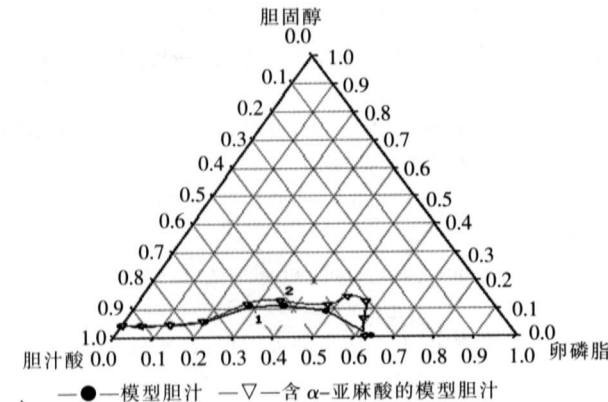


图 3 含 α-亚麻酸的模型胆汁三角相图

Fig.3 Triangle phase diagram of model bile with α-linolenic acid

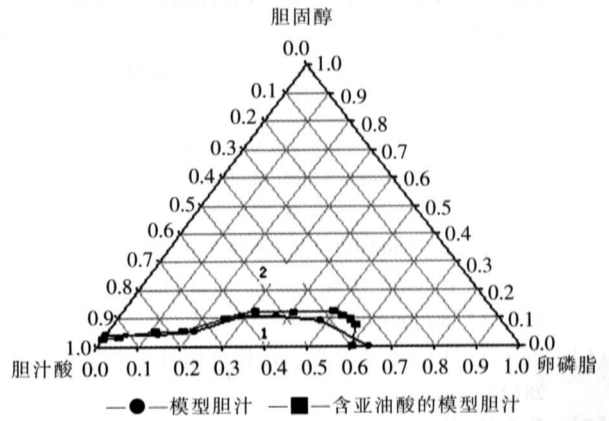


图 4 含亚油酸的模型胆汁三角相图

Fig.4 Triangle phase diagram of model bile with linoleic acid

该实验结果可能因为不同的游离脂肪酸与模型胆汁中的主要成分 (胆固醇、胆汁酸和卵磷脂) 的作用不同所致。硬脂酸和油酸可能和胆固醇竞争与胆盐和卵磷脂的结合位点, 促使胆固醇在胆汁中溶解度发生改变, 从而使胆固醇结晶沉淀形成结石; 亚油酸和亚麻酸可能协同胆固醇与胆汁酸和卵磷脂形成囊泡, 使其在结构上更稳定。这与文献报道的亚麻酸与胆固醇形成的酯有利于形成 HDL (高密度脂蛋白)、从而起到纠正脂类代谢紊乱、减少成石因素作用^[8]的研究结果一致。该促进胆固醇溶解的作用也可能是由于亚麻酸影响 HMG-CoA (3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A) 还原酶的活性, 使胆固醇变为胆汁酸作用增强, 减少胆汁中胆固醇蓄积^[9]。

2.2 不同浓度的油酸对胆固醇饱和和溶解度的影响

本文以油酸为模型考察了不同浓度的游离脂肪酸对模型胆汁稳定性的影响。配制油酸的浓度分别为 7 和 14 mmol/L 的模型胆汁饱和溶液, 在温度为 37°C 条件下, 采用高效液相色谱法, 选择合适的流动相以及梯度洗脱方法, 同时分析测定饱和模型胆汁中的胆固醇、卵磷脂和胆酸盐的含量, 绘制模型胆汁三角相图 (如图 5)。

由图 5 可以看出, 胆固醇饱和和溶解度的一相区随着油酸浓度的增加逐渐缩小。该研究结果与文献报道的在胆汁中加入软脂酸及油酸可以明显缩短胆汁的成核时间, 且缩短时间与加入的剂量有关^[10]的结果一

致. 由此可见, 在胆汁中游离脂肪酸的浓度是影响成核的重要因素之一, 本实验的实验结果也证实了这一现象.

3 结论

本文采用高效液相色谱梯度洗脱方法, 考察了游离脂肪酸及其浓度对模型胆汁稳定性的影响. 研究表明: 不同的游离脂肪酸对模型胆汁的影响不同, 硬脂酸和油酸使模型胆汁不稳定, 而亚麻酸和亚油酸可增加模型胆汁的稳定性. 并且随着浓度的增大, 这种趋势更明显. 该研究结果表明: 游离脂肪酸影响模型胆汁的稳定性, 可能是导致胆固醇结石产生的主要原因之一.

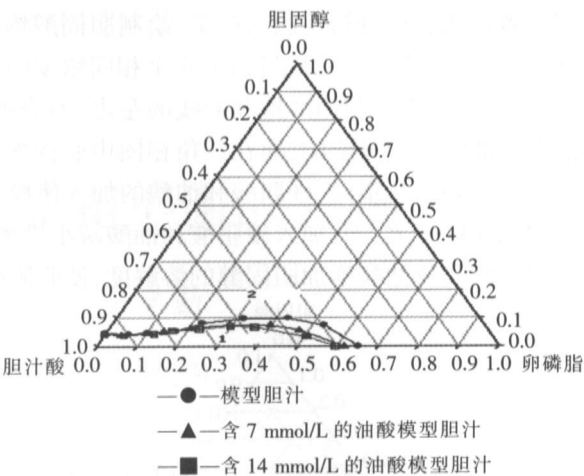


图 5 含不同浓度油酸的模型胆汁三角相图
Fig.5 Triangle phase diagram of model bile with various oleic acid concentration

[参考文献]

[1] Elena Bravo, Loredana F. Bra, Alfredo Cantafora, et al. The influence of dietary saturated and unsaturated fat on hepatic cholesterol metabolism and the biliary excretion of chylomicron cholesterol in the rat[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1390 (2): 134-148.

[2] 王巍, 韩天权, 张圣道. 胆固醇结石病胆汁游离脂肪酸的水平及其临床意义[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(11): 659-661.

[3] María Dolores Yagü, Victoria González, Pilar Serrano, et al. Effect of the type of dietary fat on biliary lipid composition and bile lithogenicity in humans with cholesterol gallstone disease[J]. Nutrition, 2005, 21(3): 339-347.

[4] Adrian W. H. Small D. M. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1968, 47(5): 1 043-1 051.

[5] Carey M. C, Small D. M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1978, 61(4): 998-1 026.

[6] 许久辰, 郑碧云, 安学勤, 等. 模型胆汁中各组分含量高效液相色谱法测定[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2005, 28(1): 74-76.

[7] 许久辰. 外界因素对模型胆汁相平衡的影响[D]. 南京: 南京师范大学, 2005.

[8] Larking P, Nye E. R. Increased levels of esterified arachidonic acid in plasma by feeding γ-linolenic acid[J]. Nutr Metab, 1975, 19(3/4): 127-130.

[9] 朱东晨, 关文曾, 廖谨瑜, 等. 月见草油预防豚鼠胆固醇结石的实验研究[J]. 胆固醇基础与临床杂志, 1997, 4(1): 41.

[10] 王巍, 韩天权, 张圣道. 游离脂肪酸在胆固醇结石成核中的作用[J]. 中华医学杂志, 1995, 75(5): 291-294.

[责任编辑: 丁 蓉]