



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104254775 B

(45)授权公告日 2017.07.21

(21)申请号 201380012298.1

C11B 5/00(2006.01)

(22)申请日 2013.01.11

G01N 1/36(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104254775 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2014.12.31

WO 2005/116081 A2,2005.12.08,

WO 2005/116081 A2,2005.12.08,

(30)优先权数据

CN 1192648 A,1998.09.09,

CN 1170460 A,1998.01.14,

2012900110 2012.01.11 AU

JP 特开平4-293506 A,1992.10.19,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.09.03

US 2004/0115689 A1,2004.06.17,

WO 00/14532 A1,2000.03.16,

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/AU2013/000021 2013.01.11

WO 00/37602 A1,2000.06.29,

US 6379318 B1,2002.04.30,

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/104025 EN 2013.07.18

Ruby Gupta等.Use of dried blood for measurement of trans fatty acids.

《Nutrition Journal》.2009,第8卷第35~39页.

(73)专利权人 阿德莱德研究及创新控股有限公司  
地址 澳大利亚南澳大利亚

Snezana Micic等.Improved stability of apolipoproteins A-I and B in filter-paper blood spots impregnated with ascorbic acid.《Clinical Chemistry》.1995,第41卷(第7期),第1042~1043页.

(72)发明人 罗伯特·吉布森 刘·戈

(续)

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

审查员 王方

代理人 王思琪 高瑜

(51)Int.Cl.

G01N 30/50(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/92(2006.01)

A61B 5/15(2006.01)

权利要求书4页 说明书27页 附图6页

(54)发明名称

储存于固体介质上的生物样品中脂肪酸的稳定化和分析

(57)摘要

本发明涉及使用一种固体介质(如纸、基于玻璃的基质、基于纸的基质、基于纤维素的基质、亲水性聚合物、聚四氟乙烯、玻璃纤维及多孔陶瓷)使如体液(例如血液、唾液、乳汁、尿液、精液、血浆及血清)等的一份样品中存在的脂肪酸稳定的一种方法,该固体介质包含螯合剂(例如乙二

胺四乙酸、抗坏血酸、柠檬酸或其盐)、抗氧化剂(例如丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚或叔丁基氢醌)及低于约2 μg/cm<sup>2</sup>的污染物,该固体介质能够使施加于其的脂肪酸稳定;及一种用于制备此类介质的方法。本发明另外涉及一种用于对储存于此类介质上的一份样品的脂肪酸组成进行测定的方法。

CN 104254775 B

[接上页]

(56)对比文件

Zhiping Zhang等.Silica coated paper substrate for paper-spray analysis of therapeutic drugs in dried blood spots.

《analytical chemistry》.2011,第84卷第931~938页.

Bailey-Hall等.Validation of a Rapid Measure of Blood PUFA Levels in Humans.《Lipids》.2007,第43卷第181~186页.

1. 一种用于使脂肪酸稳定的方法,该方法包括将这些脂肪酸,或包含这些脂肪酸的一个样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,

其中该污染物为这样一种或更多种化合物,与在将这些脂肪酸或这些包含脂肪酸的样品施加到该固体基质之前脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值相比较,其在该固体基质中的存在使脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值增加或减小。

2. 如权利要求1所述的方法,其中该固体基质包含低于 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

3. 如权利要求2所述的方法,其中该固体基质包含低于 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

4. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中这些污染物是饱和脂肪酸。

5. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于玻璃的基质、一种基于纸的基质、一种基于纤维素的基质、亲水性聚合物、聚四氟乙烯、玻璃纤维及多孔陶瓷。

6. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于纸的基质及一种基于玻璃的基质。

7. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该固体基质是装载硅胶的纸。

8. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该固体基质是一种玻璃微纤维过滤器。

9. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该样品是一种生物样品。

10. 如权利要求9所述的方法,其中该生物样品为一种体液。

11. 如权利要求10所述的方法,其中该体液选自下组,该组由以下各项组成:血液、唾液、乳汁、尿液、精液、血浆及血清。

12. 如权利要求11所述的方法,其中该体液为血液。

13. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该至少一种螯合剂为乙二胺四乙酸、抗坏血酸或其盐、或柠檬酸或其盐。

14. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该至少一种抗氧化剂为丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚或叔丁基氢醌。

15. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该螯合剂为抗坏血酸和/或乙二胺四乙酸并且该抗氧化剂为丁基化羟基甲苯。

16. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中这些脂肪酸是不饱和脂肪酸。

17. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该固体介质为一个条带的形式。

18. 如权利要求17所述的方法,其中该条带具有的尺寸为 $1\text{cm}\times 3\text{cm}$ 。

19. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该至少一种抗氧化剂是以介于 $0.01\text{mg}$ 与 $1\text{mg}$ 之间的一种量存在于该固体介质上。

20. 如权利要求1到3中任一项所述的方法,其中该至少一种螯合剂是以介于 $0.01\text{mg}$ 与 $1\text{mg}$ 之间的一种量存在于该固体介质上。

21. 根据权利要求1所述的用于使脂肪酸稳定的方法,该方法包括将这些脂肪酸或包含这些脂肪酸的一种流体施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种玻璃微纤维过滤器或装载硅胶的纸、乙二胺四乙酸和/或抗坏血酸及丁基化羟基甲苯。

22. 一种用于对包含脂肪酸的样品的脂肪酸组成进行测定的方法,该方法包括:

(a) 将该样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂

及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,这样使得该样品被吸着到该固体基质上;和

(b) 测定被吸着到该固体基质上的该样品的脂肪酸组成,

其中该污染物为这样一种或更多种化合物,与在将这些脂肪酸或这些包含脂肪酸的样品施加到该固体基质之前脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值相比较,其在该固体基质中的存在使脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值增加或减小。

23. 如权利要求22所述的方法,其中该固体基质包含低于 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

24. 如权利要求22所述的方法,其中该固体基质包含低于 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

25. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中这些污染物是饱和脂肪酸。

26. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于玻璃的基质、一种基于纸的基质、一种基于纤维素的基质、亲水性聚合物、聚四氟乙烯、玻璃纤维及多孔陶瓷。

27. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于纸的基质及一种基于玻璃的基质。

28. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该固体基质是装载硅胶的纸。

29. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该固体基质是一种玻璃微纤维过滤器。

30. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该样品是一种生物样品。

31. 如权利要求30所述的方法,其中该生物样品为一种体液。

32. 如权利要求31所述的方法,其中该体液选自下组,该组由以下各项组成:血液、唾液、乳汁、尿液、精液、血浆及血清。

33. 如权利要求32所述的方法,其中该体液为血液。

34. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该至少一种螯合剂为乙二胺四乙酸、抗坏血酸或其盐、或柠檬酸或其盐。

35. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该至少一种抗氧化剂为丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚或叔丁基氢醌。

36. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中该螯合剂为抗坏血酸和/或乙二胺四乙酸并且该抗氧化剂为丁基化羟基甲苯。

37. 如权利要求22到24中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括:

(i) 对被吸着到该固体基质上的该样品的至少一部分进行萃取以提供一种包含衍生化脂肪酸的萃取物;

(ii) 基于这些衍生化脂肪酸的量来确定该样品的脂肪酸组成。

38. 一种固体介质,所述介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,

其中该污染物为这样一种或更多种化合物,与在将脂肪酸或包含脂肪酸的样品施加到该固体基质之前脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值相比较,其在该固体基质中的存在使脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值增加或减小。

39. 如权利要求38所述的固体介质,其中该固体基质包含低于 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

40. 如权利要求39所述的固体介质,其中该固体基质包含低于 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

41. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中这些污染物是饱和脂肪酸。
42. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于玻璃的基质、一种基于纸的基质、一种基于纤维素的基质、亲水性聚合物、聚四氟乙烯、玻璃纤维及多孔陶瓷。
43. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于纸的基质及一种基于玻璃的基质。
44. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该固体基质是装载硅胶的纸。
45. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该固体基质是一种玻璃微纤维过滤器。
46. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该至少一种螯合剂为乙二胺四乙酸、抗坏血酸或其盐、或柠檬酸或其盐。
47. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该至少一种抗氧化剂为丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚或叔丁基氢醌。
48. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该螯合剂为抗坏血酸和/或乙二胺四乙酸并且该抗氧化剂为丁基化羟基甲苯。
49. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该固体介质为一个条带的形式。
50. 如权利要求49所述的固体介质,其中该条带具有的尺寸为1cm×3cm。
51. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该至少一种抗氧化剂是以介于0.01mg与1mg之间的一种量存在于该固体介质上。
52. 如权利要求38到40中任一项所述的固体介质,其中该至少一种螯合剂是以介于0.01mg与1mg之间的一种量存在于该固体介质上。
53. 根据权利要求38所述的固体介质,所述介质包含一种玻璃微纤维过滤器或装载硅胶的纸、乙二胺四乙酸和/或抗坏血酸及丁基化羟基甲苯。
54. 一种用于制备固体介质的方法,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,所述方法包括了提供包含一种固体基质的一种固体介质并且将该至少一种螯合剂和该至少一种抗氧化剂施加到该固体介质,其中该固体基质包含低于 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,其中该污染物为这样一种或更多种化合物,与在将脂肪酸或包含脂肪酸的样品施加到该固体基质之前脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值相比较,其在该固体基质中的存在使脂肪酸占总脂质的比例的比例计算值增加或减小。
55. 如权利要求54所述的方法,其中该固体基质包含低于 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。
56. 如权利要求55所述的方法,其中该固体基质包含低于 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。
57. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中这些污染物是饱和脂肪酸。
58. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于玻璃的基质、一种基于纸的基质、一种基于纤维素的基质、亲水性聚合物、聚四氟乙烯、玻璃纤维及多孔陶瓷。
59. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该固体基质选自下组,该组由以下各项组成:纸、一种基于纸的基质及一种基于玻璃的基质。
60. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该固体基质是装载硅胶的纸。

61. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该固体基质是一种玻璃微纤维过滤器。

62. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该至少一种螯合剂为乙二胺四乙酸、抗坏血酸或其盐、或柠檬酸或其盐。

63. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该至少一种抗氧化剂为丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚或叔丁基氢醌。

64. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该螯合剂为抗坏血酸和/或乙二胺四乙酸并且该抗氧化剂为丁基化羟基甲苯。

65. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该至少一种抗氧化剂和该至少一种螯合剂是以一种单一溶液,或一种溶液包含该至少一种抗氧化剂并且一种溶液包含该至少一种螯合剂的多种分开的溶液的形式施加到该固体介质上。

66. 如权利要求65所述的方法,其中该单一溶液或该多种分开的溶液包含醇和水。

67. 如权利要求65所述的方法,其中该溶液中该至少一种抗氧化剂的浓度介于0.1mg/mL与10mg/mL之间。

68. 如权利要求65所述的方法,其中该溶液中该至少一种螯合剂的浓度介于1mg/mL与10mg/mL之间。

69. 如权利要求54到56中任一项所述的方法,其中该固体介质为一个条带的形式。

70. 如权利要求69所述的方法,其中施加到该条带的溶液的量介于1与500 $\mu$ L之间。

71. 如权利要求69所述的方法,其中该条带具有的尺寸为1cm $\times$ 3cm。

72. 一种试剂盒,包括如权利要求38到53中任一项所述的固体介质。

73. 根据权利要求72所述的试剂盒,另外包括一个尖锐物体,用于从一位受试者获得一个包含脂肪酸的样品。

74. 如权利要求73所述的试剂盒,其中该样品是血液。

## 储存于固体介质上的生物样品中脂肪酸的稳定化和分析

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于使如体液等样品中存在的脂肪酸稳定的方法。本发明另外涉及一种固体介质,该固体介质能够使施加于其的脂肪酸稳定,及一种用于制备其的方法。本发明另外涉及一种用于测定样品的脂肪酸组成的方法。

[0002] 发明背景

[0003]  $\omega$ -3脂肪酸,尤其是二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的高摄入量已经与成人心血管疾病、神经退化性疾病、糖尿病及关节炎的减少以及早产儿的智力发育改善相关联。因此,全世界的卫生当局现都推荐,例如通过每周消费2到3次包括鱼的膳食将增加 $\omega$ -3脂肪酸的摄入。

[0004] 针对心脏保护的饮食 $\omega$ -3脂肪酸推荐包括将每周的鱼摄入增加到两次多脂鱼膳食,或对于男性和女性对应地消费600或400毫克/天的长链 $\omega$ -3脂肪酸。尽管已知这些推荐将使细胞 $\omega$ -3脂肪酸水平增加到临床试验中的心脏保护范围内的水平,但关于这些推荐如何影响普通群体的脂肪酸状况的知识几乎是未知的。由于血液中的脂肪酸状况是评价人群中心脏风险并且鉴别将从饮食 $\omega$ -3脂肪酸补充获益的那些个体的一种有用的标志,故脂肪酸状况的评价是很重要的。

[0005] 用作人体器官中脂肪酸状况的一种标志的人血液样品脂肪酸特征已经变为用于了解饮食脂肪酸摄入与脂肪酸状况之间的关系的一个重要工具,因为血液水平被认为反映了生物作用并且血液是易获取以收集用于人类研究中的。然而,检验血液中的脂肪酸的常规方法涉及静脉血液收集以及一个昂贵、耗时的多步骤过程,这限制了它作为一种筛选工具的有用性。因此,需要一种快速、廉价并且可靠的用于测量细胞 $\omega$ -3脂肪酸水平的手段。

[0006] 截至目前,尚无可用的这样一种针对人血液中存在 $\omega$ -3脂肪酸水平(称为 $\omega$ -3指数)的快速并且可靠的测试。在过去数年里,若干公司曾提出一种血斑测试,在该测试中,在刺破手指之后,将血斑放到含或不含一种或多种抗氧化剂的一小张滤纸上。干燥之后,将该滤纸送到中心实验室进行分析。已经要求的是,血斑中的脂肪酸可稳定数周并且可以获得一种针对 $\omega$ -3指数的可靠措施。本发明人曾尝试重现这些测试并且发现脂肪酸随时间发生显著降解。

[0007] 一种此类产品是由西格玛-阿尔德里奇公司(Sigma-Aldrich)开发的用于直接评估血斑中的n-3和n-6长链聚不饱和脂肪酸的弗鲁卡(Fluka)血液收集试剂盒。对收集于弗鲁卡试剂盒纸上并在室温下储存的血斑样品进行的唯一的长期稳定性研究显示,在1个月之后,长链聚不饱和脂肪酸水平(占总脂肪酸的百分比)显著下降(闵(Min)等,《前列腺素、白三烯及必需脂肪酸》(Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids), 2011 84,13-18)。因此,长链聚不饱和脂肪酸的氧化使得这一血斑方法不实用,因为如果打算比较结果,就有必要在收集之后的固定时间对所有样品进行分析。

[0008] 因此,需要一种简单、快速并且可靠的用于测定血液中脂肪酸含量的方法,其中使在该血液储存期间脂肪酸的降解减到最少或消除。

[0009] 意外的是,诸位发明人已经发现,在干燥的血斑内的脂肪酸可以在环境条件下稳

定数月时间。诸位发明人还发现,通过使这些脂肪酸稳定并且通过控制固体介质中的污染物可以实现对于在该固体介质上储存数月时间的血液的脂肪酸组成的特别准确的测定。

[0010] 发明概述

[0011] 在一个第一方面,本发明提供了一种用于使脂肪酸稳定的方法,该方法包括将这些脂肪酸,或包含这些脂肪酸的一份样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

[0012] 该样品可以是一种生物样品。

[0013] 该生物样品可以是一种体液,例如血液、唾液、乳汁、尿液、精液、血浆、滑液、血清等。

[0014] 该体液可以是一种哺乳动物体液。

[0015] 该样品可以是一种包含这些脂肪酸的流体,例如一种体液。

[0016] 这些脂肪酸可以是,或可以包含不饱和脂肪酸。

[0017] 这些脂肪酸可以是,或可以包含长链聚不饱和脂肪酸(LCPUFA)。

[0018] 这些脂肪酸可以是,或可以包含 $\omega$ -3脂肪酸,例如EPA、DHA等。

[0019] 在一个第二方面,本发明提供了一种用于对包含脂肪酸的样品的脂肪酸组成进行测定的方法,该方法包括:

[0020] (a) 将该样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,这样使得该样品被吸着到该固体基质上;

[0021] (b) 测定被吸着到该固体基质上的该样品的脂肪酸组成。

[0022] 该样品可以是一种生物样品。在一个实施例中,该生物样品是一种体液,例如血液、唾液、乳汁、尿液、精液、血浆、滑液、血清等。

[0023] 该方法可以包括测定该样品中一种或多种类别的脂肪酸的量占该样品中总脂质的比例,或占该样品中总脂肪酸的比例。

[0024] 施加到该固体介质的该样品的量可以低于约 $100\mu\text{L}$ ,或低于约 $50\mu\text{L}$ ,或低于约 $20\mu\text{L}$ 。

[0025] 步骤(b)可以在步骤(a)之后数周或数月进行。

[0026] 以下陈述适用于该第一和该第二方面:

[0027] 该固体基质可以包含低于约 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,或低于约 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

[0028] 这些污染物可以是饱和脂肪酸。

[0029] 该固体基质可以是纸、一种基于纸的基质或一种基于玻璃的基质。

[0030] 该基于纸的基质可以是装载硅胶的纸。

[0031] 该基于玻璃的基质可以是一种玻璃微纤维过滤器。

[0032] 该至少一种螯合剂可以是乙二胺四乙酸(EDTA)、抗坏血酸或其盐、或柠檬酸或其盐。

[0033] 该至少一种抗氧化剂可以是丁基化羟基甲苯(BHT)、丁基化羟基苯甲醚(BHA)或叔丁基氢醌。

[0034] 以上所述的螯合剂与抗氧化剂的任何组合都涵盖在内。

- [0035] 在一个实施例中,该螯合剂是抗坏血酸和/或EDTA并且该抗氧化剂为BHT。
- [0036] 该固体介质可以是一个条带的形式。
- [0037] 该条带具有的尺寸可以是约1cm×3cm。
- [0038] 该(这些)抗氧化剂可以按介于约0.001mg与约10mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约5mg之间的一种量,或按介于约0.01与约1mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约0.5mg之间的一种量存在于该固体介质上。在一个实施例中,该(这些)抗氧化剂是以一种约0.1mg的量存在。
- [0039] 该(这些)螯合剂可以按介于约0.001mg与约10mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约5mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约1mg之间的一种量,或按介于约0.05mg与约0.5mg之间的一种量存在于该固体介质上。在一个实施例中,该(这些)螯合剂是以一种约0.25mg的量存在。在另一个实施例中,该(这些)螯合剂是以一种约0.5mg的量存在。
- [0040] 在该第一方面的一个实施例中,本发明提供了一种用于使脂肪酸稳定的方法,该方法包括将这些脂肪酸,或包含这些脂肪酸的一份样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含装载硅胶的纸、EDTA和/或抗坏血酸及BHT。
- [0041] 在该第一方面的另一个实施例中,本发明提供了一种用于使脂肪酸稳定的方法,该方法包括将这些脂肪酸,或包含这些脂肪酸的一份样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种玻璃微纤维过滤器、EDTA和/或抗坏血酸及BHT。
- [0042] 在一个第三方面,本发明提供了一种固体介质,所述介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于约2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。
- [0043] 该固体介质可以用于使脂肪酸稳定和/或用于测定一份样品的脂肪酸组成。
- [0044] 这些脂肪酸可以是,或可以包含不饱和脂肪酸。
- [0045] 这些脂肪酸可以是,或可以包含LCPUFA。
- [0046] 这些脂肪酸可以是 $\omega$ -3脂肪酸,例如EPA、DHA等。
- [0047] 该固体基质可以包含低于约1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,或低于约0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。
- [0048] 这些污染物可以是饱和脂肪酸。
- [0049] 该固体基质可以是纸、一种基于纸的基质或一种基于玻璃的基质。
- [0050] 该基于纸的基质可以是装载硅胶的纸。
- [0051] 该基于玻璃的基质可以是一种玻璃微纤维过滤器。
- [0052] 该至少一种螯合剂可以是EDTA、抗坏血酸或其盐、或柠檬酸或其盐。
- [0053] 该至少一种抗氧化剂可以是丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚或叔丁基氢醌。
- [0054] 以上所述的螯合剂与抗氧化剂的任何组合都涵盖在内。
- [0055] 在一个实施例中,该螯合剂是抗坏血酸和/或EDTA并且该抗氧化剂为BHT。
- [0056] 该固体介质可以是一个条带的形式。
- [0057] 该条带具有的尺寸可以是约1cm×3cm。
- [0058] 该(这些)抗氧化剂可以按介于约0.001mg与约10mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约5mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约1mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约0.5mg之间的一种量存在于该固体介质上。在一个实施例中,该(这些)抗氧化剂是以一种约0.1mg的量存在。

[0059] 该(这些)螯合剂可以按介于约0.001mg与约10mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约5mg之间的一种量,或按介于约0.01mg与约1mg之间的一种量,或按介于约0.05mg与约0.5mg之间的一种量存在于该固体介质上。在一个实施例中,该(这些)螯合剂是以一种约0.25mg的量存在。

[0060] 在该第三方面的一个实施例中,本发明提供了一种固体介质,所述介质包含装载硅胶的纸、EDTA和/或抗坏血酸,及BHT。

[0061] 在该第三方面的另一个实施例中,本发明提供了一种固体介质,所述介质包含一种玻璃微纤维过滤器、EDTA和/或抗坏血酸,及BHT。

[0062] 在一个第四方面,本发明提供了一种用于制备固体介质的方法,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,所述方法包括了提供包含一种固体基质的一种固体介质并且将该至少一种螯合剂和该至少一种抗氧化剂施加到该固体介质,其中该固体基质包含低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

[0063] 该固体基质、螯合剂及抗氧化剂可以如以上方面中所定义。

[0064] 该固体基质可以包含低于约 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,或低于约 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

[0065] 该至少一种抗氧化剂和该至少一种螯合剂可以按一种单一溶液,或一种溶液包含该至少一种抗氧化剂并且一种溶液包含该至少一种螯合剂的多种分开的溶液的形式施加到该固体介质。

[0066] 该(这些)溶液可以包含醇和水,例如乙醇和水。

[0067] 该溶液中该至少一种抗氧化剂的浓度可以介于约0.1mg/mL与约10mg/mL之间,或介于约0.5mg/mL与约5mg/mL之间。

[0068] 该溶液中该至少一种螯合剂的浓度可以介于约1mg/mL与约10mg/mL之间,或介于约0.5mg/mL与约5mg/mL之间。

[0069] 该固体介质可以是一个条带的形式。

[0070] 施加到该条带的溶液的量可以介于约1与500 $\mu\text{L}$ 之间,或介于约1与100 $\mu\text{L}$ 之间。

[0071] 该条带具有的尺寸可以是约 $1\text{cm}\times 3\text{cm}$ 。

[0072] 这些污染物可以是饱和脂肪酸。

[0073] 在一个第五方面,本发明提供了一种试剂盒,包括该第三方面的固体介质。

[0074] 该试剂盒可以用于使脂肪酸稳定和/或用于测定一份样品的脂肪酸组成。

[0075] 该试剂盒可以另外包括一个尖锐物体,用于从一位受试者获得一份包含脂肪酸的样品,例如一种体液,如血液。

[0076] 附图简要说明

[0077] 现将仅借助于举例并且参照附图来描述本发明的优选实施例,其中:

[0078] 图1示出了4周储存之后保留在被收集于两种类型纸上的血斑中的LCPUFA水平,这些纸用不同的单一抗氧化剂或铁螯合剂进行预处理。

[0079] 图2示出了在2个月储存期间在弗鲁卡测试用试剂盒上的血斑中脂肪酸组成的变化。

[0080] 图3示出了在2个月储存期间在沃特曼(Whatman)装载硅胶的纸上的血斑中脂肪酸组成的变化。

[0081] 图4示出了毛细管的干燥血斑(DBS)与全血提取的总脂质之间EPA+DHA含量的相关

性。DBS (x轴) 中与全血提取的总脂质 (y轴) 中EPA+DHA含量的比较, 全血 (EPA+DHA) (%) = DBS (EPA+DHA) (%)  $\times 1.068 - 0.139$  ( $r=0.9971, P<0.0001$ )。

[0082] 图5示出了毛细管的干燥血斑与血浆总脂质之间EPA+DHA含量的相关性。DBS (x轴) 中与血浆总脂质 (y轴) 中EPA+DHA含量的比较, 血浆总脂质 (EPA+DHA) (%) = DBS (EPA+DHA) (%)  $\times 1.108 - 1.554$  ( $r=0.9869, P<0.0001$ )。

[0083] 图6示出了毛细管的干燥血斑与血浆磷脂之间EPA+DHA含量的相关性。DBS (x轴) 中与血浆磷脂 (y轴) 中EPA+DHA含量的比较, 血浆磷脂 (EPA+DHA) (%) = DBS (EPA+DHA) (%)  $\times 1.186 + 0.685$  ( $r=0.9814, P<0.0001$ )。

[0084] 图7示出了毛细管的干燥血斑与 $\omega$ -3指数 (RBC EPA+DHA) 之间EPA+DHA水平的相关性。DBS中的EPA+DHA含量 (x轴) 与 $\omega$ -3指数 (y轴) 的比较,  $\omega$ -3指数 (%) = 毛细管DBS (EPA+DHA) (%)  $\times 1.345 + 1.32$  ( $r=0.9492, P<0.0001$ )。

[0085] 图8示出了在室温下经历4周储存的新鲜制备和预先制备的纸上血斑的脂肪酸组成。值表示平均值 $\pm$ SD ( $n=3$ ), 彼此无显著差异,  $p<0.01$ 。“原始”意思指由50 $\mu$ l新鲜血液直接转甲基化而获得的脂肪酸组成。

[0086] 定义

[0087] 以下为可以帮助理解本发明的说明的一些定义。这些打算作为通用定义并且决不当将本发明的范围仅仅局限于那些术语, 而是为了更好地了解以下说明而提出。

[0088] 在本说明书通篇, 除非上下文另外需要, 否则词语“包含 (comprise)”, 或变化形式, 如“包含了 (comprises)”或“包含着 (comprising)”, 应理解为暗示包括所陈述的步骤或要素或整数, 或者步骤或要素或整数的群组在内, 而不排除任何其他步骤或要素或整数, 或者要素或整数的群组。因此, 在本说明书的上下文中, 术语“包含了”意思指“主要但未必仅包括”。

[0089] 在本说明书的上下文中, 术语“约”应理解为是指本领域普通技术人员在达到相同功能或结果的情况下认为等效于所陈述的值的数字范围。

[0090] 在本说明书的上下文中, 术语“一个 (种) (a/an)”是指一个 (种) 或一个 (种) 以上 (即, 至少一个 (种)) 的该冠词的语法宾语。举例来说, “一个要素”意思指一个要素或一个以上要素。

[0091] 在本说明书的上下文中, 术语“体液”应理解为包括了起源于人类或动物身体内的任何液体, 包括了所分泌或排泄的流体。体液的非限制性实例包括: 血液、精液、血浆、浆液 (包括血清)、唾液、汗液、尿液、乳汁、胆汁及腹膜液。

[0092] 在本说明书的上下文中, 术语“螯合剂”应理解为包括了能够络合多价离子, 包括第II族和第III族多价金属离子及过渡金属离子的任何化合物。

[0093] 在本说明书的上下文中, 术语“吸着”和“吸着的”应理解为意思指, 相关实体被吸收或吸附或以其他方式合并到固体基质之中或之上。

[0094] 在本说明书的上下文中, 术语“生物样品”应理解为意思指从活生物体, 例如植物、动物 (包括人类)、真菌、细菌、藻类等获得的一种样品。

[0095] 在本说明书的上下文中, 术语“基于纸的基质”应理解为意思指包含、包括或含有纸的一种基质。该基于纸的基质可以包含至少5% (w/w)、至少10% (w/w)、至少20% (w/w)、至少30% (w/w)、至少40% (w/w)、至少50% (w/w)、至少60% (w/w)、至少70% (w/w)、至少

80% (w/w), 或至少90% (w/w), 或至少95% (w/w), 或至少99% (w/w) 的纸。

[0096] 在本说明书的上下文中, 术语“基于玻璃的基质”应理解为意思指包含、包括或含有玻璃的一种基质。该基于玻璃的基质可以包含至少5% (w/w)、至少10% (w/w)、至少20% (w/w)、至少30% (w/w)、至少40% (w/w)、至少50% (w/w)、至少60% (w/w)、至少70% (w/w)、至少80% (w/w), 或至少90% (w/w), 或至少95% (w/w), 或至少99% (w/w) 的玻璃。

[0097] 在本说明书的上下文中, 术语“基于纤维素的基质”应理解为意思指包含、包括或含有纤维素的一种基质。该基于纤维素的基质可以包含至少5% (w/w)、至少10% (w/w)、至少20% (w/w)、至少30% (w/w)、至少40% (w/w)、至少50% (w/w)、至少60% (w/w)、至少70% (w/w)、至少80% (w/w), 或至少90% (w/w), 或至少95% (w/w), 或至少99% (w/w) 的纤维素。

[0098] 发明详细说明

[0099] 本发明大致地涉及一种用于使样品中存在的脂肪酸稳定的方法, 及用于使脂肪酸稳定并且用于测定样品的脂肪酸组成的一种固体介质。本发明还涉及一种用于对包含脂肪酸的样品的脂肪酸组成进行测定的方法。本发明另外扩展到一种用于制备固体介质的方法, 该固体介质用于使脂肪酸稳定并且用于测定样品的脂肪酸组成。

[0100] 本发明第一方面的方法提供了一种简单、安全、便利并且可靠的用于使样品中存在的脂肪酸稳定的手段。本发明人已经发现, 利用该方法, 可以使血液、乳汁及血浆中存在的脂肪酸在室温下稳定长达9周, 而具有极少的降解。

[0101] 该固体介质包括一种固体基质, 至少一种螯合剂和至少一种抗氧化剂被吸着到该固体基质上。适用于本发明中的固体基质包括了能够吸着该至少一种螯合剂、该至少一种抗氧化剂及该流体的任何材料。这些基质的实例包括但不限于, 纸、基于玻璃的基质、基于纸的基质、基于纤维素的基质、亲水性聚合物、聚四氟乙烯、玻璃纤维及多孔陶瓷。在一个实施例中, 该固体基质是一种基于纸的基质, 例如装载硅胶的纸, 它包括了涂有硅胶的纸和浸透硅胶的纸。适合的装载硅胶的纸包括从沃特曼公司 (Whatman, Inc.) 以编号3668-915可购得的那些。这些纸包含纤维素和大孔二氧化硅, 并且具有约0.27mm的厚度和每30分钟约100mm的流速(水)。纸和基于纸的基质的其他非限制性实例包括滤纸和层析纸。

[0102] 在一个替代性实施例中, 该固体基质是一种基于玻璃的基质(如玻璃棉)或一种玻璃微纤维过滤器, 并且确切地说, 玻璃微纤维过滤器包含或其组成为硼硅酸盐玻璃。适合的玻璃微纤维过滤器包括从沃特曼公司以编号A1820-047、B1821-047、C1822-047及D1823-047可购得的那些。

[0103] 本发明人已经意外地发现, 基于纸的固体基质中存在的污染物可能干扰对应类别的脂肪酸的量占总脂质的比例的准确测定, 特别是当施加到该固体基质的流体的体积较小(即, 低于约20 $\mu$ L)时。在这一情形中, 术语“一种污染物”或“多种污染物”可以理解为意思指这样一种化合物或多种化合物, 如与在施加到固体基质之前一类脂肪酸占样品中总脂质的比例的比例计算值相比较, 在该固体基质中其存在将使一类脂肪酸占施加到该基质的样品中总脂质的比例的比例计算值增加或减小。这些污染物包括例如, 饱和脂肪酸(如16:0和18:0)、饱和脂肪酸酯、树脂酸(如松香酸、异海松酸、右旋海松酸及左旋海松酸)及树脂酸酯, 它们在生产期间被用于纸中。尽管在计算脂肪酸比例时, 有可能使用一种空白固体基质作为对照物来针对污染物进行校正, 但这使得该方法增加了一个另外的步骤并且因此降低了效率。本发明人已经发现, 通过确保该固体基质中的污染物低于约2 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, 可以使对应类

别的脂肪酸的量占流体中总脂质的比例的准确测定得到优化。因此,在第一、第二、第三及第四方面的实施例中,该固体基质包含的污染物量低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.35\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于或等于约 $0.15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于或等于约 $0.12\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。作为替代方案,该固体基质可以包含介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间的量,或介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间的量,或介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间的量,或介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间的量,或介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间的量的污染物。在该第一、第二、第三或第四方面的替代性实施例中,在施加这些脂肪酸,或包含这些脂肪酸的样品之前,该固体基质包含饱和脂肪酸和/或树脂酸,其量低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于约 $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于或等于约 $0.15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或低于或等于约 $0.12\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,或在施加这些脂肪酸,或包含这些脂肪酸的样品之前,该固体基质包含饱和脂肪酸和/或树脂酸,其量介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间,或其量介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间,或其量介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间,或其量介于约 $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与约 $0.15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间。

[0104] 如在此的实例中所描述,通过控制该固体基质中存在的污染物的量并且通过使样品中存在的脂肪酸稳定,有可能在将该样品施加到该固体基质之后数周或甚至数月,以极高的准确度测定该样品的脂肪酸组成。因此,在希望准确地测定如血液等样品的脂肪酸含量时,例如一位个体可以简单地刺破其手指,将一滴血放到该固体介质上,使其干燥,并且然后将其邮递到中心实验室进行分析。就在该固体介质上延长的脂肪酸稳定性来说,该固体介质无需冷藏,也不必快递该样品。还避免了对于静脉穿刺的需求,因为它需要使用一种空白的收集纸,或一些其他手段作为对照物以针对该固体介质中的污染物进行校正。因此,在另一个方面,本发明涉及一种用于对包含脂肪酸的样品的脂肪酸组成进行测定的方法,该方法包括:

[0105] (a) 将该样品施加到一种固体介质上,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,其中该固体基质包含低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物,这样使得该样品被吸着到该固体基质上;

[0106] (b) 测定被吸着到该固体基质上的该样品的脂肪酸组成。

[0107] 步骤(b)可以通过本领域普通技术人员众所周知的方法,例如通过使干燥的吸着样品中的脂肪酸衍生化并且利用气相层析法(GC)分析所得衍生化的化合物来进行。在一个实施例中,该干燥的吸着样品中的脂肪酸通过直接转甲基化,例如通过在 $70^\circ\text{C}$ 下于 $1\%\text{H}_2\text{SO}_4$ 的甲醇溶液中加热3小时而转化成脂肪酸甲酯。然后,将这些脂肪酸甲酯萃取到有机溶剂

(如庚烷)中并且将含有这些脂肪酸甲酯的庚烷注入气相层析仪中。这些脂肪酸甲酯的鉴别和定量可以通过使用惠普化学工作站数据系统(Hewlett-Packard Chemstation data system)将未知样品的保留时间和峰面积值与商业脂质标准品的那些相比较来实现(参见在此的实例1)。

[0108] 因此,在一个实施例中,步骤(b)包括:

[0109] (i)对被吸着到该固体基质上的该样品的至少一部分进行萃取以提供一种包含衍生化(例如酯化)脂肪酸的萃取物;

[0110] (ii)基于这些衍生化脂肪酸的量来确定该样品的脂肪酸组成。

[0111] 这些酯化的脂肪酸可以是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基酯,例如甲基酯。

[0112] 该方法可以包括对该样品中一种或多种类别的脂肪酸(优选地不饱和脂肪酸)的量占该样品中存在的总脂质的比例(例如百分比)或占该样品中存在的总脂肪酸的比例进行测定。举例来说,该方法可以包括测定以下一种或多种不饱和脂肪酸的量:18:1 n-9、18:2 n-6、20:4 n-6、20:5 n-3、22:5 n-3及22:6 n-3。步骤(b)可以在步骤(a)之后数周或数月进行。举例来说,步骤(b)可以在步骤(a)之后长达约12个月、长达约9个月、长达约8个月、长达约7个月、长达约6个月、长达约5个月、长达约4个月、长达约3个月、长达约2个月或长达约1个月进行。在一些实施例中,步骤(b)是在步骤(a)之后长达约12周、长达约11周、长达约10周、长达约9周、长达约8周、长达约7周、长达约6周、长达约5周、长达约4周、长达约3周、长达约2周或长达约1周进行。

[0113] 为了进一步使可能引起脂肪酸组成测定不准确的疏水性化合物污染的可能性减到最小,在进行步骤(b)之前,步骤(a)中获得的样品优选地被储存于一个玻璃纸袋中。优选地,该样品在环境温度下于暗处被储存于一个玻璃纸袋中。

[0114] 典型地,该样品是一种生物样品,然而,本领域普通技术人员将认识到,本发明的这些方法和介质适用于包含对降解特别敏感的脂肪酸并且特别是不饱和脂肪酸的任何样品。在一些实施例中,该生物样品是一种体液。体液的非限制性实例包括:血液、唾液、乳汁、尿液、精液、血浆、滑液及血清。在替代性实施例中,该样品可以是一种油,例如一种可食用油,如一种鱼油或一种植物油,该油包含不饱和脂肪酸,希望测定其脂肪酸组成。出于质量控制的目的和/或为了评估保存期限,可能希望测定这些油的脂肪酸组成。在另一个实施例中,该油可以是衍生自一种经过遗传工程改造的作物(如加拿大油菜)的一种油,该作物已经被开发成产生占所产生的总脂质比例的量有所增加的所选脂肪酸,例如 $\omega$ -3脂肪酸。在这一情形中,该第二方面的方法可以被用于对 $\omega$ -3脂肪酸占所产生的总脂质的比例的增加进行定量。

[0115] 施加到该固体介质的样品的量可以低于约100 $\mu$ L,或低于约90 $\mu$ L,或低于约80 $\mu$ L,或低于约70 $\mu$ L,或低于约60 $\mu$ L,或低于约50 $\mu$ L,或低于约40 $\mu$ L,或低于约30 $\mu$ L,或低于约25 $\mu$ L,或低于约20 $\mu$ L,或为约20 $\mu$ L。

[0116] 在其他实施例中,施加到该固体介质的样品的量可以介于约10 $\mu$ L与约250 $\mu$ L之间,或介于约10 $\mu$ L与约150 $\mu$ L之间,或介于约10 $\mu$ L与约100 $\mu$ L之间,或介于约10 $\mu$ L与约75 $\mu$ L之间,或介于约10 $\mu$ L与约60 $\mu$ L之间,或介于约30 $\mu$ L与约60 $\mu$ L之间,或介于约10 $\mu$ L与约20 $\mu$ L之间,或介于约10 $\mu$ L与约30 $\mu$ L之间,或为约50 $\mu$ L。

[0117] 本发明中所使用的固体基质包含吸着于其的至少一种螯合剂。螯合剂是本领域普

通技术人员众所周知的。适用于本发明中的螯合剂包括但不限于：EDTA、乙二醇-0,0'-双(2-氨基乙基)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、三乙醇胺、水杨酸、二亚乙基三胺五乙酸、二亚乙基三胺-N,N,N',N',N''-五乙酸、N,N-双(2-(双-(羧甲基)氨基)乙基)-甘氨酸、二亚乙基三胺五乙酸、[[ (羧甲基) 亚氨基] 双(亚乙基次氨基)]-四乙酸、N,N-双(羧甲基)甘氨酸、次氨基三乙酸、Trilone A、 $\alpha,\alpha',\alpha''$ -三甲基胺三甲酸、三(羧甲基)胺、氨基三乙酸、Hampshire NTA酸、次氨基-2,2',2''-三乙酸、Titriplex I、次氨基三乙酸及去铁胺。

[0118] 本发明中所使用的固体基质另外包含吸着于其的至少一种抗氧化剂。适用于本发明中的抗氧化剂包括但不限于：白藜芦醇、叔丁基氢醌、BHT、BHA、柠檬酸、柠檬酸盐、抗坏血酸、抗坏血酸盐、类黄酮(如黄芩素)及抗氧化植物提取物。

[0119] 该(这些)抗氧化剂可以按介于约0.001mg与约10mg之间的量,或按介于约0.01mg与约1mg之间的量,或按介于约0.01mg与约0.5mg之间的量存在于该固体介质上。在一个实施例中,该(这些)抗氧化剂是以约0.1mg的量存在。

[0120] 该(这些)螯合剂可以按介于约0.001mg与约10mg之间的量,或按介于约0.01mg与约1mg之间的量,或按介于约0.05mg与约0.5mg之间的量存在于该固体介质上。在一个实施例中,该(这些)螯合剂是以约0.25mg的量存在。在另一个实施例中,该(这些)螯合剂是以约0.5mg的量存在。

[0121] 本发明另外涉及一种用于制备固体介质的方法,该固体介质包含一种固体基质、至少一种螯合剂及至少一种抗氧化剂,所述方法包括了提供包含一种固体基质的一种固体介质并且将该至少一种螯合剂和该至少一种抗氧化剂施加到该固体介质,其中该固体基质包含低于约 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的污染物。

[0122] 该固体基质、螯合剂及抗氧化剂可以如在此所定义。该至少一种抗氧化剂和该至少一种螯合剂可以按一种单一溶液,或一种溶液包含该至少一种抗氧化剂并且一种溶液包含该至少一种螯合剂的多种分开的溶液的形式施加到该固体介质上。作为替代方案,在该至少一种抗氧化剂和/或该至少一种螯合剂为液体的情况下,各自可以呈纯净形式施加到该固体介质上。

[0123] 该(这些)溶液可以包含一种有机溶剂和水,例如一种醇(如甲醇或乙醇)和水。

[0124] 该溶液中该至少一种抗氧化剂的浓度可以介于约0.1mg/mL与约10mg/mL之间,或介于约0.5mg/mL与约5mg/mL之间。该溶液中该至少一种螯合剂的浓度可以介于约1mg/mL与约10mg/mL之间,或介于约0.5mg/mL与约5mg/mL之间。施加到该条带的溶液的量可以介于约1与500 $\mu\text{L}$ 之间,或介于约1与100 $\mu\text{L}$ 之间,或为约50 $\mu\text{L}$ 。典型地,该溶液是逐滴施加的。

[0125] 该固体介质可以呈任何形状(例如圆形、矩形、正方形等),但典型地呈一个条带的形式。该条带具有的尺寸可以介于约 $1\text{cm}\times 1\text{cm}$ 与约 $1\text{cm}\times 3\text{cm}$ 之间,然而,也涵盖替代性大小的条带。典型地,该固体介质较薄(即,介于1到2mm之间),从而有助于以标准信封便宜并且容易地邮递到中心实验室。

[0126] 本发明另外涉及一种试剂盒,包括该第三方面的固体介质。该试剂盒可以另外包括一个尖锐物体(例如一个钉、针等),用于从一位受试者获得一份包含脂肪酸的样品,例如一种体液。在一个实施例中,该体液为血液。优选地,对该尖锐物体预先灭菌以使得在其使用之后该受试者发生感染的风险减到最小。该试剂盒可以另外包括使用说明书。

[0127] 实例

[0128] 现将仅借助于说明,关于以下实例更详细地描述本发明。这些实例打算用于说明本发明并且决不应解释为限制在本说明书通篇的说明的披露内容的一般性。

[0129] 实例1-使用BHT和抗坏血酸/EDTA的组合使沃特曼硅胶层析纸上的血斑稳定

[0130] 材料和方法

[0131] 血液收集纸

[0132] 使用两种类型的纸进行血斑收集:弗鲁卡血液收集试剂盒纸(西格玛-阿尔德里奇公司,瑞士布克斯(Buchs,Switzerland))和沃特曼硅胶层析纸(46×57cm,沃特曼公司,英国白金汉郡(Buckingham,UK))。两种商业酚类抗氧化剂,丁基化羟基甲苯和叔丁基氢醌(TBHQ)是购自西格玛-阿尔德里奇公司(密苏里州圣路易斯(St Louis,MO))。铁螯合剂、L-抗坏血酸及EDTA购自化学供应公司(Chem-supply Company)(南澳大利亚吉利曼(Gillman, South Australia))。

[0133] 抗氧化剂/螯合剂(保护剂)溶液

[0134] 制备十四种保护剂配制物以使两种类型收集纸上的血斑中的脂肪酸稳定(表1)。为了测定出控制血斑中脂质氧化的最佳抗氧化剂浓度,对三种不同浓度(0.5mg/ml、2mg/ml及4mg/ml)的两类抗氧化剂(BHT和TBHQ)进行测试(表1)。使用5mg/ml水平的L-抗坏血酸和EDTA作为铁螯合剂。将一滴每种保护剂配制物(约50μl)均匀地喷到收集纸带上并且空气干燥,之后将血液收集到该纸上。

[0135] 表1.用于处理收集纸的保护剂

[0136]

配制物	抗氧化剂	铁螯合剂
1	TBHQ 0.5 mg/ml	无
2	TBHQ 2 mg/ml	无
3	TBHQ 4 mg/ml	无
4	BHT 0.5 mg/ml	无
5	BHT 2 mg/ml	无
6	BHT 4 mg/ml	无
7	无	EDTA 1 mg/ml
8	无	EDTA 5 mg/ml
9	无	EDTA 20 mg/ml
10	无	L-抗坏血酸 1 mg/ml

[0137]	11	无	L-抗坏血酸 5 mg/ml
	12	无	L-抗坏血酸 20 mg/ml
	13	BHT 2 mg/ml	L-抗坏血酸 5 mg/ml
	14		EDTA 5 mg/ml

[0138] \*浓度以每毫升70%乙醇/水溶液中的毫克数表示

[0139] 样品制备

[0140] 通过肘前静脉从有规律地消费鱼油并且血液中具有极高EPA和DHA含量的一位健康志愿者收集血液。通过在一个5ml密封小瓶(美国米尔维尔的惠顿(Wheaton, Millville, USA))中,将新鲜血液(约50 $\mu$ l)与2ml含1% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18M, AR级, BDH, 英国塞萨斯(Sussex, UK))的无水乙醇混合,并且在70 $^{\circ}$ C下加热3小时,来实现全血中脂肪酸的直接转甲基化。将所得脂肪酸甲酯(FAME)萃取到庚烷中并且注入GC中以根据先前确定的方法(1)进行分析。通过在不存在或存在保护剂配制物(表1)情况下,将一滴新鲜血液(约50 $\mu$ l)吸收到两种类型血液收集纸带(1 $\times$ 3cm)上来获得血斑,并且使所有血斑在环境温度下空气干燥6小时。一旦血斑干燥,就将其分成4组。第一组遵循与对于新鲜血液相同的程序立即进行转酯化。将从这些样品获得的结果与通过直接测量新鲜血液的脂肪酸组成所获得的那些相比较,以确定在空气干燥期间血斑样品中的LCPUFA是否存在任何氧化性损失,并且为血斑中的脂肪酸组成提供基线测量值。将其余三组中的血斑在环境温度下于暗处储存于玻璃纸袋中,并且在血液收集时间之后2周、4周或9周,对这些样品中的脂肪酸组成进行测量。所有样品都是一式三份进行处理的。

[0141] 气相层析分析

[0142] 使用装备有一个BPX70毛细管柱50m $\times$ 0.32mm、膜厚度0.25 $\mu$ m (SGC有限公司(SGC Pty Ltd.), 澳大利亚维多利亚州(Victoria, Australia)、PTV注射器及火焰离子化检测器(FID)的一个GC(惠普6890;美国加利福尼亚州帕罗奥图(Palo Alto, CA, USA))对FAME进行分离并定量。该注射器温度设定在250 $^{\circ}$ C并且FID温度设定在300 $^{\circ}$ C,使用一种程序化升温方法(140 $^{\circ}$ C-240 $^{\circ}$ C)。利用氦气作为载气,在该柱中的流速为每秒35cm并且入口分流比设定为20:1。通过使用惠普化学工作站数据系统,将未知样品的保留时间和峰面积值与商用脂质标准品(鲁查克制备公司(Nu-Chek Prep Inc.), 美国明尼苏达州伊利森(Elysian, MN, USA))的那些相比较来实现FAME的鉴别和定量。

[0143] 统计学分析

[0144] 所有统计学分析都是使用PASW Statistic 18进行的。值以平均值 $\pm$ 标准差(SD)表示。使用单因素方差分析来测定空气干燥之后总血液脂质中脂肪酸百分比之间的显著差异。通过使用双因素方差分析来测试纸类型和保护剂配制物对相同血液样品内脂肪酸百分比随时间的变化的影响。在以该方差分析测定纸类型与保护剂配制物之间的显著相互作用,针对不同纸类型以单因素方差分析和杜凯氏事后测试(Tukey's post-hoc test)单独地测定脂肪酸随时间的变化时,  $p < 0.05$  被公认为是统计学上显著的。

[0145] 结果

[0146] 纸和抗氧化剂浓度的影响

[0147] 当与收集于抗氧化剂预处理过的纸上的那些血斑相比较时,在不存在抗氧化剂和铁螯合剂的情况下,收集于弗鲁卡或硅胶纸上的血斑展现出在4周储存期内所测量的LCPUFA含量的显著下降(图1)。在环境温度下储存4周之后,收集于BHT预处理过的纸上的血斑保留了比收集于用全部三种浓度的其他抗氧化剂或铁螯合剂预处理的纸上的那些更高的LCPUFA百分含量(图1)。由BHT提供的最佳保护作用看来是在2mg/ml浓度下实现。值得注意的是,血斑中的LCPUFA看来在涂布硅胶的纸上比在弗鲁卡纸上更稳定。

[0148] 铁螯合剂的影响

[0149] 相对于在酸化甲醇中直接转酯化的相等量的血液,将血液滴于两种类型纸上并且使该斑点干燥6小时引起了LCPUFA的损失(表2和3)。直接转酯化已经被证实为测定血液脂质的脂肪酸组成的一种可靠方法。对于收集在仅用BHT处理的纸上的血斑样品,也检测到总血液脂质中二十碳五烯酸(EPA, 20:5n-3)和二十二碳六烯酸(DHA, 22:6n-3)百分含量的显著下降。然而,在吸收于用BHT与任一铁螯合剂(L-抗坏血酸或EDTA)的混合物预处理过的任一收集纸上的血斑中所测量的脂肪酸组成与从新鲜血液所获得的结果无显著不同(参见表2和表3)。此外,不管所用保护剂配制物如何,与收集于弗鲁卡血液收集试剂盒纸上的血斑相比较,收集于沃特曼硅胶纸上的血斑始终展现更类似于新鲜血液中的脂肪酸组成。

[0150] 表2.在空气干燥6小时之后测定的在弗鲁卡测试用试剂盒纸上血斑的脂肪酸组成(%)与新鲜血液直接转甲基化的结果的比较

[0151]

脂肪 酸%	新鲜血液	在弗鲁卡血液收集试剂盒上的血斑			
		无	BHT 2 mg/ml	BHT 2 mg/ml + L-抗坏血酸 5 mg/ml	BHT 2 mg/ml + EDTA 5 mg/ml
16:0	24.24 ± 0.2 <sup>a</sup>	27.22 ± 0.16 <sup>d</sup>	25.93 ± 0.2 <sup>c</sup>	25.02 ± 0.12 <sup>b</sup>	25.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
18:0	13.83 ± 0.12 <sup>a</sup>	15.34 ± 0.12 <sup>d</sup>	14.83 ± 0.1 <sup>c</sup>	14.23 ± 0.06 <sup>b</sup>	14.22 ± 0.07 <sup>b</sup>
18:1 n-9	18.84 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.25 ± 0.15 <sup>b</sup>	18.54 ± 0.23 <sup>ab</sup>	18.71 ± 0.3 <sup>ab</sup>	18.72 ± 0.16 <sup>ab</sup>
18:2 n-6	19.53 ± 0.13 <sup>a</sup>	18.36 ± 0.18 <sup>b</sup>	18.93 ± 0.32 <sup>ab</sup>	19.25 ± 0.16 <sup>a</sup>	19.21 ± 0.26 <sup>a</sup>
20:4 n-6	7.52 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.82 ± 0.12 <sup>c</sup>	7.18 ± 0.06 <sup>bc</sup>	7.27 ± 0.15 <sup>ab</sup>	7.24 ± 0.05 <sup>ab</sup>
20:5 n-3	6.02 ± 0.08 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.13 <sup>c</sup>	5.72 ± 0.11 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.1 <sup>ab</sup>	5.85 ± 0.08 <sup>ab</sup>
22:5 n-3	3.43 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.08 <sup>b</sup>	3.03 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.31 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.32 ± 0.11 <sup>a</sup>
22:6 n-3	6.58 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.15 <sup>c</sup>	6.01 ± 0.05 <sup>b</sup>	6.38 ± 0.04 <sup>ab</sup>	6.34 ± 0.06 <sup>ab</sup>

[0152] \*值表示平均值±SD(n=3),不同上标指示各组间的显著差异,p<0.01

[0153] 表3.在空气干燥6小时之后测定的在沃特曼硅胶纸上血斑的脂肪酸组成(%)与新

鲜血液直接转甲基化的结果的比较

[0154]

脂肪酸%	新鲜血液	在沃特曼硅胶纸上的血斑			
		无	BHT 2 mg/ml	BHT 2 mg/ml + L-抗坏血酸 5 mg/ml	BHT 2 mg/ml + EDTA 5 mg/ml
16:0	$24.24 \pm 0.2^a$	$25.92 \pm 0.15^c$	$25.22 \pm 0.12^b$	$24.42 \pm 0.12^a$	$24.30 \pm 0.16^a$
18:0	$13.83 \pm 0.12^a$	$14.98 \pm 0.2^b$	$14.64 \pm 0.17^b$	$13.91 \pm 0.13^a$	$13.92 \pm 0.15^a$
18:1 n-9	$18.84 \pm 0.2^a$	$18.61 \pm 0.14^a$	$18.62 \pm 0.08^a$	$18.82 \pm 0.15^a$	$18.91 \pm 0.08^a$

[0155]

18:2 n-6	$19.53 \pm 0.13^b$	$18.71 \pm 0.2^b$	$19.34 \pm 0.13^a$	$19.44 \pm 0.15^a$	$19.62 \pm 0.2^b$
20:4 n-6	$7.52 \pm 0.1^b$	$7.13 \pm 0.15^b$	$7.29 \pm 0.11^{ab}$	$7.46 \pm 0.03^{ab}$	$7.54 \pm 0.1^a$
20:5 n-3	$6.02 \pm 0.08^a$	$5.64 \pm 0.06^c$	$5.80 \pm 0.1^{bc}$	$5.98 \pm 0.07^{ab}$	$5.93 \pm 0.08^{ab}$
22:5 n-3	$3.43 \pm 0.05^a$	$3.11 \pm 0.1^b$	$3.26 \pm 0.08^{ab}$	$3.42 \pm 0.05^a$	$3.34 \pm 0.08^{ab}$
22:6 n-3	$6.58 \pm 0.12^a$	$5.86 \pm 0.1^b$	$6.14 \pm 0.1^b$	$6.52 \pm 0.17^a$	$6.5 \pm 0.15^a$

[0156] \*值表示平均值 $\pm$ SD (n=3), 不同上标指示各组间的显著差异,  $p < 0.01$  长期储存对血斑脂肪酸组成的影响

[0157] 收集于弗鲁卡测试用试剂盒纸上并且经9周时间储存的血斑显示出与在空气干燥6小时之后立即测量的那些血斑显著不同的脂肪酸组成(图2,  $p < 0.01$ )。不管所用保护剂配制物如何, 在收集于弗鲁卡测试用试剂盒上的血斑中所测量的 $\omega$ -6脂肪酸(亚麻酸, LA, 18:2n-6; 花生四烯酸, AA, 20:4n-6)及 $\omega$ -3 EPA和DHA的水平显著低于在储存之后早到2周于基线处测量的值并且水平在9周的储存期内持续下降。相反地, 在这些血斑中测量的总饱和和脂肪酸的百分比在该储存期内稳定地上升(图2)。

[0158] 当在无任何保护剂情况下将血斑收集于沃特曼硅胶纸上时, 在储存2周之后血斑总脂质中EPA和DHA的百分比显著下降(图3,  $p < 0.01$ ), 不过这些损失低于经历相同时期在弗鲁卡纸上所观察到的损失。通过用BHT处理这些沃特曼硅胶纸, 在储存之后直到4周时, 仍未见到EPA和DHA水平的显著降低。在向该沃特曼硅胶纸添加了BHT和任一种铁螯合剂(L-抗坏血酸或EDTA)之后, 血斑样品中所有LCPUFA的百分比都与基线值无显著不同, 即使是在室

温下储存9周之后(图3)。

#### [0159] 讨论

[0160] 如果打算普遍地采用血斑技术来评价个体的LCPUFA状况,那么研究人员需要保证该方法随时间推移是准确并且稳定的。已知将血液滴在滤纸上将自然地使血液中的LCPUFA暴露于空气,故研究人员已经关注以这一方式收集的血斑样品中LCPUFA的稳定性(2)。在商业上,向消费者宣传血斑技术,邀请其将样品放在所制备的纸上邮递以获得其 $\omega$ -3指数(EPA+DHA)的评估。这样一种测试假定,血液中的脂肪酸,最值得注意的是EPA和DHA,从滴加时起直到由远处的实验室对样品进行分析为止是稳定的。很明显,如果使用弗鲁卡测试用试剂盒,那么将发生这些 $\omega$ -3脂肪酸的时间相关性氧化,不管该纸上是否涂有BHT。据报导,即使是用BHT处理收集纸,在环境温度下储存1个月之后,这些样品中的n-3 LCPUFA含量仅保留约60%(2)。

[0161] 血斑中脂肪酸组成的最强稳定性是通过将抗氧化剂BHT与一种铁螯合剂(L-抗坏血酸或EDAT)和作为收集纸的硅胶纸组合来实现,因为这允许在环境温度下储存甚至2个月之后仍维持血斑中的初始EPA和DHA水平。

[0162] 总之,这一研究的结果指示,当在环境温度下储存时,由BHT、螯合剂及硅胶纸的组合构成的保护系统可以防止血斑中的LCPUFA的显著氧化损失,持续至少2个月。这一方法有可能允许在长期储存之后准确评价毛细血管血样品中的脂肪酸状况,并且因此能够进行储存了不同时间段的样品之间的比较。

#### [0163] 实例2-使用BHT和EDTA的组合使沃特曼硅胶层析纸上的血浆斑稳定

[0164] 从每天有规律地消费一颗鱼油胶囊的受试者收集血液。在4℃下,将该血液样品以3000rpm离心10分钟以分离血浆和红细胞。使一滴血浆(约50 $\mu$ l)直接地转酯化并且通过GC分析所得FAME以提供血浆总脂质中脂肪酸组成的基线值。将其余血浆分成两份,第一份在-20℃下储存并且通过在1、2及4周时直接转酯化来测试脂肪酸组成。将第二份滴到浸透2mg/ml BHT和5 mg/ml EDTA的沃特曼硅胶层析纸(46×57 cm,沃特曼公司,英国白金汉郡)上(每张纸约50 $\mu$ l),并在空气中干燥5-6小时。然后,将血浆斑在室温(19℃-23℃)下于暗处储存于玻璃纸袋中,并且在血液收集时间之后1、2及4周测量这些样品中的脂肪酸组成。所有样品都是一式三份进行处理的。结果显示于表4中。

[0165] 表4. 经4周储存的血浆(在-20℃下储存)和血浆斑(在室温下储存)的脂肪酸组成

[0166]

脂肪酸	血浆	血浆			血浆斑		
	T <sub>0</sub> (0 小时)	1 周	2 周	4 周	1 周	2 周	4 周
16:0	*20.48 ± 0.41	20.90 ± 0.23	20.84 ± 0.31	20.84 ± 0.25	21.35 ± 0.36	21.24 ± 0.44	21.41 ± 0.3

[0167]

<b>18:0</b>	5.79 ± 0.21	5.73 ± 0.07	5.66 ± 0.12	5.67 ± 0.15	5.89 ± 0.19	5.94 ± 0.11	6.04 ± 0.26
<b>18:1 n-9</b>	27.70 ± 0.52	27.60 ± 0.4	27.91 ± 0.31	28.02 ± 0.26	27.61 ± 0.23	27.85 ± 0.35	27.94 ± 0.28
<b>18:2 n-6</b>	32.44 ± 0.26	32.64 ± 0.18	32.47 ± 0.44	32.49 ± 0.26	32.17 ± 0.24	32.16 ± 0.25	31.83 ± 0.41
<b>18:3 n-3</b>	0.60 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.56 ± 0.06
<b>20:4 n-6</b>	6.87 ± 0.13	6.87 ± 0.08	6.78 ± 0.09	6.86 ± 0.06	6.71 ± 0.22	6.72 ± 0.19	6.64 ± 0.16
<b>20:5 n-3 (EPA)</b>	1.52 ± 0.06	1.53 ± 0.04	1.50 ± 0.06	1.51 ± 0.04	1.46 ± 0.02	1.46 ± 0.05	1.44 ± 0.04
<b>22:5 n-3</b>	0.77 ± 0.03	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.86 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.72 ± 0.04	0.77 ± 0.04
<b>22:6 n-3 (DHA)</b>	3.02 ± 0.12	3.04 ± 0.08	2.96 ± 0.09	3.05 ± 0.06	2.98 ± 0.11	2.96 ± 0.06	2.88 ± 0.08

[0168] \*数据为每组n=3的平均值±SD。各组间无统计学上显著的差异。p<0.01

[0169] 实例3-使用BHT和EDTA的组合使沃特曼硅胶层析纸上的乳汁斑稳定

[0170] 从已经分泌乳汁5个月并且未获取鱼油补充的受试者获得乳汁。使一滴乳汁(约50 μl)直接地转酯化并且通过GC分析所得FAME以提供乳汁总脂质中脂肪酸组成的基线值。将其余乳汁滴到浸透2mg/ml BHT和5mg/ml EDTA的沃特曼硅胶层析纸(46×57cm,沃特曼公司,英国白金汉郡)上(每张纸约50μl),并在空气中干燥5-6小时。一旦乳汁斑干燥,就将其分成4组。第一组遵循与关于新鲜乳汁相同的转酯化程序立即进行转酯化。将从这些样品获得的结果与通过直接测量新鲜乳汁的脂肪酸组成所获得的那些相比较,以确定在空气干燥期间乳汁斑样品中的LCPUFA是否存在任何氧化性损失,并且为乳汁斑中的脂肪酸组成提供基线测量值。然后,将其余三组乳汁斑在室温(19°C-23°C)下于暗处储存于玻璃纸袋中,并且在乳汁收集时间之后1、2及4周测量这些样品中的脂肪酸组成。所有样品都是一式三份进行处理的。结果显示于表5中。

[0171] 表5.在室温(19°C-23°C)下经4周储存的乳汁斑的脂肪酸组成

[0172]

脂肪酸	乳汁	乳汁斑			
	$t_0$ (0 小时)	5 小时	1 周	2 周	4 周
16:0	*30.21 ± 0.18	30.22 ± 0.22	30.24 ± 0.21	30.28 ± 0.12	30.26 ± 0.13
18:0	8.14 ± 0.06	8.16 ± 0.07	8.05 ± 0.06	8.20 ± 0.06	8.14 ± 0.05
18:1n-9	43.09 ± 0.26	43.34 ± 0.22	43.31 ± 0.14	43.41 ± 0.17	43.37 ± 0.13
18:2n-6	15.06 ± 0.09	14.87 ± 0.06	14.94 ± 0.08	14.74 ± 0.10	14.84 ± 0.07
18:3n-3	2.10 ± 0.05	2.06 ± 0.02	2.11 ± 0.03	2.03 ± 0.04	2.06 ± 0.01
20:3n-9	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.00
20:4n-6	0.56 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.54 ± 0.01
20:5n-3 (EPA)	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01
22:5n-3	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01
22:5n-3 (DHA)	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01

[0173] \*数据为每组n=3的平均值±SD。各组间无统计学上显著的差异,  $p < 0.01$

[0174] 实例4-来自纸和其他来源的污染物

[0175] 材料和方法

[0176] 血斑收集纸

[0177] 使用了五种类型的纸作为血斑收集纸, 它们是两种商业上开发的血斑收集纸: 弗鲁卡血液收集试剂盒(西格玛-阿尔德里奇公司, 瑞士布克斯) 和沃特曼903试样收集卡(沃特曼公司, 英国白金汉郡); 及三种层析纸: 沃特曼3MM层析纸(46×57cm, 沃特曼公司, 英国白金汉郡)、沃特曼硅胶层析纸(46×57cm, 沃特曼公司, 英国白金汉郡) 及沃特曼玻璃微纤维过滤器(GF/B 47mm, 沃特曼公司, 英国白金汉郡)。

[0178] 样品制备

[0179] 通过肘前静脉从一位30岁的健康志愿者收集约5ml血液并且在收集之后立即进行处理。在一个5ml密封小瓶(美国米尔维尔的惠顿)中, 将新鲜的全血(50 $\mu$ l)与2ml含1% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18M, AR级, BDH, 英国塞萨斯) 的无水乙醇混合, 并且通过在70℃下加热3小时来直接转甲基化。将所得脂肪酸甲酯(FAME)萃取到庚烷中并且注入GC中以根据先前确定的方法(1)进行分析。在血液收集时, 将两份另外的血液样品等分试样(对应地为25 $\mu$ l和50 $\mu$ l)放到纸带(1×1cm)上, 并且遵循关于新鲜血液相同的程序进行处理。通过相同程序对面积相等(1×1cm)但无血液的空白收集纸带进行处理作为对照物。所有样品都是一式三份进行处理的。

[0180] 为了评价在样品收集、处理及储存期间来自除纸外的来源的可能的污染物, 在实

实验室中所用的 $10\text{cm}^2$ 表面积的不同材料上擦拭空白沃特曼玻璃微纤维过滤器纸带( $1\times 1\text{cm}$ ),包括乳胶手套、丁腈手套、聚乙烯(PE)拉链袋、铝箔拉链袋或玻璃纸袋。然后,通过使用以上描述的方法使经过擦拭的纸样品转甲基化,并且通过GC进行分析。用经过擦拭的玻璃微纤维过滤器减去空白玻璃微纤维过滤器的污染物含量来评估源自于那些手套和袋子的污染物。所有样品都是一式三份进行处理的。

[0181] 气相层析分析

[0182] 使用装备有一个BPX70毛细管柱 $50\text{m}\times 0.32\text{mm}$ 、膜厚度 $0.25\mu\text{m}$ (SGC有限公司,澳大利亚维多利亚州)、PTV注射器及火焰离子化检测器(FID)的一个GC(惠普6890;美国加利福尼亚州帕罗奥图)对FAME进行分离并定量。该注射器温度设定在 $250^\circ\text{C}$ 并且FID温度设定在 $300^\circ\text{C}$ ,使用一种程序化升温方法( $140^\circ\text{C}$ - $240^\circ\text{C}$ )。利用氦气作为载气,在该柱中的流速为每秒 $35\text{cm}$ 并且入口分流比设定为 $20:1$ 。通过使用惠普化学工作站数据系统,将未知样品的保留时间和峰面积值与商用脂质标准品(鲁查克制备公司,美国明尼苏达州伊利森)的那些相比较来实现FAME的鉴别和定量。

[0183] 统计学分析

[0184] 所有统计学分析都是使用PASW Statistic 18进行的。值以平均值 $\pm$ 标准差(SD)表示。使用了单因素方差分析来测定总血液脂质中脂肪酸百分比之间的显著差异,并且使用 $p<0.05$ 来确定统计学显著性。

[0185] 结果与讨论

[0186] 血斑样品与新鲜血液之间的结果不同

[0187] 当与新鲜血液测量值相比较时,对滴到硅胶纸和玻璃微纤维过滤器上的 $25\mu\text{l}$ 血液进行的分析产生相同的脂肪酸组成结果。相比之下,当与新鲜血液测量值相比较时,在弗鲁卡测试用试剂盒或沃特曼903收集卡上的 $25\mu\text{l}$ 血斑在总血液脂质中具有显著更低的 $\omega-3$ 脂肪酸和花生四烯酸(AA, $20:4\ n-6$ )百分含量(表6)。这种在血斑样品中 $\omega-3$ 和AA比例的明显降低通过在这些样品中所测量的饱和脂肪酸棕榈酸( $16:0$ )和硬脂酸( $18:0$ )的百分比的显著增加而抵消。当将血斑的体积增加到 $50\mu\text{l}$ 时,从收集于弗鲁卡测试用试剂盒上的血斑测量的脂肪酸组成与新鲜血液并无显著不同,不过在沃特曼903收集卡上的 $50\mu\text{l}$ 血斑的分析仍产生与新鲜血液中显著不同的脂肪酸特征(表7)。

[0188] 表6. 在 $25\mu\text{l}$ 干燥血斑中测定的脂肪酸组成(%)与新鲜血液的比较

[0189]

脂肪酸 * (%)	血斑					
	新鲜血液	沃特曼玻 璃微纤维 过滤器	沃特曼硅 胶纸	沃特曼 3MM 纸	弗鲁卡测试 用试剂盒	沃特曼 903 纸
	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
16:0	22.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	22.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	22.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	23.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	24.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	25.2 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
18:0	10.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	11.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	11.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
18:1n- 9	21.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	21.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	21.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	21.0 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	20.7 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	20.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
18:2n- 6	24.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	24.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	24.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	23.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
20:4n- 6	9.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	9.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	8.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	8.2 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
20:5n- 3	1.30 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.28 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.18 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.10 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
22:5n- 3	1.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	1.15 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.10 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
22:6n- 3	3.85 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.83 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.85 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.76 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	3.68 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	3.58 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>

[0190] \*值表示平均值 $\pm$ SD (n=3), 不同上标指示各组间的显著差异, p<0.05[0191] 表7. 在50 $\mu$ l血斑中测定的脂肪酸组成 (%) 与新鲜血液的比较

[0192]

脂肪酸 * (%)	血斑					
	新鲜血液	沃特曼 玻璃纤维 纤维过滤器	沃特曼 硅胶纸	沃特曼 3MM 纸	弗鲁卡 测试用试剂 盒	沃特曼 903 纸
	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
16:0	22.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	22.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	23.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	23.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	23.6 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	24.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
18:0	10.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	10.9 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	11.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
18:1n- 9	21.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	21.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	21.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	21.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	20.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
18:2n- 6	24.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	24.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	24.4 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	24.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
20:4n- 6	9.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	9.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	8.7 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	8.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
20:5n- 3	1.30 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.28 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.16 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
22:5n- 3	1.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
22:6n- 3	3.85 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.88 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.83 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.82 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.77 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	3.68 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

[0193] \*值表示平均值 $\pm$ SD (n=3), 不同上标指示各组间的显著差异, p<0.05

[0194] 此处呈现的结果清楚地证实, 从血斑样品得到的脂肪酸状况测试结果可以与从新鲜全血获得的那些不同。弗鲁卡血液收集试剂盒和沃特曼903试样收集卡是被广泛用于血液收集的商业产品, 并且沃特曼3MM层析纸也常常在临床试验中被用作血液收集纸。然而, 当使用这三种类型的纸直接评估一滴全血中的LCPUFA时, 在其中任一种上的较低体积的血液 (25 $\mu$ l) 产生不确定的脂肪酸状况结果。从我们的数据可知, 来自这些收集纸的污染物干扰了对应类别的脂肪酸的量占总脂质的比例的准确测定。使用空白收集纸作为对照物来针对污染物进行校正对于个别脂肪酸组成测试是可行的。然而, 来自不同类型血液收集纸的污染物的量不同并且相同类型纸中存在的污染物的量有可能在一张内或批次之间不同, 使得以任何确定性程度应用一个基于空白纸的污染物的校正因子不切实际, 尤其是在大型临床试验中。

[0195] 来自不同纸的污染物

[0196] 本发明人已经发现, 所有类型收集纸中的两种主要污染物对应于16:0和18:0饱和脂肪酸 (表8)。这解释了当与新鲜血液中的那些相比较时在血斑样品中检测到的16:0和18:0饱和脂肪酸的百分比增加。此外, 污染物的总量在不同类型收集纸之间不同, 例如, 沃特曼硅胶纸仅具有0.1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>污染物, 而一些批次的沃特曼903纸具有该量的约25倍。用溶剂洗涤这些纸并且甚至用转甲基化程序处理纸都无法去除该污染物, 使得我们相信这些脂肪酸是纸的成分。

[0197] 先前有关血斑测试的研究要求,在仅处理收集纸之后不观察到GC峰,不过本发明人发现了所测试的所有类型收集纸中的污染物峰。情况可能是,收集纸中的少量污染物可能无法显著地改变脂肪酸组成测试结果。举例来说,沃特曼硅胶纸和沃特曼玻璃纤维过滤器显示的脂肪酸组成结果与新鲜血液的结果相同。然而,对于含有大量污染物的那些纸,如弗鲁卡测试用试剂盒和沃特曼903样品收集纸,当所收集的血液体积较小时,脂肪酸结果明显不同于新鲜血液。这些污染物可能是呈游离酸或不同酯形式的树脂酸或脂肪酸,因为这两者都存在于木材中,这些纸最终由该木材合成。从造纸厂获得的经过处理的水样品中已经报导有树脂和脂肪酸,包括16:0和18:0饱和脂肪酸。因此,看起来这些酸或其酯可以作为杂质保留在最终纸制品中,并且当对收集于这些纸上的血斑的脂肪酸组成进行评估时导致污染物的引入。

[0198]

表 8. 在甲基化期间来自不同类型收集纸的污染物的量

对应于脂肪酸峰的污染物 <sup>a</sup>	沃特曼玻璃纤维过滤器	沃特曼硅胶纸	沃特曼 3MM 纸	弗鲁卡测试用试剂盒		
	1.5 × 1.5 cm cm	1.5 × 1.5 cm	1.5 × 1.5 cm	沃特曼 903 纸#1	沃特曼 903 纸#2	沃特曼 903 纸#3
16:0	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.5 × 1.5 cm cm	1.5 × 1.5 cm cm	1.5 × 1.5 cm cm
18:0	0.02 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>a</sup>
Total	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.03 <sup>a</sup>
				2.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.03 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>在纸或过滤器上污染物的单位是 μg/cm<sup>2</sup>, 值表示平均值 ± SD (n=3), 不同上标指示各组间的显著差异, p < 0.05

#1: 第 1 批; #2: 第 2 批; #3: 第 3 批

[0199] 来自其他来源的可能污染物

[0200] 在实验室中,通过用纸触摸包括乳胶手套、丁腈手套、PE拉链袋、铝箔拉链袋及玻璃纸袋在内的材料,来测试污染物的来源(表9)。乳胶手套含有大量的污染物,不过,从丁腈手套实际上未检测到污染物。PE袋和铝袋各自含有大量的污染物,这些污染物对应于油酸(18:1 n-9)和芥酸(22:1n-9),不过玻璃纸袋不引起任何显著污染的出现。

[0201] 表9. 来自不同来源的可能污染物的量

[0202]

对应于脂 肪酸峰的 污染物*	丁腈手套	乳胶手套	PE 拉链 袋	铝箔拉链 袋	玻璃纸袋
16:0	0.005 ± 0.002	0.62 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0	0
18:0	0	0.61 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0	0.010 ± 0.002
18:1 n-9	0	0	0.31 ± 0.02	0	0
22:1 n-9	0	0	0.48 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0
<b>Total</b>	0.005 ± 0.002 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.010 ± 0.002 <sup>a</sup>

[0203] \*在手套或袋子的表面上擦拭之后,在沃特曼玻璃微纤维过滤上污染物的单位是 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,值表示平均值 $\pm$ SD(n=3),不同上标指示各组间的显著差异, $p<0.05$

[0204] 乳胶手套、PE袋及铝袋是许多实验室中广泛使用的。先前的研究没有集中在乳胶手套作为实验中污染的来源,并且现有的研究仅报导乳胶手套会释放可能引起过敏的内毒素。然而,我们的实验已经指示,即使这些广泛使用的实验室物品也有可能释放疏水性污染物并且可能引起血液脂肪酸组成测试结果的改变,尤其是当血液样品体积较低时。因此,为了使来自手套和袋子的可能的污染物问题减到最少,推荐在血斑样品收集、处理及储存期间使用丁腈手套和玻璃纸袋。

[0205] 概括起来,所有类型的收集纸都释放污染物并且这些污染物有可能改变干燥的血斑样品的分析结果,特别是当血斑体积较低时。由于对该纸进行洗涤或转甲基化,或甚至是减去空白值都不是去除来自纸的污染物的有效策略,故选择一种含有最少污染物的收集纸对于快速脂肪酸组成测试很重要。本发明人未能检测到沃特曼硅胶纸和沃特曼玻璃微纤维过滤器的任何显著污染物,并且它们显示与新鲜血液中相同的脂肪酸组成结果,即使是当纸上血液的量较低(25 $\mu\text{l}$ )时。此外,在此呈现的实验结果还揭露,使用丁腈手套和玻璃纸袋可以防止血斑样品在样品收集、处理及储存期间的可能的污染。

[0206] 实例5-脂肪酸状况的毛细管血斑与常规测量值的比较

[0207] 从50位受试者收集毛细管和静脉血液。在所有受试者中,有35位很少消费鱼油补

充品,或如果他们消费,也仅消费少量(每天<3ml),而其中15位消费大量的鱼油补充品(约15ml,MAXEPA)。

[0208] 将一滴毛细管血(30-50 $\mu$ l)吸收到浸透2mg/ml BHT和5mg/ml EDTA的沃特曼硅胶纸上,并且在室温(19 $^{\circ}$ C-23 $^{\circ}$ C)下于空气中干燥5-6小时。一旦血斑样品干燥,就使其转酯化并且通过GC对所得FAME进行分析。对于通过静脉穿刺收集的血液,通过氯仿/异丙醇(2:1, v/v)萃取500 $\mu$ l全血中的总脂质。在4 $^{\circ}$ C下,将剩余血液以3000 rpm离心10分钟以分离血浆和红细胞(RBC)。对应地使用氯仿/甲醇(2:1, v/v)或氯仿/异丙醇(2:1, v/v)萃取血浆和RBC中的总脂质,并且通过薄层层析法从总脂质中分离出磷脂部分。结果显示于表10中。

[0209] 表10. 来自毛细管DBS和常规检验的脂肪酸组成

[0210]

脂肪酸	毛细管 DBS	全血总脂质	血浆总脂质	血浆磷脂	红细胞磷脂
16:0	*23.40 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	23.61 $\pm$ 1.99 <sup>a</sup>	23.28 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>	29.39 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>	25.36 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>
18:0	11.66 $\pm$ 1.24 <sup>ab</sup>	9.90 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	7.44 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>	14.31 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>	13.67 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>
18:1 n-9	18.99 $\pm$ 2.84 <sup>b</sup>	18.99 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>	20.78 $\pm$ 3.91 <sup>a</sup>	10.54 $\pm$ 2.51 <sup>d</sup>	15.73 $\pm$ 1.73 <sup>c</sup>
18:2 n-6	26.71 $\pm$ 4.18 <sup>b</sup>	27.96 $\pm$ 4.64 <sup>b</sup>	34.29 $\pm$ 5.82 <sup>a</sup>	25.37 $\pm$ 4.70 <sup>b</sup>	14.33 $\pm$ 2.82 <sup>c</sup>
18:3 n-3	0.46 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
20:4 n-6	9.09 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	9.05 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>	6.46 $\pm$ 1.24 <sup>c</sup>	9.54 $\pm$ 1.95 <sup>b</sup>	14.11 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>
20:5 n-3 (EPA )	2.52 $\pm$ 2.19 <sup>b</sup>	2.78 $\pm$ 2.28 <sup>b</sup>	2.83 $\pm$ 2.20 <sup>b</sup>	3.20 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>	2.65 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>
22:4 n-6	0.92 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	0.30 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	2.86 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>
22:5 n-3	1.78 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	1.76 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	1.41 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	3.89 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>
22:6 n-3 (DHA )	4.42 $\pm$ 1.29 <sup>c</sup>	4.50 $\pm$ 1.48 <sup>c</sup>	3.31 $\pm$ 1.37 <sup>d</sup>	5.72 $\pm$ 1.85 <sup>b</sup>	7.27 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>

[0211]

[0212] 值表示平均值 $\pm$ SD(n=3),不同上标指示各组彼此的显著差异,p<0.01

[0213] 由于个体的脂肪酸状况是以多种方式报导,故重要的是,将干燥的血斑中的脂肪

酸谱与报导血液中脂肪酸的标准方式相比较。这些包括全血提取物、血浆磷脂及红细胞脂肪酸。此外,将这些血液部分的每一种中的脂肪酸分组(如EPA+DHA( $\omega$ -3指数))与在干燥血斑中所发现的类似分组相比较。

[0214] 此处的结果证实,毛细管的干燥血斑脂肪酸组成与在标准血液部分中发现的相应脂肪酸值之间存在较高相关性(表11)并且这些可以按简单的方程表示(参见图4到7)。

[0215] 表11. 毛细管的干燥血斑与常规检验之间脂肪酸组成的相关性

[0216]

毛细管的干燥血斑脂肪酸	静脉血部分中的相应脂肪酸			
	全血总脂质	血浆总脂质	血浆磷脂	红细胞磷脂
16:0	0.961**	0.962**	0.771**	0.626**
18:0	0.938**	0.843**	0.551**	0.7**
16:1 n-7	0.946**	0.878**	0.623**	0.511*
18:1 n-9	0.982**	0.971**	0.463*	0.674**
18:2 n-6 (LA)	0.991**	0.854**	0.896**	0.824**
18:3 n-3 (ALA)	0.951**	0.927**	0.578**	0.441*

[0217]

20:4 n-6 (AA)	0.993**	0.85**	0.693**	0.754**
20:5 n-3 (EPA)	0.998**	0.985**	0.988**	0.973**
22:4 n-6	0.980**	0.587**	0.436*	0.889**
22:5 n-3 (DPA)	0.915**	0.878**	0.838**	0.847**
22:6 n-3 (DHA)	0.996**	0.976**	0.964**	0.971**

[0218] \*p<0.001

[0219] \*\*p<0.0001

[0220] 实例6-储存温度对脂肪酸稳定性的影响

[0221] 针对储存温度对干燥血斑中脂肪酸稳定性的影响进行测试。将血液滴到浸透2mg/ml BHT和5mg/ml EDTA的沃特曼硅胶层析纸上,并在空气中干燥5小时。在干燥剂存在下,将干燥的血斑样品在-20℃、4℃及室温(19℃-23℃)下储存于拉链铝箔袋中。5小时、2周及4周之后,如以上所描述,对干燥血斑样品的脂肪酸组成进行分析。结果显示于下表12中。

[0222] 一般来说,经过4周储存,在-20℃、4℃及室温(19℃-23℃)下储存的干燥血斑样品间脂肪酸组成无显著差异。

[0223]

表 12. 在不同温度下经 4 周储存的在装载硅胶的纸上干燥血斑样品的脂肪酸组成

脂肪酸 <sup>1</sup>	原始 <sup>2</sup>	干燥之后 (5 小时)		-20°C		4°C		室温 (19°C-23°C)	
		2 周	4 周	2 周	4 周	2 周	4 周	2 周	4 周
16:0	22.48 ± 0.22	22.55 ± 0.14	22.68 ± 0.15	22.65 ± 0.18	22.84 ± 0.19	22.75 ± 0.27	22.92 ± 0.24	22.75 ± 0.27	22.92 ± 0.24
18:0	13.12 ± 0.18	13.19 ± 0.2	13.41 ± 0.11	13.27 ± 0.08	13.39 ± 0.1	13.34 ± 0.07	13.42 ± 0.19	13.34 ± 0.07	13.42 ± 0.19
18:1 n-9	18.48 ± 0.07	18.52 ± 0.08	18.75 ± 0.06	18.73 ± 0.05	18.86 ± 0.07	18.60 ± 0.09	18.94 ± 0.14	18.60 ± 0.09	18.94 ± 0.14
18:2 n-6	19.66 ± 0.08	19.62 ± 0.12	19.56 ± 0.09	19.60 ± 0.06	19.57 ± 0.13	19.65 ± 0.16	19.52 ± 0.06	19.65 ± 0.16	19.52 ± 0.06
18:3 n-3	0.5 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.49 ± 0.01
20:4 n-6	7.81 ± 0.09	7.77 ± 0.07	7.58 ± 0.07	7.60 ± 0.02	7.48 ± 0.06	7.65 ± 0.08	7.52 ± 0.07	7.65 ± 0.08	7.52 ± 0.07
20:5 n-3	6.75 ± 0.08	6.70 ± 0.06	6.58 ± 0.07	6.59 ± 0.09	6.40 ± 0.07	6.54 ± 0.09	6.38 ± 0.07	6.54 ± 0.09	6.38 ± 0.07
22:4 n-6	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.01
22:5 n-3	3.65 ± 0.03	3.64 ± 0.02	3.60 ± 0.04	3.65 ± 0.02	3.61 ± 0.05	3.60 ± 0.05	3.57 ± 0.05	3.60 ± 0.05	3.57 ± 0.05
22:6 n-3	7.06 ± 0.05	7.02 ± 0.1	6.87 ± 0.07	6.93 ± 0.07	6.78 ± 0.06	6.89 ± 0.09	6.75 ± 0.12	6.89 ± 0.09	6.75 ± 0.12

<sup>1</sup> 值表示平均值 ± SD (n=3), 各组彼此无显著差异,  $p < 0.01$ 。<sup>2</sup> “原始”意思指由 50 μl 新鲜血液直接转甲基化而获得的脂肪酸组成。

[0224] 实例7-保存期限对固体介质的影响

[0225] 针对储存期对固体介质稳定性的影响进行测试。将沃特曼硅胶层析纸浸透2mg/ml

BHT和5mg/ml EDTA,并且在使用前储存1个月和2个月。将血液滴到两种经过储存的纸以及用新鲜制备的保护剂溶液(2mg/ml BHT+5mg/ml EDTA)处理过的纸上。在空气中干燥血斑5小时,并且然后在干燥剂存在下,将其在室温(19°C-23°C)下储存于拉链铝箔袋中。5小时、2周及4周之后,如以上所描述,对干燥血斑样品的脂肪酸组成进行分析。结果示于下表13和图8中。

[0226]

表 13. 在室温下经 4 周储存的在新鲜制备或预先制备的蒙载硅胶的纸上血斑样品的脂肪酸组成

脂肪 酸 <sup>1</sup>	原始 <sup>2</sup>	新鲜制备的纸			1 个月的纸			2 个月的纸		
		5 小时	2 周	4 周	5 小时	2 周	4 周	5 小时	2 周	4 周
16:0	24.70 ± 0.24	24.77 ± 0.13	24.85 ± 0.14	25.01 ± 0.23	24.90 ± 0.12	24.94 ± 0.17	25.11 ± 0.15	24.84 ± 0.16	24.86 ± 0.23	24.95 ± 0.17
18:0	13.07 ± 0.13	13.12 ± 0.09	13.02 ± 0.14	13.23 ± 0.19	13.15 ± 0.1	13.11 ± 0.16	13.19 ± 0.09	13.18 ± 0.13	13.16 ± 0.18	13.21 ± 0.15
18:1 n-9	19.25 ± 0.12	19.20 ± 0.22	19.59 ± 0.13	19.86 ± 0.18	19.21 ± 0.06	19.64 ± 0.05	19.89 ± 0.18	19.30 ± 0.18	19.66 ± 0.13	19.80 ± 0.14
18:2 n-6	18.78 ± 0.09	18.74 ± 0.14	18.73 ± 0.09	18.49 ± 0.14	18.68 ± 0.07	18.61 ± 0.12	18.37 ± 0.08	18.62 ± 0.08	18.59 ± 0.19	18.53 ± 0.1
18:3 n-3	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.01
20:4 n-6	7.17 ± 0.09	7.22 ± 0.11	7.19 ± 0.03	7.10 ± 0.05	7.17 ± 0.08	7.14 ± 0.05	7.08 ± 0.05	7.17 ± 0.06	7.15 ± 0.08	7.08 ± 0.05
20:5 n-3	6.33 ± 0.06	6.30 ± 0.08	6.15 ± 0.11	6.03 ± 0.07	6.31 ± 0.05	6.12 ± 0.06	6.07 ± 0.05	6.29 ± 0.07	6.13 ± 0.08	6.08 ± 0.09
22:4 n-6	0.58 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.57 ± 0.02
22:5 n-3	2.96 ± 0.03	2.94 ± 0.03	2.94 ± 0.03	2.88 ± 0.05	2.98 ± 0.02	2.95 ± 0.02	2.89 ± 0.04	2.99 ± 0.03	2.96 ± 0.04	2.88 ± 0.06

[0227]

22:6 n=3	6.63 ± 0.05	6.61 ± 0.1	6.51 ± 0.04	6.32 ± 0.07	6.54 ± 0.09	6.46 ± 0.05	6.30 ± 0.05	6.55 ± 0.08	6.44 ± 0.09	6.40 ± 0.05
-------------	----------------	------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	----------------

<sup>1</sup> 值表示平均值 ± SD (n=3), 各组彼此无显著差异, p<0.01。

<sup>2</sup> “原始”意指指由 50 μl 新鲜血液直接转甲基化而获得的脂肪酸组成。

[0228] 一般说来,这些结果证实,在使用前2个月预先制备的固体介质在使LCPUFA稳定方面具有与新鲜制备的固体介质相同的功效。当在这一实例中研究2个月的保存期限时,这些

结果清楚地指示预先制备的固体介质可能具有更长的保存期限。

[0229] 参考文献:

[0230] 1. W.C.涂 (W.C.Tu) 等, 2010. 底物水平对  $\omega$ -3 长链脂肪酸合成的调控作用强于基因表达 (*Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression.*) 《前列腺素、白三烯及必需脂肪酸》(*Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*), 83, 61-68。

[0231] 2. 闵Y.J. (Min, YJ.) 等, 2011. 储存温度和时间对收集于滤纸上的指尖血液的脂肪酸组成的影响 (*Effect of storage temperature and length on fatty acid composition of fingertip blood collected on filter paper.*) 《前列腺素、白三烯及必需脂肪酸》, 84, 13-18。

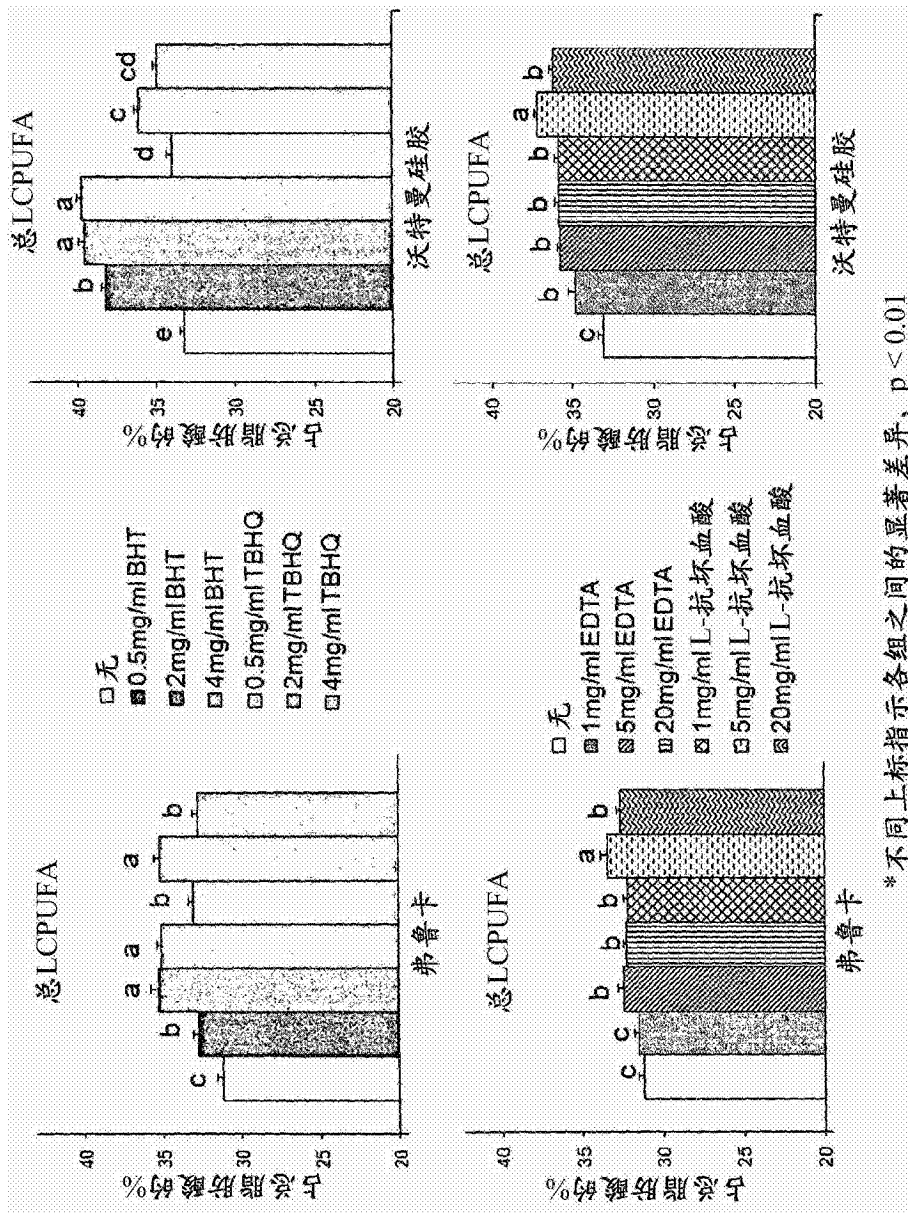


图1

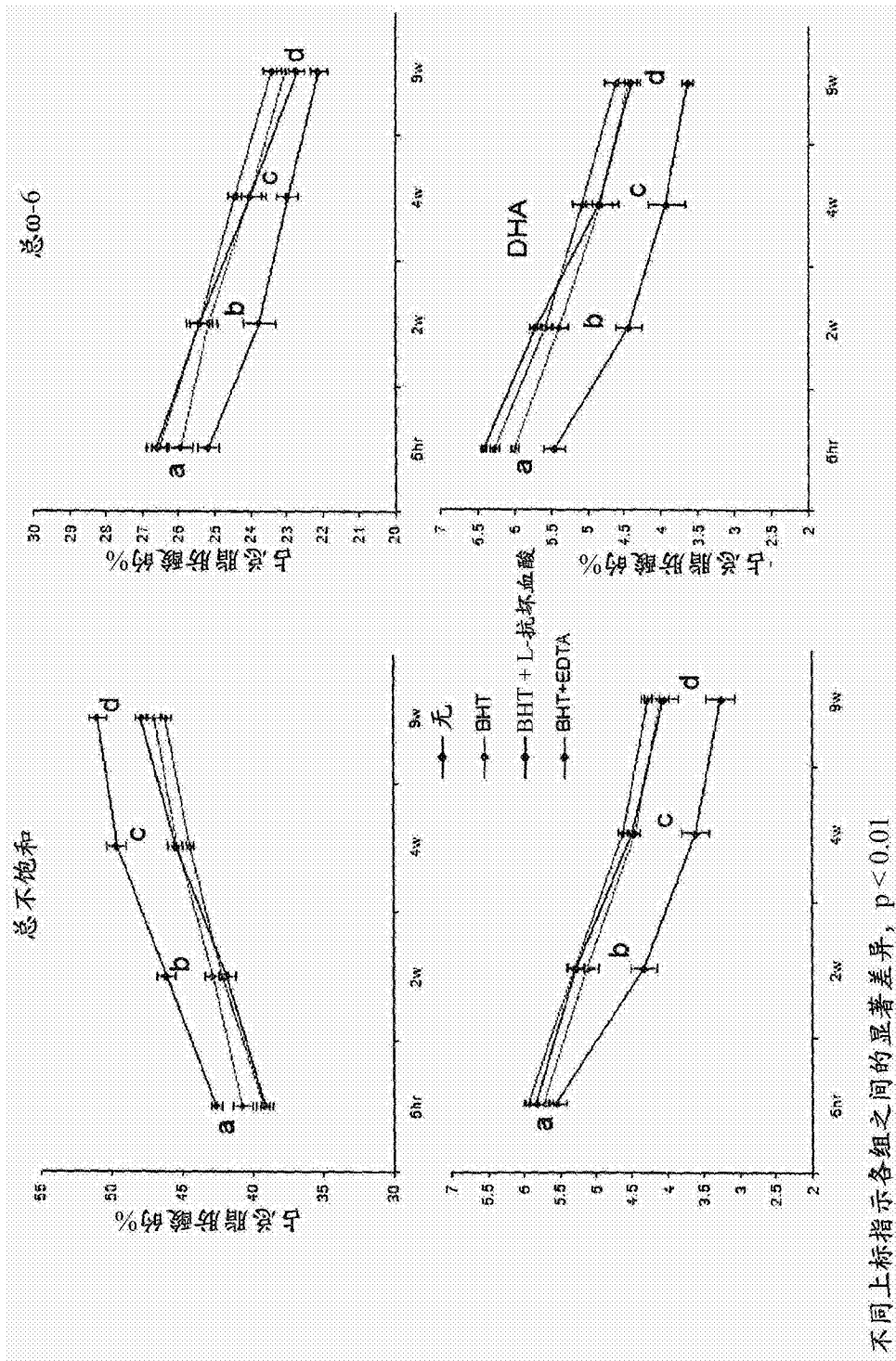


图2

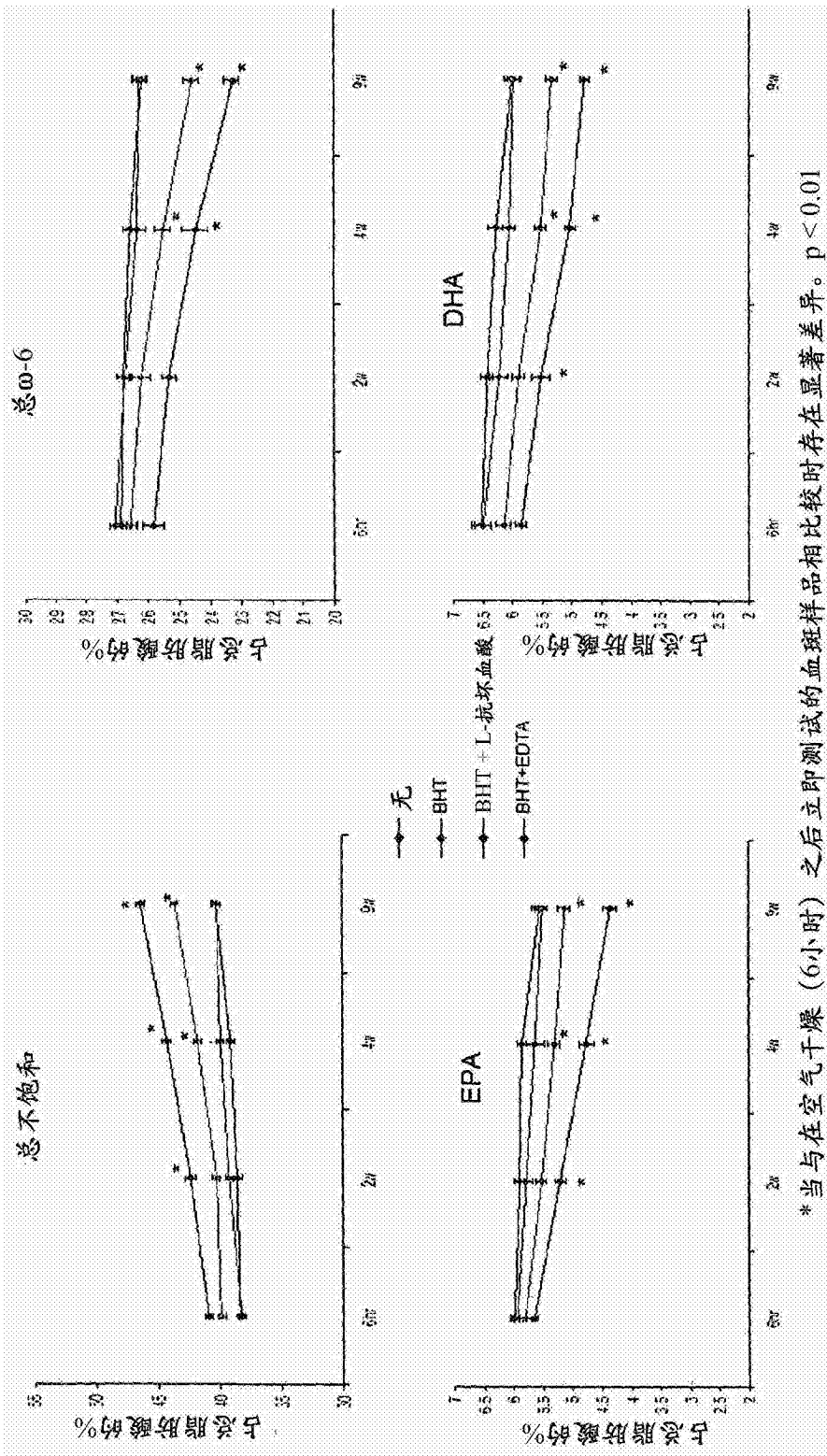


图3

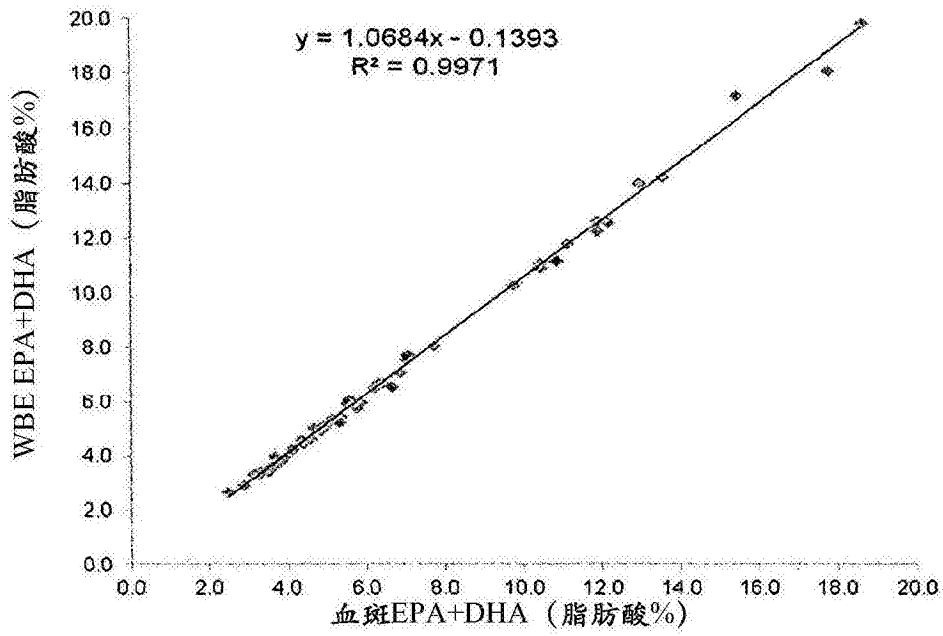


图4

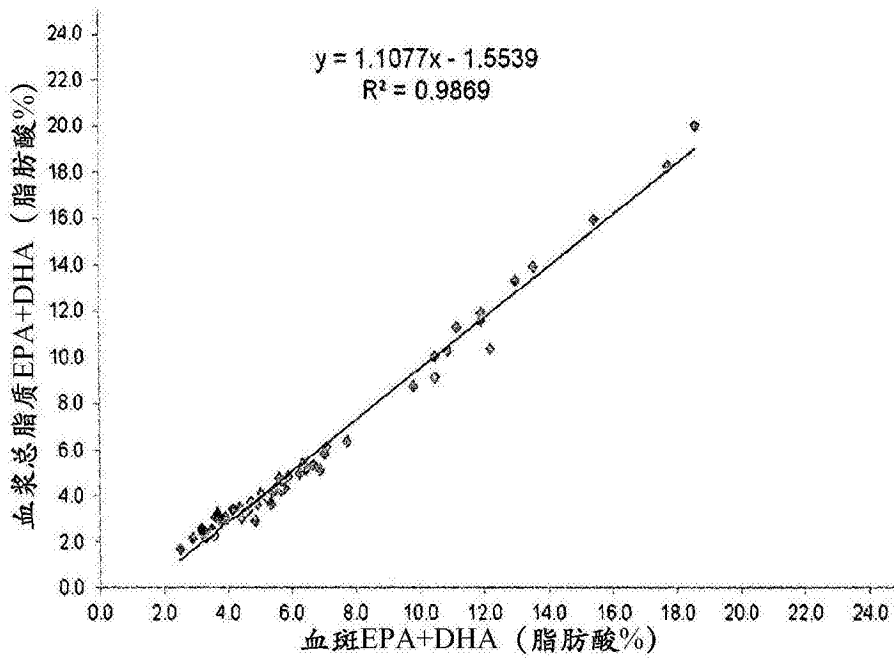


图5

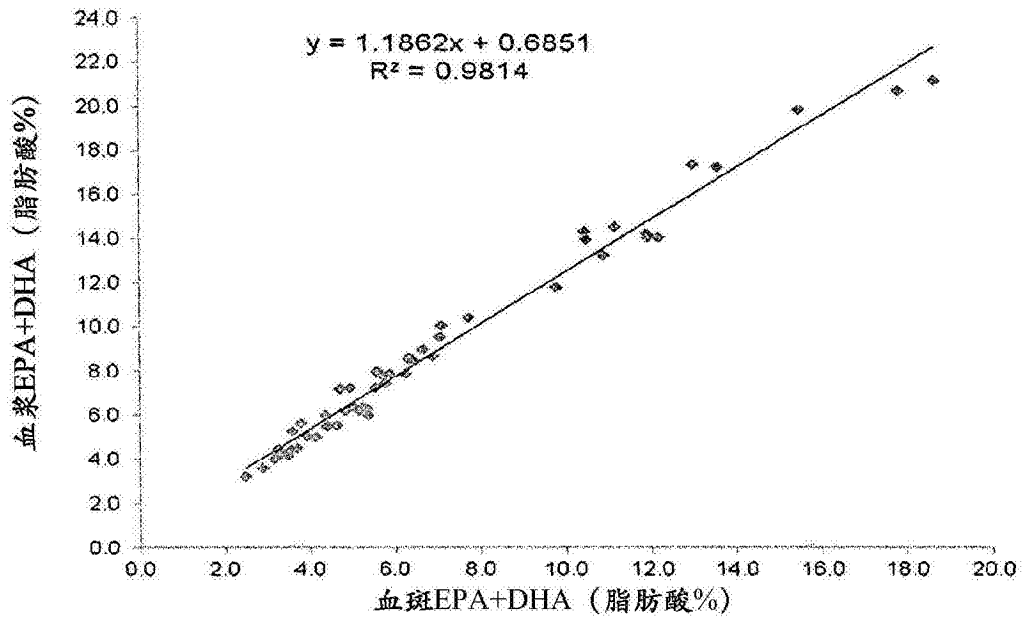


图6

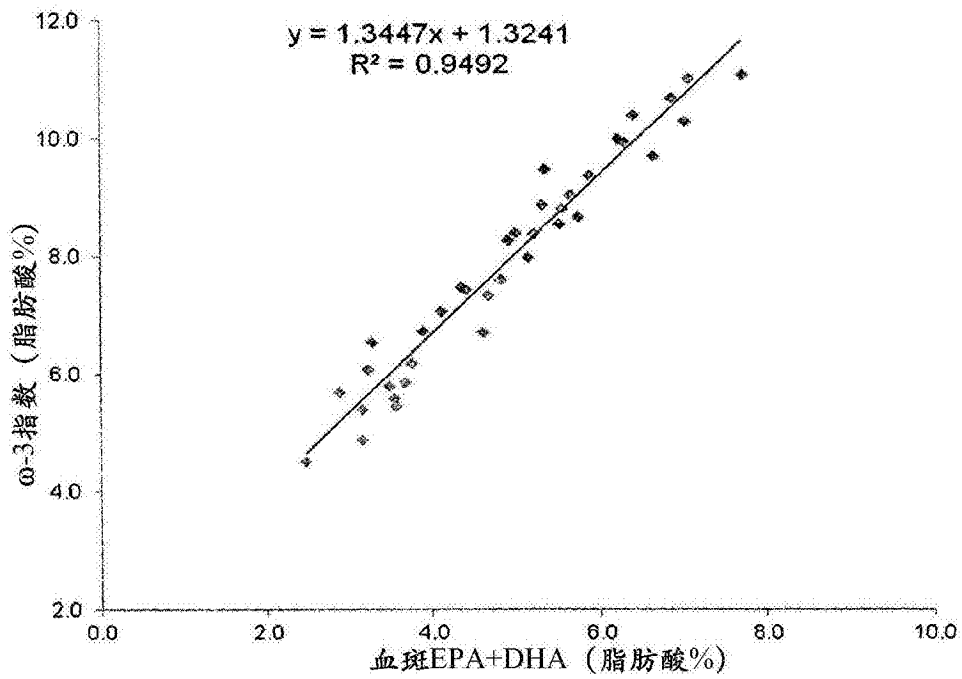


图7

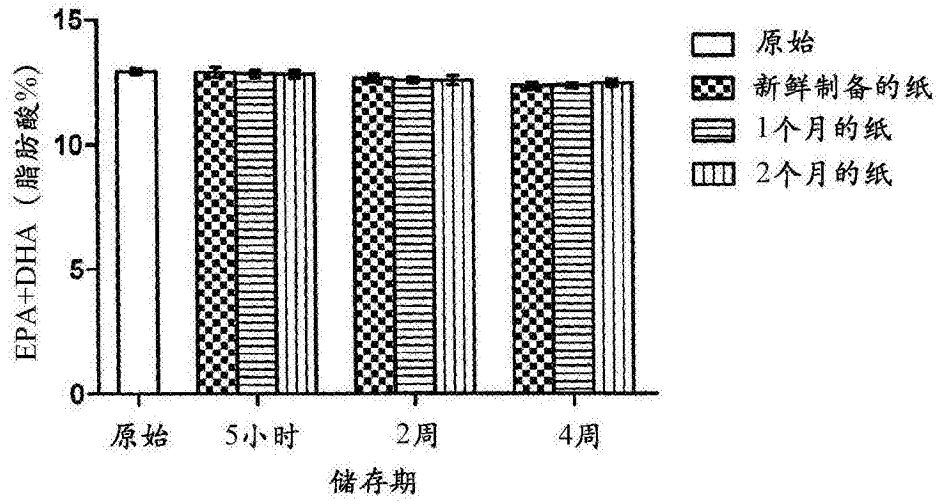


图8