

基于 MRM 技术利用 LC-MS/MS 法分析人血浆和血清中的游离脂肪酸

01-00758-CN

Yuki Suzuki, Naoko Nagano 和 Masaki Yamada

特点描述

- ◆ 通过简单的预处理，能够同时分析血液中的 19 种游离脂肪酸。
- ◆ 延迟柱可将目标脂肪酸与干扰性污染物分离开来。
- ◆ LCMS-8060RX 配备了新的 CoreSpray 技术，能够对痕量化合物进行稳定且可靠的定量分析。

■ 引言

游离脂肪酸约占人体总脂肪酸的 5%，它是已知的重要生物信号转导分子，可调节胰岛素分泌等功能。它还作为各种内分泌失调的生物标志物而备受关注¹⁾。

使用气相色谱法 (GC) 或气相色谱 - 质谱联用法 (GC/MS) 分析时通常需要进行预处理才能进样分析，例如对长链脂肪酸和多不饱和脂肪酸进行甲酯化处理等。利用液相色谱 - 质谱联用法 (LC/MS) 的多反应监测 (MRM) 技术则无需衍生化预处理就能对脂肪酸进行高灵敏度的定量分析。然而，环境中广泛存在的脂肪酸，如棕榈酸和硬脂酸等杂质在 LC/MS 分析时会被引入 LC 系统中，从而在实际样本分析中对脂肪酸的准确定量造成困难²⁾。

本报告展示了一个使用高度稳定的 LCMS-8060RX 系统结合延迟柱对人血浆和血清中的游离脂肪酸进行定量分析的实例。



图 1 LCMS-8060RX 和 CoreSpray

■ 样本制备

化学标准品购自 Cayman Chemical (密歇根州 Ann Arbor)。人血浆样本来自 Kojin-Bio Co. (日本) (从人志愿者处采集获得)，分别使用了 EDTA 和肝素抗凝的两种血浆样本。

向 100 μ L 血浆和血清中加入 295 μ L 含 1% 甲酸的乙腈以及 5 μ L 内标，然后混匀约 1 分钟。离心后，收集上清液，用于进样分析 (图 2)。内标浓度的确认：使用含 1% 甲酸的乙腈稀释上述上清液，然后进行分析，根据稀释比例和信号响应，调整加入的内标浓度为 25 ng/mL。

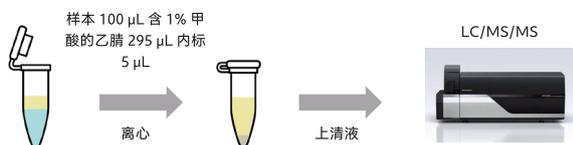


图 2 样本制备流程

■ 分析条件

使用 LC-40 系列 NexeraTM UHPLC 系统和超快速三重四极杆质谱仪 LCMS-8060RX (图 1)。LCMS-8060RX 的特点是采用了 CoreSpray 技术，可提供更均匀的雾化气流，使得在较长时间内能够获得更稳定的定量结果。

HPLC 以及 MS 的分析条件见表 1。在梯度混合器和自动进样器之间安装了一根延迟柱，以改善流动相中目标成分与环境干扰物成分的分​​离效果。

表 1 分析条件

UHPLC (Nexera X3 系统)	
色谱柱	: Shim-pack Scepter TM Claris C18-120 ¹⁾ (100 mm \times 2.1 mm I.D., 1.9 μ m)
延迟柱	: Shim-pack TM XR-ODS II ²⁾ (50 mm \times 2.0 mm I.D., 2.2 μ m)
流动相 A	: 乙腈 / 水 = 20/80
流动相 B	: 乙腈 / 异丙醇 = 20/80
流速	: 0.2 mL/min
梯度程序	: B 相浓度 50% (0-0.5 min) \rightarrow 65% (7 min) \rightarrow 100% (14-17.5 min) \rightarrow 50% (17.6-20 min)
柱温	: 55°C
进样量	: 1 μ L
*1 P/N: 227-31210-02 *2 P/N: 228-41623-94	
MS (LCMS-8060RX)	
离子源	: ESI (负离子模式)
模式	: MRM
雾化气流量	: 5.0 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气体流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250°C
加热模块温度	: 400°C
接口温度	: 150°C

■ 通过延迟柱对基质峰进行色谱分离

我们开发了一种可同时分析以下化合物的方法：月桂酸、十八碳四烯酸、二十碳五烯酸 (EPA)、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸、肉豆蔻酸、二十二碳六烯酸 (DHA)、棕榈油酸、花生四烯酸 (AA)、亚油酸、二十二碳五烯酸 (DPA)、二高- γ -亚麻酸 (DGLA)、棕榈酸、肾上腺酸、油酸、硬脂酸、花生酸、神经酸和木蜡酸。浓度为 500 ng/mL 的游离脂肪酸标准样本的 MRM 色谱图如图 3 所示。

通过在混合器和自动进样器之间安装一根延迟柱，能够将来自样本的目标化合物与来自流动相的基质分离开来。在血浆和血清样本中，几种游离脂肪酸 (棕榈酸 C16:0、硬脂酸 C18:0 和油酸 C18:1) 的峰之后检测到了被认为是来自流动相的脂肪酸的宽峰 (图 3)。如果没有延迟柱，来自样本的目标化合物的峰就会与来自流动相的宽峰重叠，从而无法获得准确的峰面积。



图3 19种游离脂肪酸的MRM色谱图

表2 19种游离脂肪酸的校准曲线和重复性

化合物	MRM 通道	定量范围 (μg/L)	相关系数 (R ²)	重复性 (%RSD)
月桂酸_12:0	199.20>199.20	10 - 1000	0.997	4.35
十八碳四烯酸_18:4	275.20>275.20	1 - 1000	0.997	4.27
EPA_20:5	301.20>257.10	1 - 1000	0.998	4.77
α-亚麻酸_18:3	277.20>277.20	1 - 1000	0.997	8.34
γ-亚麻酸_18:3	277.20>277.20	1 - 1000	0.998	7.63
肉豆蔻酸_14:0	227.20>227.20	10 - 1000	0.999	4.48
棕榈油酸_16:1	253.20>253.20	10 - 1000	0.997	7.10
DHA_22:6	327.20>283.15	10 - 1000	0.998	6.07
AA_20:4	303.20>259.15	10 - 1000	0.998	3.94
亚油酸_18:2	279.20>279.20	1 - 500	0.998	2.75
DPA_22:5	329.30>329.30	1 - 1000	0.998	6.84
DGLA_20:3	305.20>305.20	1 - 1000	0.998	4.67
棕榈酸_16:0	255.20>255.20	1 - 1000	0.997	1.11
肾上腺酸_22:4	331.30>331.30	1 - 1000	0.998	8.59
油酸_18:1	281.20>281.20	10 - 1000	0.998	6.53
硬脂酸_18:0	283.30>283.30	10 - 500	0.997	1.67
花生酸_20:0	311.30>311.30	10 - 1000	0.998	4.15
神经酸_24:1	365.30>365.30	1 - 500	0.997	1.68
木蜡酸_24:0	367.30>367.30	10 - 1000	0.999	2.40
AA-d8 (ISTD)	311.20>267.20	-	-	-

■ 校准曲线和重复性

每种化合物的校准曲线均采用内标法，在 1 至 1000 μg/L 的范围内有三个或更多的校准点（图 4）。结果表明：所有化合物都获得了良好的线性关系，相关系数 (R²) > 0.999。所有化合物分析结果稳定，在最低校准点处，其准确度为平均浓度的 70%-130%，重复性 (%RSD) 小于 10%（表 2）。

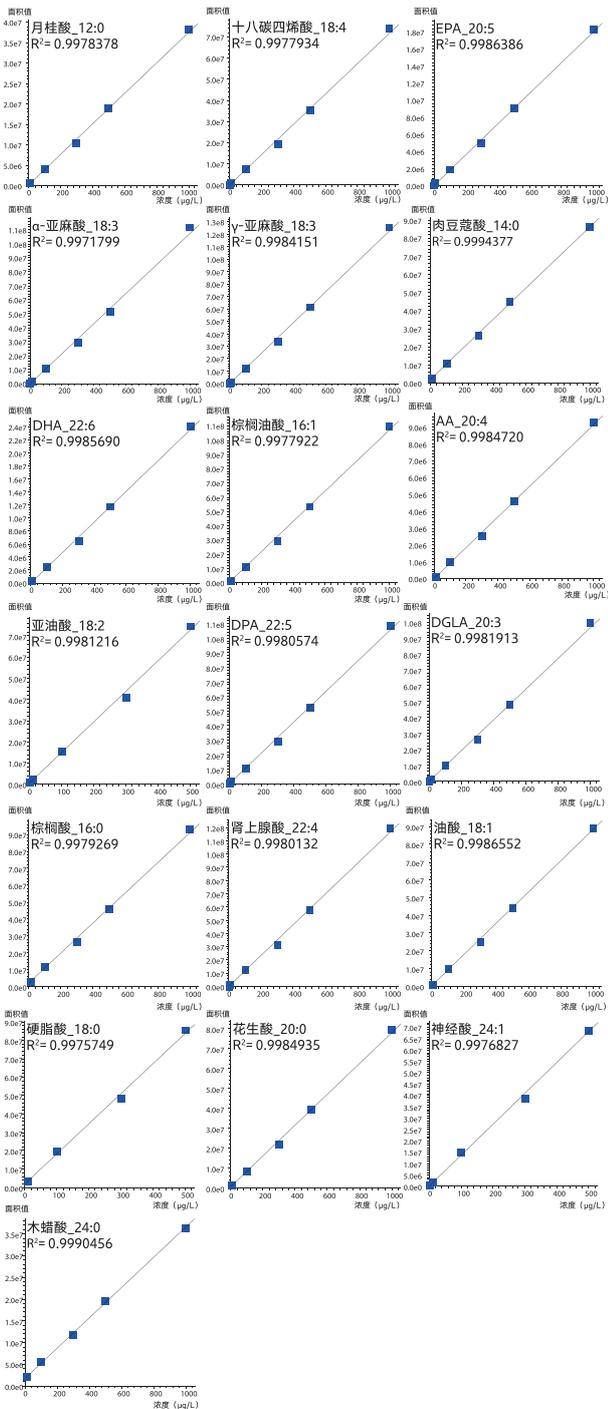


图 4 19 种游离脂肪酸在含 1% 甲酸的乙腈溶液中的校准曲线

人血浆和血清样本的分析结果

将预处理后的人血浆和血清根据其含量用含 1% 甲酸的乙腈进行稀释，然后进行定量分析。换算成未稀释溶液中浓度的结果汇总于表 3 中。检测到所有 19 种化合物，并且所估算浓度的重复性良好，RSD < 10%。

表 3 人血浆和血清中 19 种游离脂肪酸的浓度

化合物	EDTA 抗凝血浆		肝素抗凝血浆		血清	
	浓度 (µg/L)	%RSD	浓度 (µg/L)	%RSD	浓度 (µg/L)	%RSD
月桂酸_12:0	374.32	2.52	460.04	4.90	503.16	1.60
十八碳四烯酸_18:4	30.68	3.84	16.6	2.81	23.8	5.66
EPA_20:5	354.12	1.28	97.84	6.61	307.4	2.14
α-亚麻酸_18:3 (n-3)	1439.92	2.13	1349.04	3.19	1601.92	1.11
γ-亚麻酸_18:3 (n-6)	400.56	7.61	79.28	9.36	118.88	3.39
肉豆蔻酸_14:0	3363.48	1.25	1915.6	3.27	1683.84	0.89
棕榈油酸_16:1	3368.56	0.88	3708.12	1.88	3313	1.56
DHA_22:6	807.2	0.97	495	3.14	698.6	1.92
AA_20:4	4275.2	2.59	1326.12	1.95	3321.68	0.87
亚油酸_18:2	23459.44	2.43	17523.04	1.32	24026.8	2.69
DPA_22:5	441.28	1.12	196.68	3.61	289.72	2.00
DGLA_20:3	1074.52	0.95	439.6	2.33	785.32	2.03
棕榈酸_16:0	42375.52	2.69	29640.64	3.05	35220.72	2.54
肾上腺酸_22:4	222.84	1.66	170.16	3.27	151.8	2.41
油酸_18:1	65049.12	1.90	57857.36	0.94	62891.44	1.48
硬脂酸_18:0	12185.4	0.47	8733.88	2.00	10819.2	1.01
花生酸_20:0	70.76	5.30	77.8	8.01	113.64	3.14
神经酸_24:1	23.72	1.84	20.84	2.72	25.44	2.43
木蜡酸_24:0	64.52	6.72	125.76	8.58	57.2	5.86

结论

使用高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-8060RX 对人血浆和血清中的 19 种游离脂肪酸进行了同时分析。所有化合物在 1 至 1000 µg/L 的范围内均获得了良好的线性关系，最低校准点处的重复性小于 10%。

延迟柱的使用能够去除来自流动相中的基质峰。通过上述分析方法，以简单的预处理流程即可提供更稳定、准确的定量分析结果。

< 参考文献 >

- 1) Takahashi H 等，过氧化物酶体增殖物激活受体 α 激动剂处理的小鼠中长链游离脂肪酸的液相色谱 - 质谱联用分析, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*[], 77, 2288–2293 (2013)。
- 2) Okada H 等，一种用于同时分析游离脂肪酸的液相色谱 - 电喷雾电离串联质谱方法的开发, *Biochem.*[], 170(3):389-397 (2021)。

岛津应用云



Nexera、Shim-pack Scepter 和 Shim-pack 是岛津制作所或其附属公司在日本和其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

※本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
※本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2024 年 10 月