

GCMS 法测定血浆中极长链脂肪酸含量

GCMS-526

摘要： 本文利用岛津气质联用仪 GCMS-QP2020 NX 建立了血浆中二十二烷酸、二十四烷酸和二十六烷酸三种极长链脂肪酸的定量方法。血浆样本中极长链脂肪酸经有机溶剂提取，甲酯化处理后进行分析，以二十一烷酸作为内标，在适当浓度范围内，目标组分线性相关系数均大于 0.997，线性关系良好；取正常人血浆样本平行处理 6 份，连续分析，组分峰面积 RSD 均不超过 4.5%；加标回收率实验中，目标组分在两个加标浓度下的平均加标回收率在 83%~89% 之间。实验结果表明：该方法结果可靠，灵敏度高，能够有效地监测血浆中 3 种极长链脂肪酸含量。

关键词： 气质联用仪 血浆 极长链脂肪酸

技术特点：

- ❖ 以 $C_{21:0}$ 为内标，建立了血浆样本中 $C_{22:0}$ 、 $C_{24:0}$ 和 $C_{26:0}$ 的内标定量方法。
- ❖ 该方法灵敏度高，重复性好，回收率稳定，能够有效检测血浆中 3 种极长链脂肪酸含量。

过氧化酶体在细胞代谢中起着重要作用。过氧化酶体组装缺陷或单一过氧化物酶体代谢紊乱与多种遗传性疾病的发生密切相关，包括 X-连锁肾上腺脑白质营养不良症 (X-ALD)、Zellweger 综合征 (ZS)、ADP-酰辅酶 A 氧化酶缺乏症 (AOx) 和单一酰基-CoA 氧化酶缺陷症 (SCAD)。X-ALD 是过氧化酶体缺陷病最常见的形式，由 ABCD1 基因突变引起，该基因编码介导摄取极长链脂肪酸的转运蛋白，导致过氧化酶体缺陷病患者积累极长链脂肪酸，所以血浆中极长链脂肪酸的浓度是诊断 X-ALD 和过氧化酶体缺陷病的

重要指标。

本文利用气相色谱质谱联用仪 GCMS-QP2020 NX 建立了血浆中三种极长链脂肪酸二十二烷酸 ($C_{22:0}$)、二十四烷酸 ($C_{24:0}$) 和二十六烷酸 ($C_{26:0}$) 的定量方法。血浆样本经有机溶剂提取，甲酯化处理后，以二十一烷酸 ($C_{21:0}$) 作为内标对血浆中 3 种极长链脂肪酸进行定量。该方法结果准确，灵敏度高，适合于血浆中极长链脂肪酸的检测，可为诊断 X-ALD 提供生化依据。

■ 实验部分

1.1 仪器

GCMS-QP2020 NX 气相色谱质谱联用仪

1.2 GCMS 分析

色谱柱：SH-I-5Sil MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm

柱温程序：150°C (1 min)_10°C /min_250°C (5 min)_10°C /min_300°C (4 min)

进样口温度：280°C

离子化方式：EI

载气控制模式：恒线速度

离子源温度：230°C

载气：氦气

色谱质谱接口温度：280°C

色谱柱流量：1.5 mL/min

检测器电压：调谐电压 +0.1 kV

进样方式：分流进样

采集模式：SIM, 特征离子见表 1

分流比：20:1

■ 样品前处理

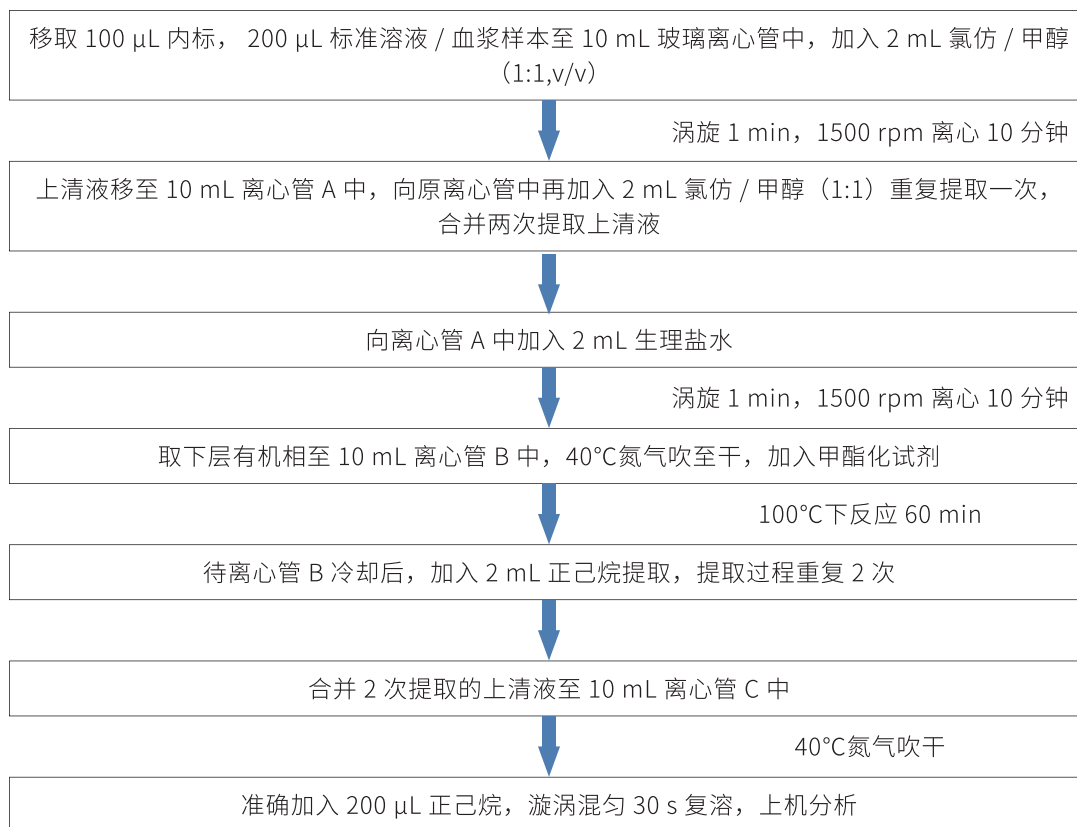


图 1 样品制备流程

■ 结果与讨论

3.1 极长链脂肪酸标准溶液谱图

极长链脂肪酸标准溶液按上述前处理过程进行制备，上机分析，谱图和化合物信息分别见图 2 和表 1。

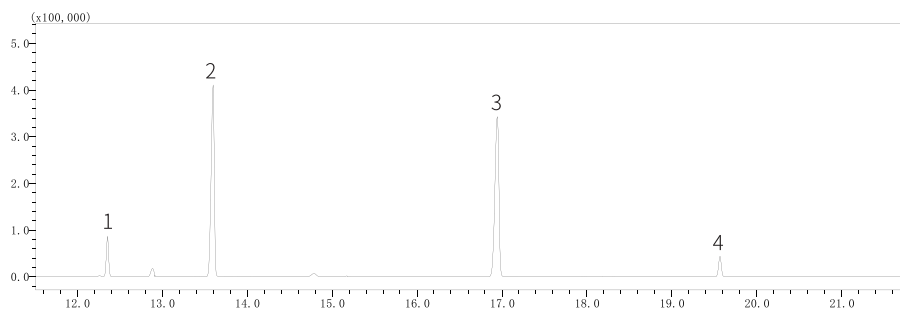


图 2 标准溶液谱图 (C_{22:0}, C_{24:0} 100 μmol/L; C_{26:0} 4 μmol/L)

表 1 化合物信息

No.	化合物名称	英文名称	简写	CAS 号	保留时间 (min)	定量离子 (m/z)	参考离子 (m/z)
1	二十一烷酸 (内标)	Heneicosanoic acid	C _{21:0}	2363-71-5	12.356	340	297、255
2	二十二烷酸	Behenic acid	C _{22:0}	112-85-6	13.596	354	311、255
3	二十四烷酸	Lignoceric acid	C _{24:0}	557-59-5	16.942	382	339、283
4	二十六烷酸	Hexacosanoic acid	C _{26:0}	506-46-7	19.566	410	311

3.2 标准曲线和检出限

以氯仿 - 甲醇 (1:1, v/v) 为溶剂, 配置 3 种目标组分标准溶液, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ 浓度分别为 10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$, $C_{26:0}$ 浓度为 0.4、0.8、1.6、2.4、3.2 $\mu\text{mol/L}$, 上机分析。以目标物与内标物浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标绘制标准曲线, 见图 3。根据标准曲线最低浓度点数据, 以 3 倍信噪比 (peak to peak) 计算 3 种目标物仪器检出限, 检出限及标准曲线线性相关系数见表 2, 质量色谱图见图 4。

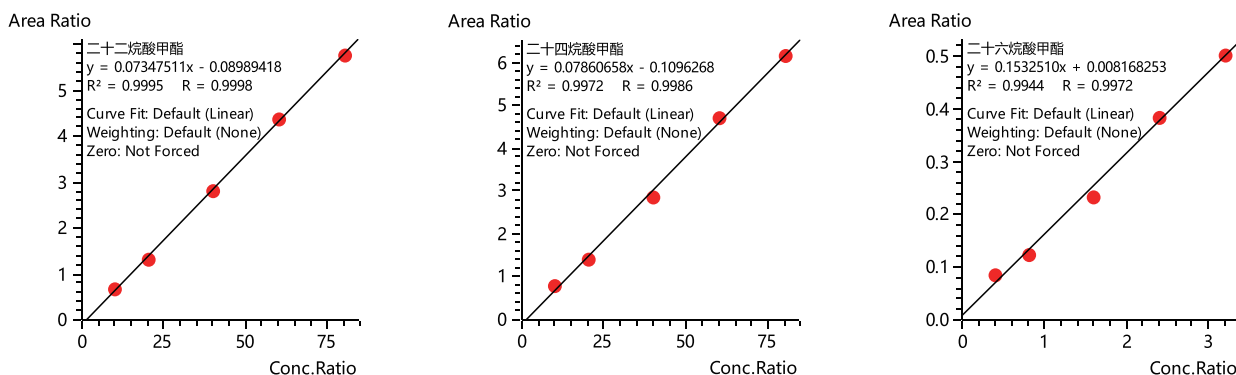


图 3 组分标准曲线

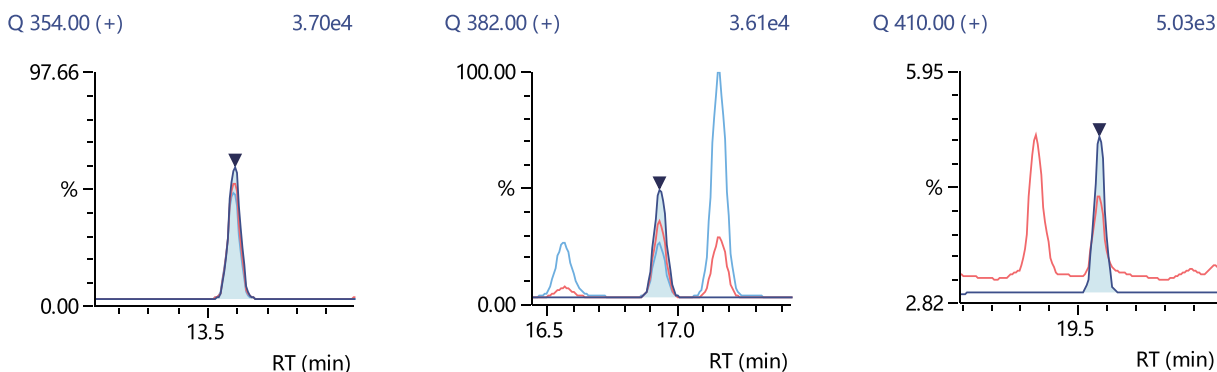


图 4 组分质量色谱图 (标准曲线最低浓度点)

表 2 组分标准曲线线性范围、线性相关系数及检出限

No.	化合物名称 (简写)	相关系数 (R)	检出限 ($\mu\text{mol/L}$)
1	$C_{22:0}$	0.9998	0.015
2	$C_{24:0}$	0.9986	0.025
3	$C_{26:0}$	0.9972	0.008

3.3 重复性实验

按上述样本前处理流程制备 $C_{22:0}$ 、 $C_{24:0}$ 浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 、 $C_{26:0}$ 浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准溶液, 连续进样 6 次考察目标物峰面积重复性, 3 种组分峰面积结果及对应 RSD 见表 3。

表 3 峰面积重复性结果

No.	化合物名称 (简写)	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD% (n=6)
1	$C_{22:0}$	106754	102937	107977	106625	106777	111765	2.65
2	$C_{24:0}$	117637	118094	117238	113657	113393	118345	1.94
3	$C_{26:0}$	11771	11406	11002	10847	10717	10883	3.63

按上述样本前处理流程，平行制备 6 份血浆样品并连续进样，考察相同血浆样本中检测 3 种组分含量的重复性，6 份样品中 $C_{22:0}$ 、 $C_{24:0}$ 、 $C_{26:0}$ 浓度及对应 RSD 见表 4。

表 4 定量结果重复性

No.	化合物名称 (简写)	血浆中化合物含量 ($\mu\text{mol/L}$)						%RSD (n=6)
		样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	
1	$C_{22:0}$	37.91	37.36	36.15	36.95	39.64	35.65	3.86
2	$C_{24:0}$	27.83	27.46	26.27	27.21	28.69	26.45	3.39
3	$C_{26:0}$	0.39	0.36	0.40	0.37	0.39	0.38	4.34

3.4 加标回收率

向血浆样本中添加目标组分标准溶液，高低两个加标浓度见表 4，按前述样品处理流程平行处理 3 份，上机分析。加标回收率详细结果见表 5，加标样品谱图见图 5。

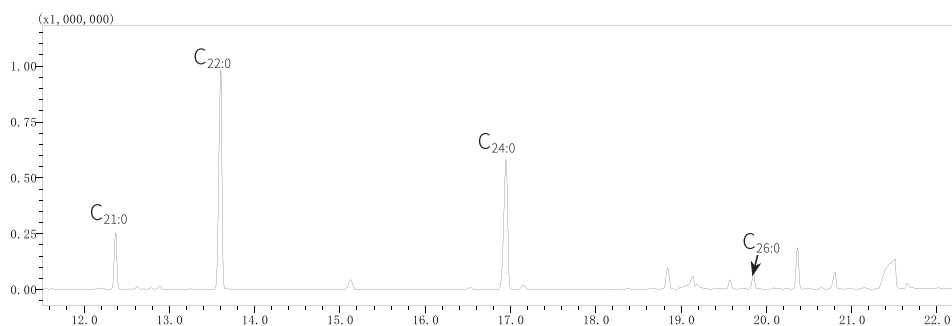
图 5 加标血浆样本谱图 ($C_{22:0}$ 、 $C_{24:0}$ 加标浓度 $25 \mu\text{mol/L}$; $C_{26:0}$ 加标浓度 $1 \mu\text{mol/L}$)

表 5 加标回收率结果

No.	化合物名称 (简写)	加标浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 (%)			平均回收率 (%)	RSD(%)
			1	2	3		
1	$C_{22:0}$	25	81.15	86.56	83.21	83.64	3.27
		75	87.29	70.64	92.41	86.79	11.06
2	$C_{24:0}$	25	80.01	89.64	84.43	84.69	5.69
		75	89.67	74.04	86.79	83.50	9.96
3	$C_{26:0}$	1.0	80.89	93.09	80.19	84.72	8.56
		3.0	94.17	80.03	89.93	88.04	8.24

3.5 实际样品测试结果

取血浆样本，按照上述处理过程进行样品制备后上机分析。血浆中 3 种组分检出结果见表 6，血浆样本谱图见图 6。

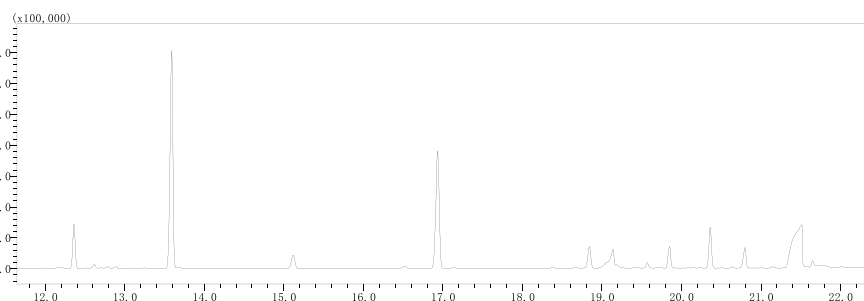


图 6 血浆样本谱图

表 6 血浆样本中目标组分检测结果

No.	含量 (μmol/L)		
	C _{22:0}	C _{24:0}	C _{26:0}
血浆 1	37.92	29.20	0.41
血浆 2	38.47	28.93	0.42

■ 结论

本文利用岛津气质联用仪 GCMS-QP2020 NX 建立了血浆中二十二烷酸、二十四烷酸和二十六烷酸三种极长链脂肪酸的定量方法。在 10~80 μmol/L 浓度范围内，二十二烷酸、二十四烷酸线性相关系数分别为 0.9998 和 0.998，在 0.4~3.2 μmol/L 浓度范围内，二十六烷酸线性相关系数为 0.9972，线性关系良好；取正常人血浆样本平行处理 6 份，连续上机分析，3 种脂肪酸峰面积 RSD 均不超过 4.5%；加标回收率实验中，依据正常人血浆中 3 种脂肪酸含量，C_{22:0}、C_{24:0}、C_{26:0} 加标浓度分别为 25、25 和 1.0 μmol/L 时，加标回收率分别为 83.64%、84.69%、84.72%；加标浓度分别为 75、75 和 3.0 μmol/L 时，对应加标回收率分别为 86.79%、83.50%、88.04%。实验结果表明：该方法抗干扰能力强，灵敏度高，结果准确，能够有效地监测血浆中 3 种极长链脂肪酸含量，检测结果为诊断 X-ALD 提供可靠的生化依据。

岛津应用云

