

## 气质联用法测定人血清游离脂肪酸

李海静, 吴胜明, 方均建, 李 昱, 马昆鹏, 宋占军, 董方霆

(国家生物医学分析中心, 北京 100850)

**摘要:** 采用气相色谱-飞行时间质谱法(GC-TOF-MS)对人血清游离脂肪酸(FFA)进行研究。以十七烷酸酯为内标, 分别利用三氟化硼-乙醚/甲醇溶液及硫酸/甲醇溶液对脂肪酸进行甲酯化处理, 正己烷萃取后, 采用 GC-TOF-MS 检测。结果表明, 样品未衍生化不能满足脂肪酸研究的需要, 衍生化后, 色谱分离在 33 min 内完成, 利用硫酸/甲醇溶液衍生化可得到约 20 种  $C_{12} \sim C_{24}$  脂肪酸的理想分离。建立了人血清 FFA 的气质联用分析法, 为脂肪酸相关性疾病的研究提供了新的简洁、快速、高效、安全的方法, 并可获得大信息量的技术支持。

**关键词:** 游离脂肪酸(FFAs); 人血清; 气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOF-MS); 衍生化

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)02-83-05

## Determination of Free Fatty Acids in Human Serum by GC-TOF-MS

LI Hai-jing, WU Sheng-ming, FANG Jun-jian, LI Yu, MA Kun-peng,  
SONG Zhan-jun, DONG Fang-ting

(National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)

**Abstract:** A modified method for determination of free fatty acids (FFAs) in human serum was established by gas chromatography time-of flight mass spectrometry (GC-TOF-MS). Heptadecanoic acid methyl ester was selected as internal standard. After derivatization by 2.5%  $H_2SO_4/CH_3OH$ , the FFAs in serum were transformed into the fatty acid methyl esters, and *N*-hexane was added to extract the products. The analysis of extract was performed by GC-TOF-MS. Better results were obtained with derivatization comparing with non-derivatization. At least 20 kinds of FFAs ( $C_{12}-C_{24}$ ) in human serum are determined by the modified method. The analysis is completed within 33 min. The modified method shows potential useful for the scientific research to the disease correlating FFAs and lipodomics due to the simplify, rapidity, high accuracy and enormous information.

**Key words:** free fatty acids(FFAs); human serum; gas chromatography time-of flight mass spectrometry (GC-TOF-MS); derivatization

游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)是指非酯化的脂肪酸或未脂化的脂肪酸。血清中的 FFAs 代谢活性极高, 极易受脂肪代谢、糖代谢

及内分泌代谢的影响。随着研究的深入和技术的不断进步, 血清 FFAs 与疾病的关系逐渐明晰, FFAs 已被证实与心脑血管<sup>[1]</sup>、呼吸、消化、

内分泌、免疫等系统疾病的发生发展,以及肿瘤和创伤性应激等<sup>[2-4]</sup>的能量代谢关系密切。尤其是多不饱和脂肪酸,已成为脂肪酸相关性研究的焦点。因此,人体血清 FFAs 的定性、定量及快速测定,对医学基础研究及临床检验均具有重要的意义。对血清 FFAs 谱的综合分析将有助于深入揭示不同脂肪酸之间的相关性,进一步阐明脂肪酸与疾病预防和治疗的关系,为寻找潜在的异常代谢途径或致病机制提供科学依据。

本研究对人血清 FFAs 提取及衍生化方法进行筛选和优化。

## 1 试验部分

### 1.1 主要仪器与装置

气相色谱-飞行时间质谱仪(GC-TOF-MS);美国 Waters 公司产品;DB-5MS 柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);Masslynx 4.0 数据处理系统;英国 Micromass 公司产品;Nist 02 数据库。

### 1.2 主要试剂

十七烷酸酯对照品:由中国药品生物制品检定所提供;三氟化硼-乙醚溶液:Fluka 公司产品;甲醇、正己烷(色谱纯):Merck 公司产品;其他试剂均为国产分析纯;所有实验用水均取自 Milli-Q 系统。

### 1.3 试验条件

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱:DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm);升温程序:柱初温 50 °C,以 30 °C·min<sup>-1</sup>升温至 160 °C,保持 1 min,以 4 °C·min<sup>-1</sup>升温至 240 °C,保持 1 min;以 30 °C·min<sup>-1</sup>升温至 280 °C,保持 3 min;进样温度 260 °C;载气为 He;柱流量(恒流):1 mL·min<sup>-1</sup>;进样量 0.3 μL。

**1.3.2 质谱条件** 电子轰击(EI)离子源,电子能量 70 eV,传输线温度 250 °C,离子源温度 220 °C,电离方式 EI<sup>+</sup>,质量扫描范围  $m/z$  50~800。

### 1.4 样品前处理

**1.4.1 未衍生化** 取 200 μL 正常人血清,加入 16 μL 内标十七烷酸酯甲醇溶液(1 g·L<sup>-1</sup>),混匀,然后加入 400 μL 氯仿和 800 μL 甲醇,振荡 2 min,再加入 400 μL 氯仿,振荡 30 s,最后加入 400 μL 水,振荡 30 s,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取下层氯仿,氮气吹干,用 40 μL 甲醇溶解后进样分析。

**1.4.2 三氟化硼-乙醚/甲醇衍生化** 取 200 μL 正常人血清,加入 16 μL 内标十七烷酸酯甲醇溶液(1 g·L<sup>-1</sup>),混匀,加入 800 μL 甲醇,充分混匀,再加入 1.6 mL 氯仿,振荡混匀后,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取下层萃取液,40 °C 氮气吹干,残渣加入 400 μL V(三氟化硼-乙醚):V(甲醇)=3:1 的溶液,75 °C 水浴加热 30 min,取出放至室温下冷却,加入 200 μL 水和 600 μL 正己烷,振荡混匀,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,取上层正己烷,氮气吹干,用 40 μL 甲醇溶解后进样分析。

**1.4.3 硫酸/甲醇衍生化** 取 200 μL 正常人血清,加入 16 μL 内标十七烷酸酯甲醇溶液(1 g·L<sup>-1</sup>),混匀,加入 1 mL 2.5% 硫酸/甲醇溶液,80 °C 水浴加热 90 min,取出放至室温下冷却,加 1.5 mL 0.9% NaCl 溶液和 1 mL 正己烷,振荡混匀,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,取上层正己烷,氮气吹干,40 μL 正己烷复溶进样。

### 1.5 对照品溶液的配制

精密称取 1 mg 十七烷酸酯对照品,以甲醇配制成 1 g·L<sup>-1</sup>的对照品储备液,待用。

## 2 结果与讨论

用上述样品的处理方法及检测条件分别分析空白对照,标准溶液(图 1a、1b)及样品提取液(图 1c、1d、1e)。由结果可知:十七烷酸酯在 18.7 min 出峰;脂肪酸酯的混合标准品可检测到 31 种脂肪酸酯(图 1b,具体的脂肪酸酯列于表 1);不经衍生化时,可检测到的脂肪酸数量很少,不适合脂肪酸谱的分析,尤其是对于以此为基础的脂质组学研究,更显得价值不大。实验表明,对样品进行酯化处理是必要的。

由图 1d、1e 可知,三氟化硼-乙醚/甲醇溶液和硫酸/甲醇溶液作为衍生化试剂时,均可得到较多的脂肪酸类物质信息,包括 C<sub>12</sub>~C<sub>24</sub> 的多种饱和及不饱和脂肪酸(具体的脂肪酸列于表 2)。这 2 种方法所得的脂肪酸种类未见有明显差别,但三氟化硼-乙醚/甲醇溶液衍生化步骤较多,脂肪酸损失严重,回收率较低(列于表 3)。相比较而言,硫酸/甲醇衍生化可满足脂肪酸谱分析所要求的信息量大、高效、低毒、操作简单等各项要求。

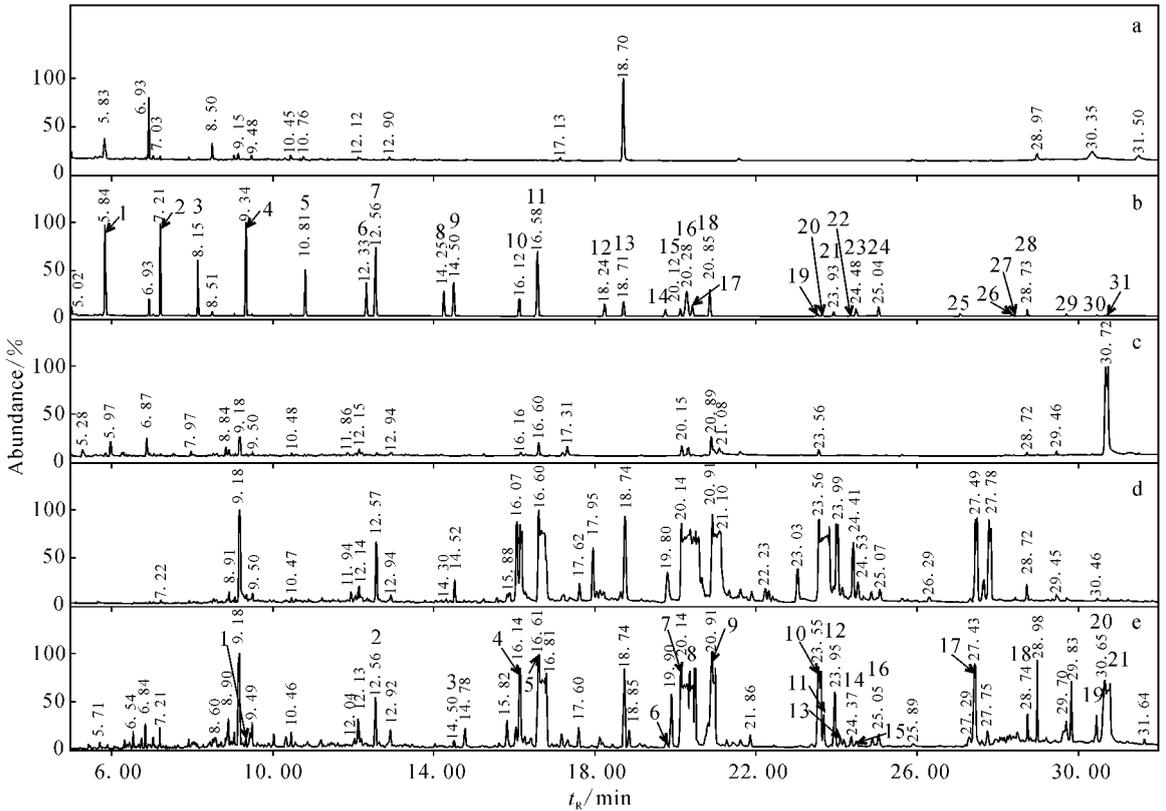


图 1 标准溶液及人血清总离子流色谱图

a. 十七烷酸甲酯溶液; b. 脂肪酸甲酯混合标准溶液(表 1); c. 未衍生化的人血清脂肪酸;  
d. 三氟化硼-乙醚/甲醇衍生化的人血清脂肪酸; e. 硫酸/甲醇衍生化的人血清脂肪酸(表 2)

Fig. 1 TIC of the standard solution of the fatty acid methyl ester and human serum

a. heptadecanoic acid methyl ester solution; b. the mixture standard solution of the fatty acid methyl esters(table 1);  
c. the FFAs of non-derivatization human serum; d. the FFAs of derivatization human serum by boron trifluoride-diethyl ether/methanol; e. the FFAs of derivatization human serum by  $H_2SO_4/CH_3OH$ (table 2)

表 1 图 1b 各谱峰所示脂肪酸甲酯列表

Table 1 31 fatty acid methyl esters in the mixture standard solution(fig. 1b)

峰序号	名称	峰序号	名称
1	辛酸甲酯( $C_8:0$ )	17	反油酸甲酯( $C_{18:1}$ )
2	癸酸甲酯( $C_{10:0}$ )	18	硬脂酸甲酯( $C_{18:0}$ )
3	十一酸甲酯( $C_{11:0}$ )	19	花生四烯酸甲酯( $C_{20:4}$ )
4	月桂酸甲酯( $C_{12:0}$ )	20	顺-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸甲酯( $C_{20:5}$ )
5	十三酸甲酯( $C_{13:0}$ )	21	顺-8,11,14-二十碳三烯酸甲酯( $C_{20:3}$ )
6	十四碳烯酸甲酯( $C_{14:1}$ )	22	顺-11,14-二十碳二烯酸甲酯( $C_{20:2}$ )
7	十四酸甲酯( $C_{14:0}$ )	23	顺-11-二十碳烯酸甲酯( $C_{20:1}$ )
8	顺-10-十五碳烯酸甲酯( $C_{15:1}$ )	24	花生酸甲酯( $C_{20:0}$ )
9	十五酸甲酯( $C_{15:0}$ )	25	二十一酸甲酯( $C_{21:0}$ )
10	棕榈油酸甲酯( $C_{16:1}$ )	26	顺-13,16-二十二碳二烯酸甲酯( $C_{22:2}$ )
11	棕榈酸甲酯( $C_{16:0}$ )	27	芥酸甲酯( $C_{22:1}$ )
12	顺-10-十七碳烯酸甲酯( $C_{17:1}$ )	28	山萘酸甲酯( $C_{22:0}$ )
13	十七酸甲酯( $C_{17:0}$ )	29	二十三酸甲酯( $C_{23:0}$ )
14	$\gamma$ -亚麻酸甲酯( $C_{18:3}$ )	30	二十四烯酸甲酯( $C_{24:1}$ )
15	亚油酸甲酯( $C_{18:2}$ )	31	二十四酸甲酯( $C_{24:0}$ )
16	油酸甲酯( $C_{18:1}$ )		

表 2 图 1e 各谱峰所示脂肪酸及胆固醇列表

Table 2 Component analysis of the derivatization human serum by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>OH (fig. 1e)

峰序号	名称	峰序号	名称
1	月桂酸甲酯 (C <sub>12:0</sub> )	12	顺-8,11,14-二十碳三烯酸甲酯 (C <sub>20:3</sub> )
2	十四酸甲酯 (C <sub>14:0</sub> )	13	9,12,15-十八碳三烯酸 (C <sub>18:3</sub> )
3	十五酸甲酯 (C <sub>15:0</sub> )	14	顺-11,14-二十碳二烯酸甲酯 (C <sub>20:2</sub> )
4	棕榈油酸甲酯 (C <sub>16:1</sub> )	15	顺-11-二十碳烯酸甲酯 (C <sub>20:1</sub> )
5	棕榈酸甲酯 (C <sub>16:0</sub> )	16	花生酸甲酯 (C <sub>20:0</sub> )
6	<i>n</i> -亚麻酸甲酯 (C <sub>18:3</sub> )	17	4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸 (C <sub>22:6</sub> )
7	亚油酸甲酯 (C <sub>18:2</sub> )	18	山嵛酸甲酯 (C <sub>22:0</sub> )
8	油酸甲酯 (C <sub>18:1</sub> )	19	二十四烯酸甲酯 (C <sub>24:1</sub> )
9	硬脂酸甲酯 (C <sub>18:0</sub> )	20	胆固醇
10	花生四烯酸甲酯 (C <sub>20:4</sub> )	21	二十四烷酸 (C <sub>24:0</sub> )
11	顺-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸甲酯 (C <sub>20:5</sub> )		

表 3 三氟化硼-乙醚/甲醇衍生化法与硫酸/甲醇衍生化法比较

Table 3 Comparison of boron trifluoride-diethyl ether/methanol derivatization and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>OH derivatization

方法	内标浓度	回收率			平均值
		1	2	3	
三氟化硼-乙醚/甲醇	低	30.7	29.8	31.1	30.53
	中	33.4	31.9	28.6	31.3
	高	31.1	28.6	27.9	29.2
硫酸/甲醇	低	78.9	81.3	82.4	80.87
	中	82.3	84.1	80.6	82.33
	高	76.4	79.3	81.7	79.13

### 3 结论

血清中 FFAs 作为评价机体脂肪酸摄入和能量代谢的重要指标,在健康状态下处于相对平衡状态。一旦机体患病而致某个系统功能紊乱,血清脂肪酸的相对平衡将被打破,其组成也将发生改变<sup>[5]</sup>。也就是说,发生改变的可能不只一种或一个类别的脂肪酸,初始改变的脂肪酸也可能在疾病进程中引起其他脂类物质的变化。因此,对血清 FFAs 谱进行全面、系统、多层次的综合分析至关重要。目前临床上检测 FFAs 的方法不但繁琐,而且只能得到血清总脂肪酸的信息。自 20 世纪 50 年代以来,色谱法<sup>[6]</sup>逐渐被应用到 FFAs 的检测中,此后,色谱联用法<sup>[7-8]</sup>也得到了前所未有的发展,其在血清 FFAs 研究中也凸显出独特优势。根据研究经验,要想及时得到相对全面、稳定、准确的脂肪酸信息,从血清中提取脂肪酸类物质并进行准确检测是最关键的步骤。从本研究结果可见,如果不经过衍生化,所得的脂肪酸信息非常少,不能满足脂肪酸谱的分析要求。利用三氟化硼-乙醚/甲醇溶液衍生化,虽可得到较多信息,但步骤繁琐、操作复杂、加标回收率较低;而三氟化硼-乙醚溶液毒性较强,易于挥发,在加热时还易变成毒性更大的氟化氢等有害

物质,因此其操作和劳动保护要求均较高,故不推荐作为脂肪酸酯化的衍生化试剂。硫酸/甲醇溶液作为衍生化试剂,不但毒性小,而且可得到比较全面的脂肪酸及胆固醇的相关信息;同时它还具有步骤少、操作简单、提取回收率相对高的优点,因此更适合快速、准确的脂肪酸谱分析。

综上所述,以硫酸/甲醇为衍生化试剂的人血清脂肪酸谱 GC-TOF-MS 检测方法具有样品分析迅速、准确度好、操作简单、信息量大、安全低毒等特点,为人类相关疾病的脂肪酸谱分析提供了一种可靠、安全、高效的方法。

### 参考文献:

- [1] WANG S, MA A, SONG S, et al. Fasting serum free fatty acid composition, waist/hip ratio and insulin activity in essential hypertensive patients[J]. *Hypertens Res*, 2008, 31(4): 623-632.
- [2] CANTOR W J, KIM H H, JOLLY S, et al. B-type natriuretic peptide and serum unbound free fatty acid levels after contemporary percutaneous coronary intervention [J]. *J Invasive Cardiol*, 2008, 20(4): 186-188.
- [3] 应珊红, 栾 霞, 安友仲. 气相色谱法测定手术前后人体血浆中游离脂肪酸含量的变化[J]. 现代仪

器, 2000, (3): 30-33.

- [4] PUIG T, VÁZQUEZ-MARTÍN A, RELAT J, et al. Fatty acid metabolism in breast cancer cells; differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109(3): 471-479.
- [5] BAHRAMI G, GHANBARIAN E, MASOUMI M, et al. Comparison of fatty acid profiles of aorta and internal mammary arteries in patients with coronary artery disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 370(1/2):143-146.
- [6] BONDIA-PONS I, MOLTÓ-PUIGMARTÍC, CASTELLOTE A I, et al. Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chro-

matography[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1 157(1/2): 422-429.

- [7] AKOTO L, VREULS R J, IRT H, et al. Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1 186(1/2): 365-371.
- [8] OGISO H, SUZUKI T, TAGUCHI R. Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine[J]. *Anal Biochem*, 2008, 375(1): 124-131.

## 《质谱学报》投稿须知

- 文稿务求论点明确, 文字简练, 数据可靠。
- 文题简明(20个汉字以内);中英文摘要须包括题目、作者姓名、作者单位、城市名、省名和邮政编码,并写成叙述性文摘(含有研究目的、方法、结果和结论);关键词为3~5个。
- 文稿应采用阿拉伯数字进行分级编号,最多可用4级。引言不编号,也不写“引言”字样。
- 基金项目名称及项目编号、作者简介(第1作者姓名(出生年~)、性别(民族,汉族省略)、籍贯、职称、学位、从事专业)需在首页以页下注形式写明。
- 文稿中外文字母、符号须分清大、小写;上下角的字母、数码和符号等位置的高低应区别明显;易混淆的外文字母、符号在第1次出现时用铅笔(电子版用红色)注明文种。
- 文稿中的数据不能同时以表和图表述,只能选择其一;采用法定计量单位,物理量用法定量符号表示,不得用废弃的物理量,例如压强的单位用帕斯卡(Pa),不要用bar或者torr表示;在图和表中用量与单位的比值表示数值,即量与单位之间用除号“/”相隔,如t/min;正文中插图下要写明中英文图号、图题和图注。
- 参考文献须按《文后参考文献著录规则》著录,文稿中参考文献不得少于15篇。请将参考文献原文的电子版以压缩文件的格式作为附件在投稿的同时上传。
- 欢迎登录网站投稿,网址<http://www.jcmss.com.cn>。
- 来稿须附作者单位(学术委员会或业务部门)对文稿内容的学术性、真实性,作者署名是否准确以及内容有无保密问题的审查证明和版权转让协议书,以上两项均可在网站的下载中心下载。
- 收稿后本刊立即向作者发送收稿通知单;若待审处理时间超过3个月不予回复,作者可改投它刊;退稿稿逾期半年不修回者,本刊即作自动退稿处理;录用稿一经排版,作者要求退稿需部分补偿编辑部经济损失。
- 来稿一经刊登,本刊将按规定酌致稿酬,并赠作者当期《质谱学报》2册。本刊已纳入重庆维普、《中国学术期刊(光盘版)》、《方正Apabi电子期刊》、《中文科技期刊数据库》、《CEPS中文电子期刊服务》、《书生数字期刊》和入网“万方数据——数字化期刊群”等数据库,本刊所付稿酬包含上述几项报酬。
- 请勿一稿两投。

欢迎您投稿到《质谱学报》!