

## 论著·基础研究

## 基于异丁酯化的脂肪酸 GC-FID/MS 定量分析研究

干渺妍<sup>1</sup>, 谢 晖<sup>2</sup>, 唐惠儒<sup>1,2</sup>

1. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 2. 复旦大学人类表型组研究院, 上海 201203

**[摘要]** **目的**·探究生理病理状态下脂肪酸的种类及含量变化, 建立该类代谢物的定量分析技术。**方法**·基于 (–)- 氯甲酸薄荷酯与异丁醇作为衍生化试剂的脂肪酸异丁酯化方法, 采用气相色谱-氢火焰离子化检测器/质谱联用技术 (gas chromatography-flame ionization detector/mass spectrometry, GC-FID/MS) 对 27 种代表性脂肪酸进行定性定量分析。通过测量检测限、定量限、日内和日间相对标准偏差检验方法的灵敏度及稳定性。同时, 将该方法应用于 4 类典型生物样本 (人类血清、尿液、粪便及大鼠肝脏), 以验证其在不同基质中的普适性。**结果**·27 种脂肪酸的异丁酯可在 HP-5MS 色谱柱上实现分离, 在 2 ~ 3 个数量级范围内线性良好 ( $R^2 > 0.99$ ) 且具有优异的灵敏度 (检测限为柱上 0.03 ~ 2.96 pmol, 定量限为 0.09 ~ 9.86 pmol)。方法学验证结果显示, 该方法在高、中、低 3 个浓度范围内的日内及日间相对标准偏差均小于 10%。在 4 类典型生物样本中, 该方法分别检测并定量出 10、7、14、9 种脂肪酸。**结论**·建立了基于异丁酯化并能够在水溶液中的短、中、长链脂肪酸 (C1 ~ C24) 同步定量的分析方法。该方法的条件温和、灵敏度高且稳定性好, 操作简便快捷, 可直接用于血清、尿液、粪便及肝脏等多种生物样本的检测, 其或将为高通量代谢组分析提供新的思路。

**[关键词]** 脂肪酸; 异丁酯化; 代谢组学; 气相色谱-氢火焰离子化检测器/质谱联用技术

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.01.004 **[中图分类号]** O657.63 **[文献标志码]** A

## Fatty acid quantification method by isobutyl esterification and GC-FID/MS

GAN Miao-yan<sup>1</sup>, XIE Hui<sup>2</sup>, TANG Hui-ru<sup>1,2</sup>

1. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Fudan University Human Phenome Institute, Shanghai 201203, China

**[Abstract]** **Objective**·To establish a quantification method for understanding the varieties and concentrational changes of fatty acids under physiological and pathophysiological conditions. **Methods**·Based on isobutyl esterification using (–)-menthyl chloroformate and isobutanol, 27 typical fatty acids were qualitatively and quantitatively analyzed by gas chromatography-flame ionization detector/mass spectrometry (GC-FID/MS). The sensitivity and stability of the method were detected by limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and intra-day and inter-day relative standard deviation (RSD). The method was applied to four typical biological samples (human serum, urine, feces and rat liver) to verify the universality in different substrates. **Results**·Isobutyl esters of 27 fatty acids were effectively separated with an HP-5MS column. The results showed nice linearity within 2–3 orders of magnitude in terms of concentration with  $R^2 > 0.99$  for all 27 tested fatty acids. The LODs of the method were between 0.03 and 2.96 pmol on column whereas the LOQs were between 0.09 and 9.86 pmol. The results of method validation showed that the intra-day and inter-day RSDs were all under 10% in the range of high, medium and low concentrations. With this method, moreover, 10, 7, 14 and 9 fatty acids were detected in human serum, urine, feces and rat liver, respectively. **Conclusion**·A quantitative analytical method for fatty acids with short, media and long chains (C1–C24) is established based on isobutyl estrification in aqueous media. This method has the advantages of mild condition, high sensitivity, good stability, and simple and quick operation, and can be directly used in the detection of serum, urine, feces, liver and other biological samples, which may provide a new idea for high-throughput metabolome analysis.

**[Key words]** fatty acid; isobutyl esterification; metabolomics; gas chromatography-flame ionization detector/mass spectrometry (GC-FID/MS)

脂肪酸是生物体内重要的能量<sup>[1-2]</sup>和结构物质, 可通过代谢转化为三磷酸腺苷为心肌和肝脏等组织提供能量<sup>[3]</sup>, 也可用于合成磷脂、激素及酮体等具有生理功能的物质。研究显示, 脂肪酸代谢失调会导致炎症<sup>[4]</sup>、肿瘤<sup>[5-6]</sup>及心血管疾

程的变化具有重要意义<sup>[8-12]</sup>。基于脂肪酸所含碳数的不同, 其可被分为短链 (C1 ~ C6)、中链 (C8 ~ C12) 和长链 (C16 ~ C26) 脂肪酸。目前, 对其进行同步定量是代谢组学分析及生理与病理生理机制研究中亟待解决的问题。

脂肪酸的定量分析主要包括核磁共振波谱法 (nuclear

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81590953)。

**[作者简介]** 干渺妍 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: 16210700066@fudan.edu.cn。

**[通信作者]** 唐惠儒, 电子信箱: huiru\_tang@fudan.edu.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81590953).

**[Corresponding Author]** TANG Hui-ru, E-mail: huiru\_tang@fudan.edu.cn.



magnetic resonance, NMR)<sup>[13-14]</sup>、气相色谱-氢火焰离子化检测器/质谱联用技术 (gas chromatography-flame ionization detector/mass spectrometry, GC-FID/MS)<sup>[15]</sup> 及液相色谱-质谱联用技术 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 等<sup>[16-17]</sup>。其中, GC-FID/MS 将气相色谱稳定分离的优势与 FID 及质谱的高灵敏度检测相结合, 成为了脂肪酸的定量分析的一种重要方法。该技术具有良好的重现性和线性动态范围<sup>[18]</sup>, 拥有商业化的标准质谱库, 可以辅助对未知物的定性。气相色谱分离要求待测物具有良好的挥发性及热稳定性, 而脂肪酸由于含有极性官能团羧基且链长不同使得其物理化学性质差异较大, 因此常需先对其进行化学衍生化处理。目前, 脂肪酸的衍生化方法主要有三甲基硅烷化<sup>[19-22]</sup>及甲酯化<sup>[23-25]</sup>。其中, 前者常用的试剂是 N, O-双三甲基硅基三氟乙酰胺和 N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺。上述 2 种试剂极易水解, 因此在衍生化前要求样本行干燥处理, 同时衍生化过程须在无水条件下进行; 而该种操作使样品在前处理时较为繁杂、耗时, 且易导致分析对象 (即代谢物) 发生损失。甲酯化法被广泛用于中长链脂肪酸的定量分析, 但这种方法衍生化耗时较长, 且应用于短链脂肪酸产生的甲酯化产物易挥发, 因此甲酯化法不适合对短、中、长链脂肪酸进行同步定量分析。

针对上述问题, 本文利用 GC-FID/MS 中的 FID 与质谱同步检测, 并通过对脂肪酸进行异丁酯化建立一种简便快速、条件温和且可对水相介质中短、中、长链脂肪酸进行同步定量分析的方法; 同时, 使用 27 种脂肪酸对该方法进行验证, 并通过将该方法应用于血清、尿液、粪便、肝脏等典型的常见生物样本以验证其基质普适性, 从而为生理及病理生理过程中脂肪酸的变化规律及其功能研究提供新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

本实验所用试剂均购自商业化产品来源而未经任何纯化。异丁醇购自上海化学试剂研究所有限公司, 色谱纯正己烷购自美国 Merck 公司, 无水硫酸钠购自上海大化学产品有限公司, (-)-氯甲酸薄荷酯、氢氧化钠、吡啶、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (butylated hydroxytoluene, BHT)、癸酸、十六烷酸、十八烷酸、二十烷酸、芥酸、二十二烷酸、二十四烷酸均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 甲酸、丙酸、异丁酸、新戊酸、丁酸、2-甲基丁酸、异戊酸、戊酸、2-乙基丁酸、异己酸、己酸、庚酸、正辛酸、十四烷酸、亚油酸、油酸、亚麻酸均购自阿拉丁试剂 (上海) 有

限公司, 十二烷酸购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司, 4-甲基己酸购自加拿大 TRC 公司, 乙酸购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。上述脂肪酸样品分别用水配制成已知浓度的标准溶液, 并密封贮存待检。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 脂肪酸的异丁酯化** 本研究采用异丁酯化的方法对标准溶液或生物样本进行衍生化处理, 具体操作如下: 取 100  $\mu\text{L}$  标准溶液于离心管中, 加入 130  $\mu\text{L}$  氢氧化钠水溶液 (20 mmol/L)、50  $\mu\text{L}$  吡啶和 80  $\mu\text{L}$  异丁醇后涡旋震荡 10 s。加入 20  $\mu\text{L}$  (-)-氯甲酸薄荷酯涡旋震荡 30 s, 放气后再涡旋震荡 30 s。再次加入 20  $\mu\text{L}$  (-)-氯甲酸薄荷酯, 重复上述涡旋震荡步骤。完毕后, 向上述衍生化混合物加入 150  $\mu\text{L}$  正己烷并涡旋萃取 2 min,  $16\ 099\times g$  离心 5 min。取上清液, 经无水硫酸钠干燥后, 将其加入气相色谱进样瓶中检测。

**1.2.2 GC-FID/MS 检测及数据分析** 本研究使用配有 FID 的气相色谱-质谱仪 (7890B-5977A, 美国 Agilent Technologies 公司) 和 HP-5MS 色谱柱 (30 m $\times$ 250  $\mu\text{m}\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ , 美国 Agilent J&W 公司) 对衍生化后的脂肪酸进行分析。采用分流进样 (分流比为 29:1), 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。进样口温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ , 载气氦气 (纯度 >99.999%) 的流速为 1.0 mL/min。色谱柱起始温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 3 min 后以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 145  $^{\circ}\text{C}$ , 以 30  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 175  $^{\circ}\text{C}$ , 再以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 260  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 1.5 min, 最后以 30  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 310  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 3 min。FID 温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ , 氢气流速为 30 mL/min。质谱溶剂延迟时间 4.2 min, 将质量选择检测器 (mass selective detector, MSD) 传输管及电子离子化 (electron ionization, EI) 源温度设为 230  $^{\circ}\text{C}$ , 灯丝电压固定为 70 eV。质谱采集采用选择离子扫描模式 (selective ion monitoring, SIM), 检测碎片离子作为各目标物定性定量离子。使用 MassHunter 软件 (定性分析 B.06.00 版以及定量分析 B.06.00 版, 美国 Agilent Technologies 公司) 分析上述检测获得的 GC-FID/MS 数据。所有代谢物根据其保留时间及质谱碎片质荷比分布信息进行定性分析, 标准溶液中对提取的定量离子色谱峰进行积分得到定量数据。

**1.2.3 方法学验证** 本研究使用 27 种脂肪酸样品建立标准曲线并得到检测限 (limit of detection, LOD) 及定量限 (limit of quantitation, LOQ); 使用高浓度、中浓度、低浓度的样品混合溶液测量方法的日间及日内的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。通过与文献报道结果比较评估方法的灵敏度及稳定性, 具体操作如下。

本研究所用的脂肪酸样品的母液由双蒸水及 10% 异丁

醇水溶液配制而成, 其中碳数小于 6 的脂肪酸用双蒸水作为溶剂配制。研究采用逐级稀释法建立标准曲线, 将脂肪酸样品的母液稀释 1、2、4、10、20、40、100 倍后获得的 7 个浓度梯度标准溶液分别进行衍生化, 并依次进行 GC-FID/MS 分析检测。将进样的柱上摩尔数作为横坐标, 峰面积作为纵坐标得到标准曲线及其对应的线性范围。LOD 及 LOQ 分别为信噪比等于 3 和 10 时的代谢物柱上量。此外, 选用稀释 1、10 及 100 倍的 3 个浓度的标准溶液经衍生化后进行日内及日间 RSD 评估, 即将衍生化后的标准溶液置于室温, 1 d 内每间隔 8 h 检测 1 次, 计算 3 次峰面积间的 RSD 值作为日内 RSD 评价; 标准溶液在 3 d 内检测 3 次, 计算 3 次峰面积间的 RSD 值作为日间 RSD 评价, 且标准溶液在测定间隙需置于 4 °C 保存。

**1.2.4 普适性分析** 将所建方法应用于血清、尿液、粪便、肝脏等生物样本的脂肪酸进行定量分析, 以验证该方法在不同生物基质中的普适性。本研究所用血清样本来源于健康青少年 (13 岁 ~ 18 岁), 尿液样本来源于健康成年人 (25 岁), 血清和尿液样本均为已通过伦理审批的代谢组研究生物样本, 采集后储存在 -80 °C 冰箱; 实验前, 将样本梯度解冻后可直接进行衍生化处理, 通过前述建立的方法对样本中的脂肪酸进行分析。本研究使用的粪便来源于健康婴幼儿 (0 岁 ~ 3 岁), 粪便样本为已通过伦理审批的代谢组研究生物样本, 肝脏样本来源于雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠; 实验时将样本梯度解冻后称取粪便 0.042 6 g、肝脏组织 0.054 6 g, 分

别加入 500  $\mu$ L 10% 异丁醇水溶液, 采用组织破碎仪 (德国 QIAGEN 公司) 进行匀浆 (每次 20 Hz 匀浆 90 s, 间隔 60 s, 循环 3 次); 随后, 在冰浴中以 45 Hz 持续 30 s、80 Hz 持续 30 s 交替超声 10 min, 进一步提取生物样本中的代谢物; 提取后的粪便及肝脏组织经离心后, 取 100  $\mu$ L 匀浆液进行衍生化处理并使用 GC-FID/MS 对衍生化后的脂肪酸进行分析。

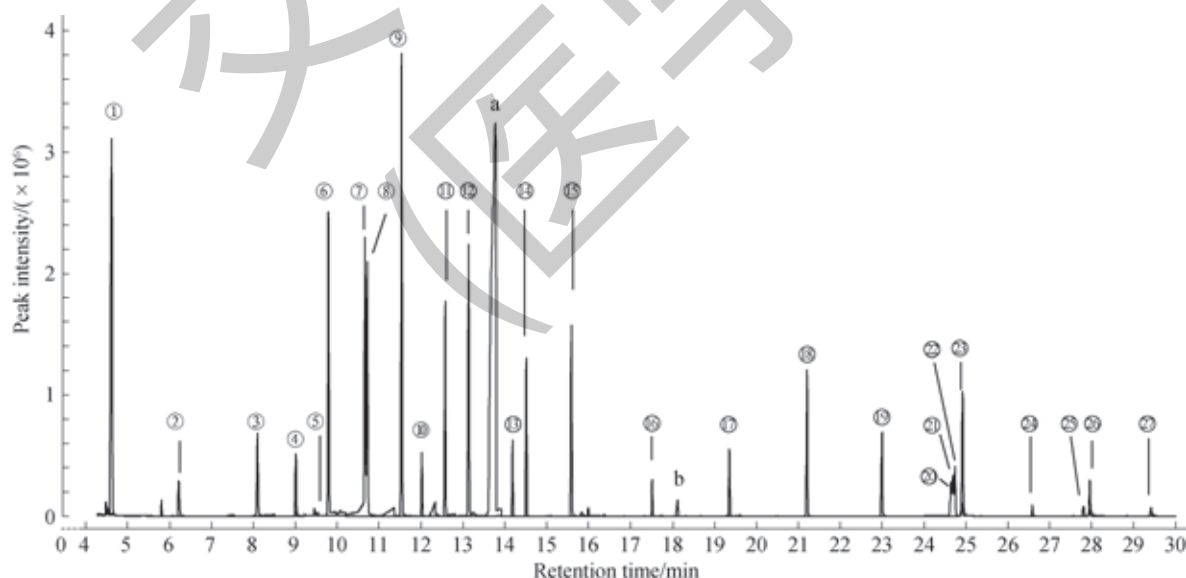
## 2 结果

### 2.1 脂肪酸的异丁酯化

脂肪酸异丁酯化的反应原理已在文献<sup>[26]</sup>中报道。本研究通过优化衍生化过程中的试剂用量、时间、处理方法等参数, 建立了 27 种脂肪酸的异丁酯化方法。该反应可直接在水相中进行, 常温下涡旋震荡 1 min 即可完成衍生化, 且衍生化产物较稳定。

### 2.2 GC-FID/MS 检测

本研究在文献<sup>[27]</sup>报道的升温程序基础上, 结合不同链长脂肪酸异丁酯的性质, 优化确定了分析的升温梯度及分流比等色谱分离参数。结果 (图 1) 显示, 使用 (-)-氯甲酸薄荷酯与异丁醇对 27 种脂肪酸进行衍生化后, 脂肪酸在 HP-5MS 色谱柱上可较好保留且峰型良好, 其中甲酸及乙酸也可与溶剂峰分离, 从而实现对甲酸和乙酸更准确的定性定量分析。



**Note:** ① formic acid (C1); ② acetic acid (C2); ③ propionic acid (C3); ④ isobutyric acid (2-MC3); ⑤ pivalic acid (2, 2-diMC3); ⑥ butyric acid (C4); ⑦ 2-methylbutyric acid (4-MC4); ⑧ isovaleric acid (3-MC4); ⑨ valeric acid (C5); ⑩ 2-ethylbutyric acid (2-EC4); ⑪ isohexanoic acid (4-MC5); ⑫ hexanoic acid (C6); ⑬ 4-methylhexanoic acid (4-MC6); ⑭ heptanoic acid (C7); ⑮ octanoic acid (C8); ⑯ decanoic acid (C10); ⑰ dodecanoic acid (C12:0); ⑱ tetradecanoic acid (C14:0); ⑲ hexadecanoic acid (C16:0); ⑳ linoleic acid (C18:2n6); ㉑ oleic acid (C18:1n9); ㉒ linolenic acid (C18:3n3); ㉓ octadecanoic acid (C18:0); ㉔ eicosanoic acid (C20:0); ㉕ erucic acid (C22:1n9); ㉖ docosanoic acid (C22:0); ㉗ tetracosanoic acid (C24:0). a and b were byproducts of derivatization reagent.

图 1 27 种脂肪酸异丁酯的 GC-MS 色谱图

Fig 1 GC-MS chromatogram of 27 kinds of fatty acids isobutyl esters

本研究对脂肪酸的色谱保留时间、质谱定性及定量离子进行分析, 结果(表 1)显示 27 种脂肪酸经衍生化后均具有特征质谱碎片离子及不同的保留时间, 可用于脂肪酸的定性与定量分析。各脂肪酸的定量离子为具有特征性

的且抗基质噪音干扰能力较强的质谱碎片离子, 同时各脂肪酸存在 3 ~ 4 个辅助定性离子。因此, 在复杂样本中或基质干扰严重时, 使用 SIM 进行分析可增加定量准确性。

表 1 27 种脂肪酸配制浓度及其异丁酯色谱质谱信息  
Tab 1 Concentrations of 27 kinds of fatty acids and GC-MS data for the isobutyl esters

No.	Metabolite	Formula	Concentration/(mmol · L <sup>-1</sup> )	Retention time/min	Quantitative ion/(m/z)	Qualitative ion/(m/z)
1	C1	CH <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	66.26	4.62	60	41, 43, 56, 60
2	C2	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	43.66	6.22	56	43, 56, 73
3	C3	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	16.75	8.10	56	41, 56, 75, 87
4	2-MC3	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	26.95	9.02	43	43, 89, 101
5	2, 2-diMC3	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	2.57	9.54	85	57, 79, 85, 103
6	C4	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	27.35	9.80	71	43, 71, 89, 101
7	2-MC4	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	22.92	10.67	85	41, 57, 85, 103
8	3-MC4	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	2.26	10.73	85	56, 57, 85, 103
9	C5	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	22.99	11.54	85	56, 57, 85, 103
10	2-EC4	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	1.98	12.02	99	71, 88, 99, 117
11	4-MC5	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	1.99	12.58	99	56, 81, 99, 117
12	C6	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	19.87	13.14	99	56, 71, 99, 117
13	4-MC6	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	1.18	14.19	113	101, 113, 131
14	C7	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	4.41	14.52	113	60, 101, 113, 131
15	C8	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	3.94	15.59	127	57, 127, 145
16	C10	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	4.50	17.52	155	56, 129, 155, 173
17	C12:0	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	4.16	19.36	183	56, 57, 183, 201
18	C14:0	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	2.41	21.19	211	129, 211, 228, 229
19	C16:0	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	1.82	22.98	257	129, 239, 256, 257
20	C18:2n6	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub>	43.23	24.65	279	67, 263, 279, 336
21	C18:1n9	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub>	42.68	24.69	265	57, 97, 264, 265
22	C18:3n3	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	44.33	24.74	261	79, 95, 261, 334
23	C18:0	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub>	15.57	24.90	285	267, 284, 285, 340
24	C20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	8.91	26.58	313	295, 312, 313, 368
25	C22:1n9	C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> O <sub>2</sub>	9.82	27.81	321	57, 97, 320, 321
26	C22:0	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> O <sub>2</sub>	0.79	27.95	323	323, 340, 341, 396
27	C24:0	C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub>	0.44	29.41	368	57, 368, 369, 424

2.3 方法学验证

本研究使用 27 种脂肪酸进行定量分析方法的验证, 主要包括线性范围、线性回归方程、LOD、LOQ、日内及日间 RSD。结果(表 2)表明, 在使用质谱的 SIM 时, 27 种脂肪酸在 2 ~ 3 个数量级浓度范围内的线性方程 R<sup>2</sup> 值均可达 0.99, 其 LOD 在柱上 0.03 ~ 2.96 pmol 之间, LOQ 在 0.09 ~ 9.86 pmol 之间, 与文献中所述方法<sup>[28]</sup>相

似。同时, 使用 FID 及质谱检测器 SIM 采集模式进行样品检测时发现, 大部分短链及中链脂肪酸的质谱响应优于 FID, 长链脂肪酸的 FID 检测灵敏度则高于质谱。此外, 27 种脂肪酸在低浓度、中浓度和高浓度情况下的日内及日间 RSD 均小于 10%, 说明方法具有良好的稳定性及精密度。



表 2 脂肪酸异丁酯定量方法的线性、灵敏度、精密度及稳定性分析  
Tab 2 Analysis of linearity, sensitivity, precision and stability for isobutylation-based fatty acid quantification method

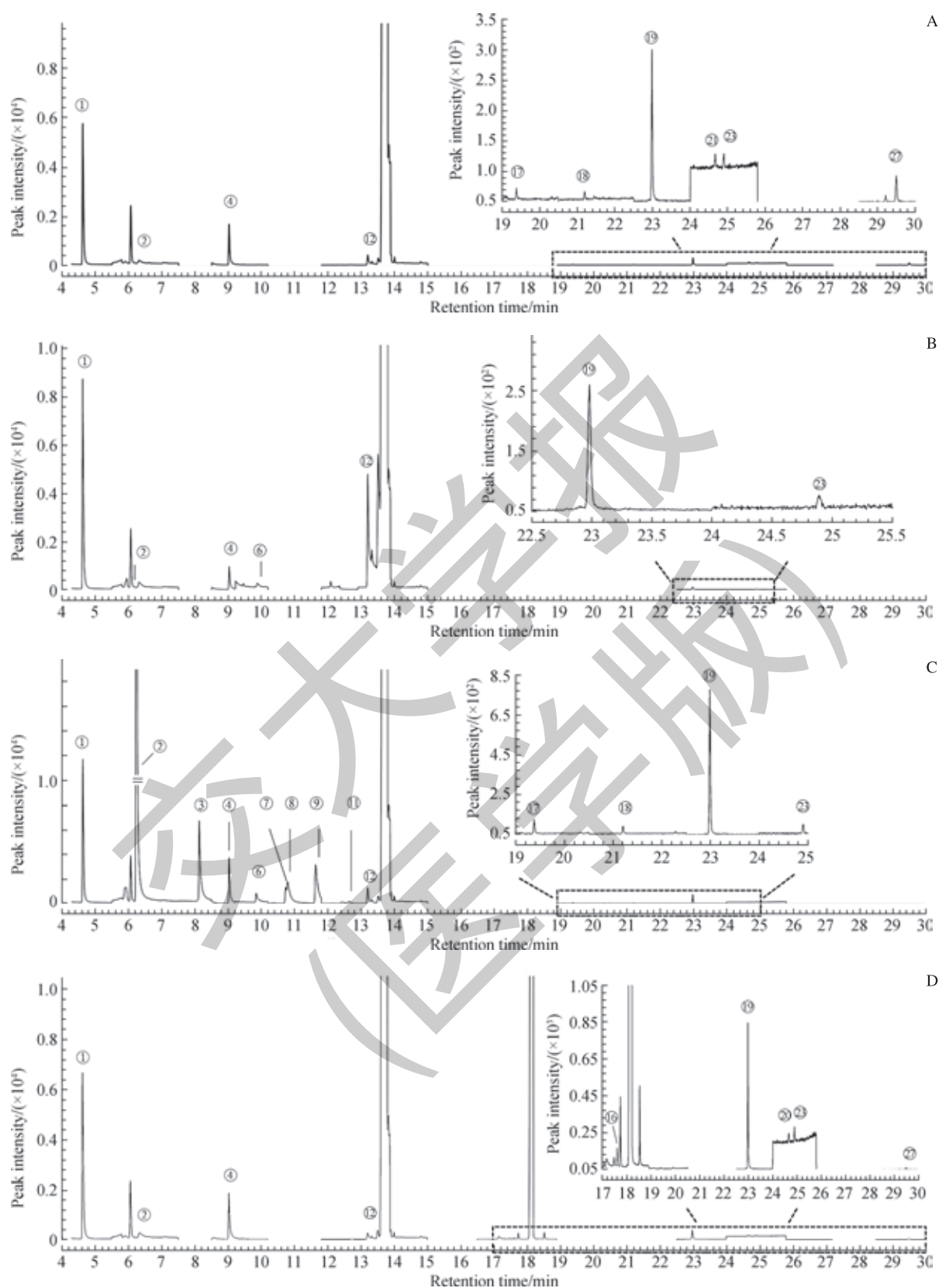
No.	Metabolite	Linear equation	$R^2$ value	Linearity range/ pmol	LOD/pmol	LOQ/pmol	Intra-day RSD/%			Inter-day RSD/%		
							$C_L$	$C_M$	$C_H$	$C_L$	$C_M$	$C_H$
1	C1	$y=1\ 923x+40\ 260.5$	0.993	8.03–803.21	0.80 <sup>a</sup> (0.68 <sup>b</sup> )	4.01 <sup>a</sup> (2.26 <sup>b</sup> )	4.1	4.8	1.6	4.4	2.3	4.3
2	C2	$y=275.9x-873.9$	0.998	13.23–529.24	2.96 <sup>a</sup> (4.44 <sup>b</sup> )	9.86 <sup>a</sup> (7.32 <sup>b</sup> )	5.8	5.0	3.1	1.3	0.9	1.3
3	C3	$y=989.6x+4\ 739.9$	0.998	4.06–203.05	2.03 <sup>a</sup> (5.97 <sup>b</sup> )	3.38 <sup>a</sup> (6.68 <sup>b</sup> )	2.5	3.1	1.4	4.5	2.9	2.8
4	2-MC3	$y=1\ 154.7x-24\ 431$	0.994	3.26–326.72	0.27 <sup>a</sup> (0.26 <sup>b</sup> )	0.91 <sup>a</sup> (0.85 <sup>b</sup> )	3.5	2.4	2.5	2.8	2.1	2.4
5	2, 2-diMC3	$y=105.9x+31.9$	0.995	0.62–31.20	0.62 <sup>a</sup> (2.63 <sup>b</sup> )	1.56 <sup>a</sup> (5.21 <sup>b</sup> )	3.7	2.5	1.5	3.7	3.1	1.9
6	C4	$y=2\ 729x-9\ 291.6$	0.995	8.29–331.52	1.35 <sup>a</sup> (4.63 <sup>b</sup> )	4.50 <sup>a</sup> (5.14 <sup>b</sup> )	1.4	2.6	0.2	1.6	1.2	3.4
7	2-MC4	$y=1\ 189.5x-477.2$	0.996	2.78–277.78	0.05 <sup>a</sup> (1.84 <sup>b</sup> )	0.17 <sup>a</sup> (2.30 <sup>b</sup> )	3.1	2.6	1.8	4.7	4.6	6.3
8	3-MC4	$y=1\ 668.9x+4\ 130.2$	0.993	0.27–27.45	0.08 <sup>a</sup> (3.31 <sup>b</sup> )	0.27 <sup>a</sup> (3.67 <sup>b</sup> )	2.9	2.2	0.9	4.5	3.9	4.2
9	C5	$y=3\ 185.9x-5\ 881.8$	0.996	2.79–278.61	0.05 <sup>a</sup> (1.53 <sup>b</sup> )	0.15 <sup>a</sup> (2.32 <sup>b</sup> )	3.7	2.4	2.9	5.1	3.7	4.7
10	2-EC4	$y=1\ 316.6x+1\ 537.5$	0.996	0.24–24.00	0.07 <sup>a</sup> (0.56 <sup>b</sup> )	0.24 <sup>a</sup> (0.76 <sup>b</sup> )	2.9	2.6	1.2	5.2	4.7	4.7
11	4-MC5	$y=5\ 466.2x-16\ 235.5$	0.993	0.24–24.08	0.04 <sup>a</sup> (0.43 <sup>b</sup> )	0.12 <sup>a</sup> (0.58 <sup>b</sup> )	2.5	2.2	1.9	5.2	4.8	5.5
12	C6	$y=7\ 761.4x-8\ 391.9$	0.993	2.42–240.83	1.44 <sup>a</sup> (0.64 <sup>b</sup> )	4.76 <sup>a</sup> (0.78 <sup>b</sup> )	2.2	2.5	1.6	5.2	4.5	5.3
13	4-MC6	$y=5\ 400.4x+12\ 393.3$	0.993	0.14–14.29	0.06 <sup>a</sup> (0.16 <sup>b</sup> )	0.14 <sup>a</sup> (0.29 <sup>b</sup> )	2.5	2.8	0.3	6.5	4.8	5.5
14	C7	$y=5\ 757.3x-18\ 826.8$	0.993	0.53–53.42	0.13 <sup>a</sup> (0.54 <sup>b</sup> )	0.42 <sup>a</sup> (0.65 <sup>b</sup> )	2.3	2.5	1.4	5.5	4.4	5.4
15	C8	$y=5\ 237.9x-5\ 355.2$	0.995	0.48–47.80	0.03 <sup>a</sup> (0.44 <sup>b</sup> )	0.09 <sup>a</sup> (1.44 <sup>b</sup> )	1.9	2.8	1.5	5.2	4.0	5.4
16	C10	$y=4\ 460.5x-6\ 023.6$	0.998	0.54–54.53	0.08 <sup>a</sup> (0.30 <sup>b</sup> )	0.25 <sup>a</sup> (1.00 <sup>b</sup> )	3.4	3.2	2.4	7.4	4.4	4.6
17	C12:0	$y=3\ 342.9x-6\ 136.4$	0.997	0.50–50.42	0.05 <sup>a</sup> (0.09 <sup>b</sup> )	0.18 <sup>a</sup> (0.30 <sup>b</sup> )	3.6	3.6	2.4	8.9	7.9	4.1
18	C14:0	$y=2\ 829.8x-12\ 382.5$	0.998	0.29–29.23	0.04 <sup>a</sup> (0.10 <sup>b</sup> )	0.13 <sup>a</sup> (0.37 <sup>b</sup> )	6.0	5.8	3.2	5.5	4.1	3.6
19	C16:0	$y=1\ 865.4x-11\ 973$	0.998	0.22–22.07	0.10 <sup>a</sup> (0.06 <sup>b</sup> )	0.29 <sup>a</sup> (0.22 <sup>b</sup> )	6.8	6.1	4.2	8.1	4.2	2.9
20	C18:2n6	$y=184x-3\ 288.4$	0.998	5.24–523.94	1.29 <sup>a</sup> (0.13 <sup>b</sup> )	4.27 <sup>a</sup> (0.15 <sup>b</sup> )	8.8	4.9	1.9	8.3	8.5	4.5
21	C18:1n9	$y=649.4x-2\ 298.4$	0.997	5.17–517.30	0.52 <sup>a</sup> (1.36 <sup>b</sup> )	1.71 <sup>a</sup> (1.70 <sup>b</sup> )	7.0	5.4	2.5	8.0	6.1	2.7
22	C18:3n3	$y=196.8x-1\ 967.9$	0.998	5.37–537.34	0.52 <sup>a</sup> (1.31 <sup>b</sup> )	1.73 <sup>a</sup> (1.55 <sup>b</sup> )	4.0	4.9	2.5	8.2	9.2	3.4
23	C18:0	$y=1\ 161.7x-16\ 488$	0.991	4.72–188.75	1.07 <sup>a</sup> (0.13 <sup>b</sup> )	3.55 <sup>a</sup> (0.24 <sup>b</sup> )	8.8	6.5	5.9	7.6	7.6	2.9
24	C20:0	$y=451.6x-3\ 053.5$	0.993	2.70–107.96	0.78 <sup>a</sup> (0.08 <sup>b</sup> )	2.18 <sup>a</sup> (0.33 <sup>b</sup> )	7.3	4.7	3.4	9.7	9.4	2.3
25	C22:1n9	$y=294.9x-2\ 389.8$	0.990	2.98–119.04	1.02 <sup>a</sup> (0.21 <sup>b</sup> )	2.70 <sup>a</sup> (0.40 <sup>b</sup> )	3.0	2.9	1.1	9.8	8.7	6.0
26	C22:0	$y=1\ 238.5x-230.2$	0.997	0.10–9.59	0.26 <sup>a</sup> (0.08 <sup>b</sup> )	0.85 <sup>a</sup> (0.29 <sup>b</sup> )	3.2	6.1	6.2	4.9	4.8	2.2
27	C24:0	$y=1\ 278.3x-395.1$	0.991	0.05–5.32	0.04 <sup>a</sup> (0.05 <sup>b</sup> )	0.16 <sup>a</sup> (0.17 <sup>b</sup> )	6.7	3.8	5.9	5.1	8.9	4.7

Note:  $C_L$ —low concentration;  $C_M$ —medium concentration;  $C_H$ —high concentration. <sup>a</sup>SIM detection; <sup>b</sup>FID detection.

2.4 生物样本的普适性分析

本研究以健康青少年的血清、成年人的尿液、婴幼儿的粪便及大鼠肝脏为典型生物样本，各选择 1 例就上述脂肪酸定量方法对不同基质的普适性进行验证。结果（图 2、表 3）表明，该方法在血清样本中至少可检测到 10 种脂肪酸，主要为短链及长链脂肪酸，而中链脂肪酸较少；在尿液样本中可检出 7 种脂肪酸；在粪便样本中至少可检测到 14 种脂肪酸，其中乙酸含量明显高于其他脂肪酸，这

与文献<sup>[29]</sup>报道结果相一致。此外，粪便样本中可检测到丙酸、2-甲基丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸，这些脂肪酸在其他 3 种生物样本中未检测到。大鼠肝脏样本可检测到 9 种脂肪酸。但由于选取样本量有限，上述结果并未涉及对生物学问题（如代谢物的生物学意义等）的回答，仅涉及所建方法对多种生物样本的适用性；后续在方法的具体应用中，研究者需考虑生物样本个数的重复及统计学要求。



**Note:** A. Serum sample. B. Urine sample. C. Feces sample. D. Liver sample. ① C1; ② C2; ③ C3; ④ 2-MC3; ⑤ C4; ⑥ 2-MC4; ⑦ 3-MC4; ⑧ C5; ⑨ 4-MC5; ⑩ C6; ⑪ C10; ⑫ C12:0; ⑬ C14:0; ⑭ C16:0; ⑮ C18:2n6; ⑯ C18:1n9; ⑰ C18:0; ⑱ C24:0.

图 2 4 种典型生物样本中脂肪酸的 GC-MS 谱图

Fig 2 GC-MS chromatograms of fatty acids in four typical biological samples

表 3 4 种典型生物样本中脂肪酸的含量  
Tab 3 Concentration of fatty acids in four typical biological samples

Metabolite	Serum/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Urine/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Feces/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Liver/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )
C1	389.40	735.08	12.20	4.62
C2	554.40	795.30	750.37	7.63
C3	—	—	72.04	—
2-MC3	434.78	370.43	29.35	17.50
C4	—	306.08	18.71	—
2-MC4	—	—	2.11	—
3-MC3	—	—	4.62	—
C5	—	—	3.38	—
4-MC5	—	—	3.02	—
C6	91.58	90.75	1.39	0.81
C10	—	—	—	1.04
C12:0	152.63	—	1.82	—
C14:0	361.35	—	4.26	—
C16:0	549.45	532.13	6.79	5.12
C18:2n6	—	—	—	13.54
C18:1n6	306.08	—	—	—
C18:0	1 174.80	1 172.33	13.81	10.77
C24:0	97.35	—	—	0.42

Note: “—” represented not detected.

### 3 讨论

脂肪酸是细胞的重要能量来源、结构组成成分及信号物质, 对其组成及变化规律进行定量分析是全局性认识此类代谢物在生理及病理过程中的功能的关键突破口。就传统的脂肪酸硅烷化及甲酯化分析方法而言, 其衍生化步骤繁琐、耗时, 且硅烷化分析方法必须在无水条件下进行, 干燥过程易造成代谢物的损失。为此, 本研究使用 (—)-氯甲酸薄荷酯和异丁醇作为衍生化试剂, 建立了一种基于异丁酯化的 27 种脂肪酸的 GC-FID/MS 定量分析方法, 与文献<sup>[20]</sup>中报道的方法相比具有以下优势: 首先, 此方法可以在水相中进行, 样品前处理快速便捷且无需对水进行去除或绝对隔离; 其次, 此方法克服了脂肪酸甲酯化或乙酯化产物的易挥发性, 避免了检测前处理造成的脂肪酸酯的挥发损失; 再次, 此方法提高了甲酸及乙酸异丁酯的色谱保留, 避免了其与溶剂峰重叠的问题, 可实现短、中、长

链脂肪酸的同步定量分析。

本研究通过优化相关参数, 对 27 种脂肪酸进行了定性定量分析, 包括甲酸和乙酸等在内的脂肪酸经衍生化后, 实现了与溶剂峰有效分离进而被检测。使用的 FID 及质谱检测器 SIM 采集方式的检测灵敏度均可达到十亿分之一级。实验结果表明, 对于短链及中链脂肪酸 SIM 响应更高, 对于长链脂肪酸 FID 的响应优于 SIM; 但在复杂样本中或基质干扰严重时, 仍然应使用 SIM 进行分析以增加定量准确性。方法学验证结果显示, 该反应在一定浓度动态范围内呈线性 ( $R^2>0.99$ ), 且方法灵敏度高 ( $\text{LOQ}<10 \text{ pmol}$ )。代谢物定量分析的日内和日间 RSD 均小于 10%, 这表明当样本在常温下放置 24 h 或在 4 °C 下放置 3 d 时, 此方法不影响甲酸和乙酸等易挥发性脂肪酸定量结果的稳定性。因此, 该方法可用于自动化程度较高的大样本脂肪酸定量分析研究。

本研究进一步以典型常见生物样本 (血清、尿液、粪便、肝脏) 为对象, 对所建立方法的生物样本基质普适性进行验证。通过与标准溶液比对, 在健康青少年血清、健康成年人尿液、婴幼儿粪便和大鼠肝脏 4 种常见哺乳动物的生物样本中, 分别可检测到 10、7、14 和 9 种脂肪酸。其中, 在粪便样本中可检测到多种短链脂肪酸且以乙酸含量最高, 该结果与文献<sup>[29]</sup>报道相符合; 粪便中检测到的丁酸源于肠道菌群对膳食纤维的发酵, 其可作为结肠上皮细胞的重要营养物质, 具有调节肠道内 pH 值的功能, 此外其还可作为 G 蛋白偶联受体的天然配体。本研究尽管只聚焦 27 种代表性脂肪酸, 但所建立的方法也可用于其他脂肪酸的定量分析, 特别是血清与肝脏组织中的其他长链脂肪酸。此结果与本课题组使用甲酯化方法进行脂肪酸定量分析的前期研究<sup>[25]</sup>相比, 对长链饱和及不饱和脂肪酸的检测处于同等数量级水平; 虽然亚麻酸、二十烷酸等脂肪酸未被检出, 但本方法扩大了短、中链脂肪酸的检测覆盖度, 同时也为进一步扩大长链不饱和脂肪酸的检测覆盖度提供了可能。

综上, 本研究所建立的脂肪酸定量分析方法具有简便、快速、条件温和的特点, 可直接在水相中进行衍生化反应以减少代谢物损失, 简化了前处理步骤, 满足了代谢组分析对通量的需求; 同时, 该方法增加了脂肪酸检测的覆盖范围, 可实现短、中、长链脂肪酸的同步定量分析。该方法为研究脂肪酸在生理病理状态下的功能提供了重要的方法学基础。

## 参·考·文·献

- [1] Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002, 5(5): 545-549.
- [2] Saloranta C, Groop L. Interactions between glucose and FFA metabolism in man[J]. Diabetes Metab Rev, 1996, 12(1): 15-36.
- [3] Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. *In vivo* regulation of lipolysis in humans[J]. J Lipid Res, 1994, 35(2): 177-193.
- [4] Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity[J]. Lipids, 2001, 36(9): 1007-1024.
- [5] Chua ME, Sio MC, Sorongon MC, et al. Relationship of dietary intake of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids with risk of prostate cancer development: a meta-analysis of prospective studies and review of literature[J]. Prostate cancer, 2012, 2012: 826254.
- [6] MacLennan M, Ma DW. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(5): 211.
- [7] Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored[J]. Clin Sci (Lond), 2004, 107(1): 1-11.
- [8] Boden G. Fuel metabolism in pregnancy and in gestational diabetes mellitus[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 1996, 23(1): 1-10.
- [9] Felber JP, Magnenat G, Casthélaz M, et al. Carbohydrate and lipid oxidation in normal and diabetic subjects[J]. Diabetes, 1977, 26(7): 693-699.
- [10] Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Prog Lipid Res, 2013, 52(1): 165-174.
- [11] Boden G. Obesity, insulin resistance, Type 2 diabetes and free fatty acids[J]. Expert Rev Endocrinol Metab, 2006, 1(4): 499-505.
- [12] 夏燕萍, 陈刚, 俞茂华. 老年代谢综合征患者血清游离脂肪酸水平及其影响因素[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(9): 1095-1097.
- [13] Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance[J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 507-520.
- [14] Willker W, Leibfritz D. Assignment of mono- and polyunsaturated fatty acids in lipids of tissues and body fluids[J]. Magn Reson Chem, 1999, 36: S79-S84.
- [15] Lotti C, Rubert J, Fava F, et al. Development of a fast and cost-effective gas chromatography-mass spectrometry method for the quantification of short-chain and medium-chain fatty acids in human biofluids[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(23): 5555-5567.
- [16] Damen CW, Isaac G, Langridge J, et al. Enhanced lipid isomer separation in human plasma using reversed-phase UPLC with ion-mobility/high-resolution MS detection[J]. J Lipid Res, 2014, 55(8): 1772-1783.
- [17] Tang HR, Wang YL. Metabonomics: a revolution in progress[J]. Prog Biochem Biophys, 2006, 33(5): 401-417.
- [18] A J, Trygg J, Gullberg J, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome[J]. Anal Chem, 2005, 77(24): 8086-8094.
- [19] Wu H, Xue R, Dong L, et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2009, 648(1): 98-104.
- [20] 刘玉敏, 魏珍玉, 陈昕, 等. 基于 GC-TOFMS 技术的缺血性脑卒中代谢组学研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(2): 207-211.
- [21] 李静晨, 万钱芬, 干涉妍, 等. 乙型肝炎病毒影响肝癌 HepG2 细胞代谢的气相色谱-质谱研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(10): 1322-1326.
- [22] 黄巾帆, 张海南, 陈子卿, 等. 三氧化二砷对肝细胞癌 HepG2 细胞系作用效果的代谢组学研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(10): 1145-1151.
- [23] Ly W, Yang T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis[J]. Clin Biochem, 2012, 45(1/2): 127-133.
- [24] Zhao L, Ni Y, Su M, et al. High throughput and quantitative measurement of microbial metabolome by gas chromatography/mass spectrometry using automated alkyl chloroformate derivatization[J]. Anal Chem, 2017, 89(10): 5565-5577.
- [25] An Y, Xu W, Li H, et al. High-fat diet induces dynamic metabolic alterations in multiple biological matrices of rats[J]. J Proteome Res, 2013, 12(8): 3755-3768.
- [26] Husek P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 717(1/2): 57-91.
- [27] Furuhashi T, Sugitate K, Nakai T, et al. Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS[J]. Anal Biochem, 2018, 543: 51-54.
- [28] Chiu HH, Tsai SJ, Tseng YJ, et al. An efficient and robust fatty acid profiling method for plasma metabolomic studies by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Clin Chim Acta, 2015, 451(Pt B): 183-190.
- [29] Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, et al. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis[J]. Int J Obes (Lond), 2015, 39(9): 1331-1338.

[收稿日期] 2019-05-20

[本文编辑] 邢宇洋

## 抗疫小知识

## 新型冠状病毒肺炎临床分型

## (一) 轻型

临床症状轻微, 影像学未见肺炎表现。

## (二) 普通型

具有发热、呼吸道等症状, 影像学可见肺炎表现。

## (三) 重型

符合下列任何一条: ①呼吸窘迫,  $RR \geq 30$  次/min。②静息状态下, 指氧饱和度  $\leq 93\%$ 。③动脉血氧分压 ( $PaO_2$ ) / 吸氧浓度 ( $FiO_2$ )  $\leq 300$  mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)。

## (四) 危重型

符合以下情况之一者: ①出现呼吸衰竭, 且需要机械通气。②出现休克。③合并其他器官功能衰竭需 ICU 监护治疗。

——摘自《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版修正版)》

