

Application News

No. 01-00758-K

LCMS-8060RX High-Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

LC-MS/MS를 이용한 인간 혈장 및 혈청 중 MRM 기반의 유리지방산 프로파일링

MRM Based Free Fatty Acids Profiling in Human Plasma and Serum Using LC-MS/MS

Yuki Suzuki, Naoko Nagano, and Masaki Yamada

사용자 활용 포인트

- ◆ 간단한 전처리를 통해 혈액 내 19가지의 유리지방산을 동시에 분석할 수 있다.
- ◆ 지연 컬럼(delay column)은 오염 물질로부터 지방산을 분리하는 역할을 하였다.
- ◆ CoreSpray가 새롭게 장착된 LCMS-8060RX는 미량의 화합물에 대해 안정적이고 신뢰할 수 있는 정량 분석을 가능하게 한다.

■ 서론

신체에서 전체 지방산의 약 5%를 차지하는 유리지방산은 인슐린 분비 등의 기능을 조절하는 중요한 신호전달자로 알려져 있으며, 다양한 내분비 질환의 바이오마커로 주목을 받고 있다¹⁾.

가스 크로마토그래피(GC) 또는 가스 크로마토그래피-질량분석법(GC/MS)은 일반적으로 긴 사슬 지방산 및 다중불포화 지방산 분석을 위해 메틸에스테르화와 같은 전처리가 필요하다. 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC/MS)을 이용한 다중 반응 모니터링(MRM)은 유도체화 없이 지방산의 고감도 정량 분석을 가능하게 한다. 그러나 팔미트산 및 스테아르산과 같이 환경에 널리 존재하는 지방산은 LC 시스템에 불순물로 도입되고, 실제 샘플 분석에서 이러한 지방산을 정확하게 정량하는 데 어려움이 있다고 보고되었다²⁾.

이 뉴스레터는 안정성이 높은 LCMS-8060RX 시스템과 지연 컬럼(delay column)을 이용하여 인간 혈장과 혈청 내 유리지방산을 정량적으로 분석한 사례를 제시한다.



그림 1. LCMS-8060RX 및 CoreSpray

■ 시료 및 전처리 조건

표준물질은 Cayman Chemical(Ann Arbor, MI)에서 구입하였다. 인간 혈장은 Kojin-Bio Co.(일본)에서 구입하였고, 두 가지 유형의 인간 혈장을 사용하였다: EDTA 혈장과 헤파린 혈장.

혈장 및 혈청 100 µL에 1% 포르산이 포함된 아세토니트릴 295 µL와 내부 표준 물질 5 µL를 첨가한 다음 약 1분간 교반 하였다. 원심 분리 후 상층액을 수집하여 분석 샘플로 사용하였다(그림 2). 1% 포르산이 포함된 아세토니트릴로 희석하여 LC/MS/MS 분석을 하고, 첨가한 내부 표준물질은 희석 비율에 따라 최종 농도가 25 ng/mL이 되도록 조정하였다.

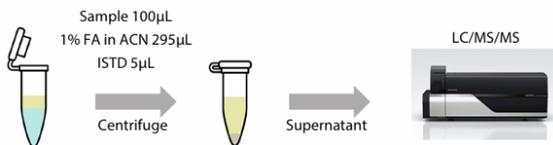


그림 2. 시료 전처리 과정

■ 분석 조건

LC-40 시리즈 Nexera™ UHPLC 시스템과 초고속 삼중 사중극자 질량 분석기 LCMS-8060RX를 사용하였다(그림 1). LCMS-8060RX는 CoreSpray 기술을 특징으로 하여 보다 균일한 분무 가스 흐름을 제공한다. 이를 통해 장기간에 걸쳐 보다 안정적이고 신뢰할 수 있는 정량적 결과를 제공한다.

HPLC와 MS의 분석 조건은 표 1에 나타내었다. 그라디언트 믹서와 오토샘플러 사이에 지연 컬럼을 설치하여 이동상에서 대상 성분과 환경적 오염 성분을 분리하도록 개선하였다.

표 1. 분석 조건

HPLC (Nexera X3 system)	
Column	Shim-pack Scepter™ Claris C18-120*1 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 µm)
Delay column	Shim-pack™ XR-ODS II *2 (50 mm × 2.0 mm I.D., 2.2 µm)
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water = 20/80 (B) Acetonitrile/2-propanol = 20/80
Flow rate	0.2 mL/min
Gradient program	B.conc. 50% (0-0.5 min) → 65% (7 min) → 100% (14-17.5 min) → 50% (17.6-20 min)
Column temp.	55 °C
Injection volume	1 µL

*1 P/N : 227-31210-02 *2 P/N : 228-41623-94

MS (LCMS-8060RX)	
Ionization	ESI (Negative mode)
Mode	MRM
Nebulizing gas flow	5.0 L/min
Drying gas flow	10.0 L/min
Heating gas flow	10.0 L/min
DL temp.	250 °C
Heat block temp	400 °C
Interface temp	150 °C

■ 지연 컬럼에 의한 매트릭스 피크의 분리

다음 화합물에 대한 동시 분석 방법을 개발하였다.: 라우르산, 스테아리돈산, 에이코사펜타엔산(EPA), α-리놀렌산, γ-리놀렌산, 미리스트산, 도코사헥사엔산(DHA), 팔미톨레산, 아라키돈산(AA), 리놀레산, 도코사펜타엔산(DPA), 디호모-γ-리놀렌산(DGLA), 팔미트산, 아드레닌산, 올레산, 스테아르산, 아라키드산, 네르본산, 리그노세르산. 유리지방산 표준용액 (500ng/mL)의 MRM 크로마토그램을 그림 3에 나타내었다.

믹서와 오토샘플러 사이에 지연 컬럼을 설치함으로써 샘플에서 유래된 표적 화합물을 이동상에서 유래된 매트릭스에서 분리할 수 있었다. 이동상으로부터 유래된 지방산으로 여겨지는 넓은 피크는 혈장과 혈청 샘플에서 여러 유리지방산(팔미트산 C16:0, 스테아르산 C18:0 및 올레산 C18:1)의 피크 이후에 검출되었다(그림 3). 지연 컬럼이 없으면 혈액 화합물의 피크가 이동상의 피크와 겹쳐 정확한 피크 면적을 얻을 수 없다.

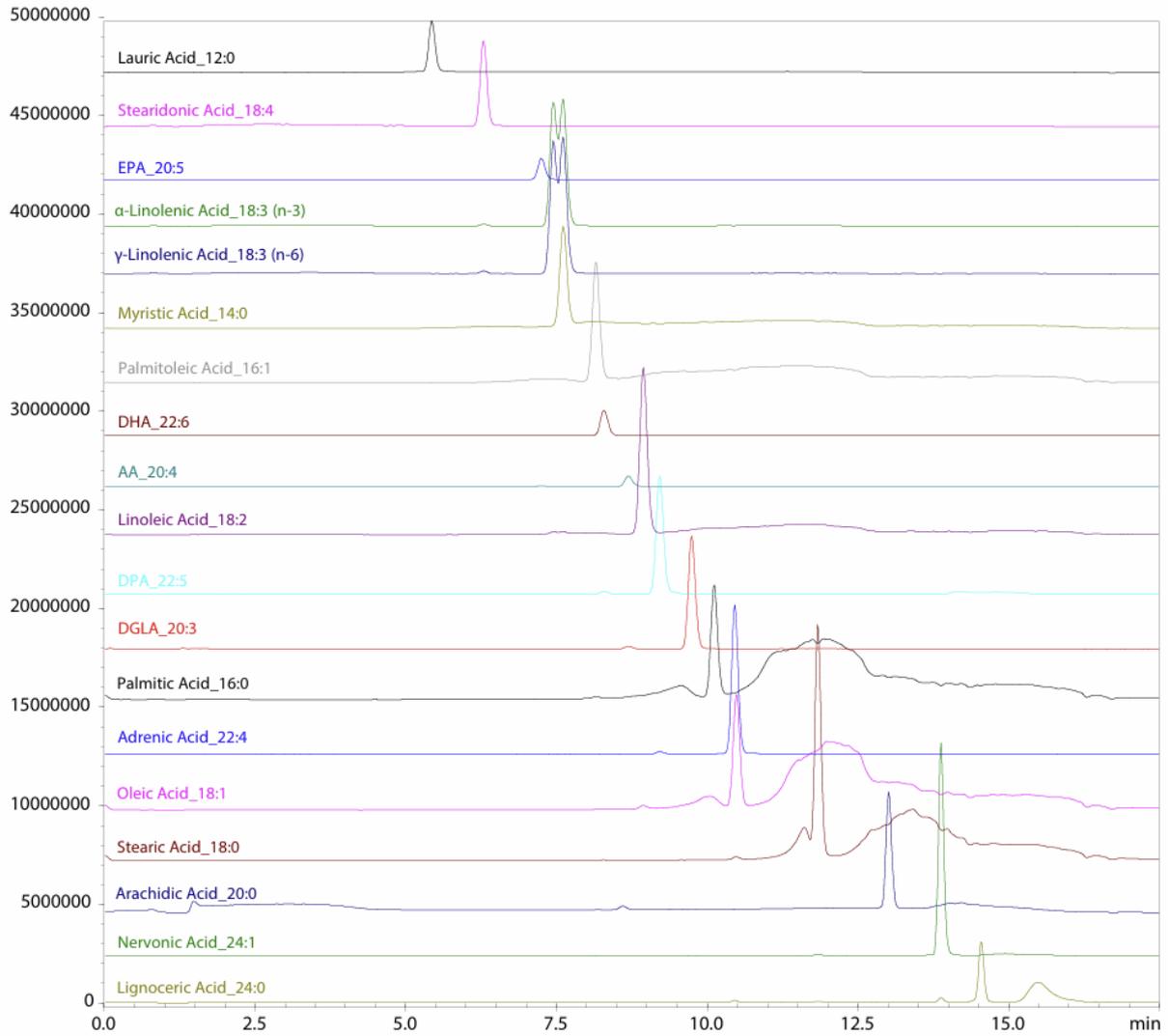


그림 3. 유리지방산 19 성분의 MRM 크로마토그램

그림 3. 유리지방산 19 성분의 검량선 및 반복성 결과

Compound	Transition	Quantification Range (µg/L)	Coefficient of Determination (R ²)	Repeatability (%RSD)
Lauric Acid_12:0	199.20>199.20	10-1000	0.997	4.35
Stearidonic Acid_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-Linolenic Acid_18:3 (n-3)	277.20>277.20	1-1000	0.997	8.34
γ-Linolenic Acid_18:3 (n-6)	277.20>277.20	1-1000	0.998	7.63
Myristic Acid_14:0	227.20>227.20	10-1000	0.999	4.48
Palmitoleic Acid_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
Linoleic Acid_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
Palmitic Acid_16:0	255.20>255.20	1-1000	0.997	1.11
Adrenic Acid_22:4	331.30>331.30	1-1000	0.998	8.59
Oleic Acid_18:1	281.20>281.20	10-1000	0.998	6.53
Stearic Acid_18:0	283.30>283.30	10-500	0.997	1.67
Arachidic Acid_20:0	311.30>311.30	10-1000	0.998	4.15
Nervonic Acid_24:1	365.30>365.30	1-500	0.997	1.68
Lignoceric Acid_24:0	367.30>367.30	10-1000	0.999	2.40
AA-d8 (STD)	311.20>267.20	-	-	-

■ 검량선 및 반복성

각 화합물의 검량선에는 내부 표준법을 사용하였고, 1-1000 ng/mL 범위에서 3개 이상의 농도를 설정하였다(그림 4). 모든 화합물에서 R²>0.999의 양호한 선형성을 나타내었다. 모든 화합물에서 평균 농도의 정확도가 70-130%이고, 가장 낮은 검량선 농도에서 반복성(%RSD)이 10% 미만으로 양호한 결과를 얻었다(표 2).

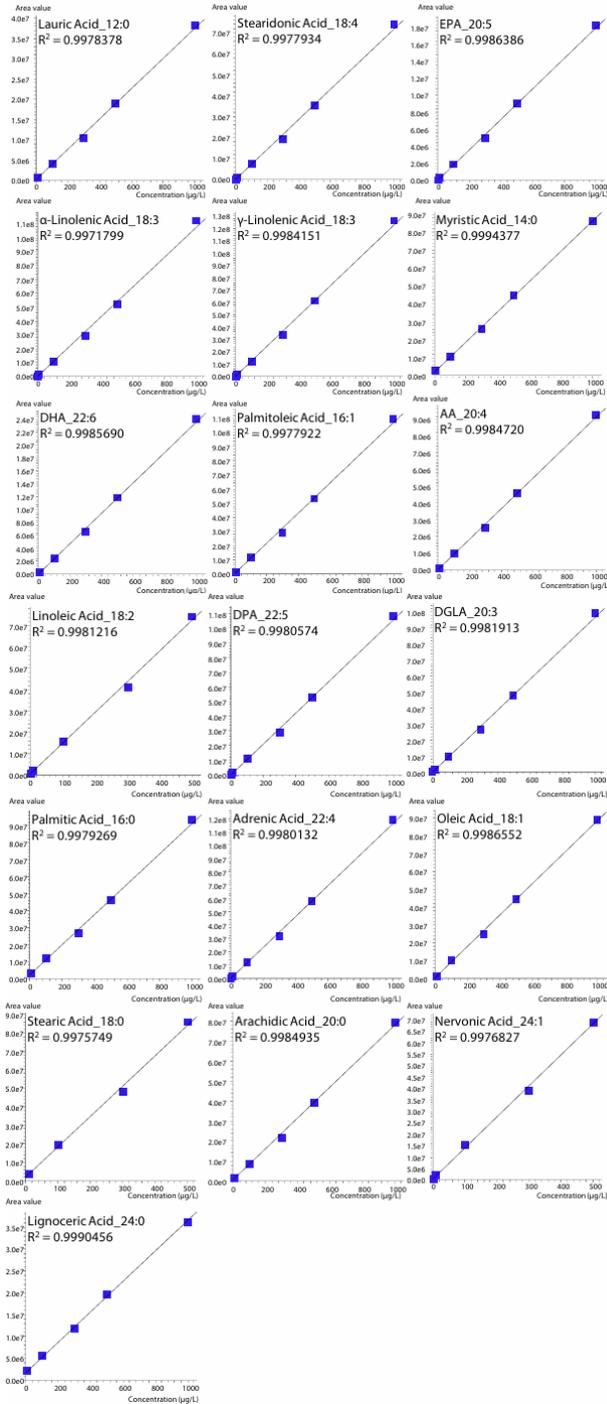


표 3. 인간 혈장 및 혈청 중 유리지방산 19 성분의 농도

Compound	EDTA Plasma		Heparin Plasma		Serum	
	Concentration (µg/L)	%RSD	Concentration (µg/L)	%RSD	Concentration (µg/L)	%RSD
Lauric Acid_12:0	374.32	2.52	460.04	4.90	503.16	1.60
Stearidonic Acid_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-Linolenic Acid_18:3 (n-3)	1439.92	2.13	1349.04	3.19	1601.92	1.11
γ-Linolenic Acid_18:3 (n-6)	400.56	7.61	79.28	9.36	118.88	3.39
Myristic Acid_14:0	3363.48	1.25	1915.6	3.27	1683.84	0.89
Palmitoleic Acid_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	1359.12	1.95	3321.68	0.87
Linoleic Acid_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
Palmitic Acid_16:0	42375.52	2.69	29640.64	3.05	35220.72	2.54
Adrenic Acid_22:4	222.84	1.66	170.14	3.27	151.8	2.41
Oleic Acid_18:1	65049.12	1.90	57857.36	0.94	62891.44	1.48
Stearic Acid_18:0	12185.4	0.47	8733.88	2.00	10819.2	1.01
Arachidic Acid_20:0	70.76	5.30	77.8	8.01	113.64	3.14
Nervonic Acid_24:1	23.72	1.84	20.84	2.72	25.44	2.43
Lignoceric Acid_24:0	64.52	6.72	125.76	8.58	57.2	5.86

■ 결론

고성능 액체 크로마토그래프 질량 분석기 LCMS-8060RX를 사용하여 인간 혈장과 혈청에서 19가지 유리 지방산을 동시에 분석하였다. 모든 화합물에 대해 1-1000 µg/L 농도 범위에서 좋은 선형성을 얻었으며, 가장 낮은 검량선 농도에서의 반복성이 10% 미만임을 확인하였다. 지연 컬럼을 사용하면 이동상에서 유래된 매트릭스 피크를 제거할 수 있다. 이 분석 방법은 간단한 전처리보다 안정적이고 정확한 정량 분석을 제공한다.

■ 인간 혈장 및 혈청 중 정량 분석

전처리된 인간 혈장과 인간 혈청을 함량에 따라 1% 포름산이 포함된 아세토니트릴로 희석하여 정량분석을 하였다. 희석되지 않은 용액의 농도로 환산한 결과는 Table 3에 요약하였다. 19가지 화합물이 모두 검출되었으며, RSD<10%로 추정된 농도의 양호한 반복성을 얻었다.

< Reference >

- 1) Takahashi H, et al., "Long-Chain Free Fatty Acid Profiling Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Mouse Treated with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist", Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 22882293(2013).
- 2) OkadaH., et al., "Development of a liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous analysis of free fatty acids", J.Biochem., 170(3):389-397(2021).



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country. The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. See <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> for details. Third party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own. The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

01-00758-K