

혈액 및 혈장의 지방산 프로파일링을 위한 Agilent 7693 ALS를 이용한 자동 시료 전처리

응용 자료

임상 연구

저자

Frank David and Bart Tienpont,
Research Institute for
Chromatography,
Pres. Kennedypark 26, B-8500
Kortrijk, Belgium

Matthew S. Klee and Paul Tripp,
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

개요

Agilent 7693 시리즈 자동 시료 주입기를 이용한 혈액 또는 혈장 시료의 Fatty Acid Methyl Esters(FAME) 결정을 위한 소형 자동 시료 전처리 분석법을 설명합니다. 50 μ L 시료를 methanol의 acetyl chloride로 유도체화하고, iso-octane에서 fatty acid methyl ester를 추출합니다. 추출물은 GC-FID로 분석합니다. 우수한 반복성을 가지며, 식이 요법, 생체의학 또는 대사체 연구에서 혈액 및 혈장 시료의 완전히 자동화된 지방산 프로파일링 분석법을 적용할 수 있습니다.



Agilent Technologies

소개

혈장 및 혈액 시료의 지방산 프로파일 결정은 생체의학 분석의 진단 도구로 사용됩니다. 지질 분획 관련 성분은 영양 및 전염병 연구에 적용할 수 있습니다[1-3]. 이러한 연구는식이 지방 섭취와 인간 건강의 관계, 지방산 프로파일과 심혈관 질환과 같은 일부 병리학의 관계, 그리고 보다 최근에는 대사체(리피도믹) 연구에 사용하는 지방산 프로파일링의 관계 연구를 포함합니다.

일반적으로, 지방산 프로파일링은 GC-FID 또는 GC-MS를 사용하여 수행합니다. 혈액 또는 혈장 시료의 지질 분획은 Fatty Acid Methyl Esters(FAMES)로 가수분해하고 메틸화합니다. FAME를 포함한 iso-octane 추출물 1 μ L 시료는 극성 컬럼을 사용하여 탄소 수와 이중 결합 수에 따라 분리합니다. cis-trans 이성질체 분리는 높은 cyano 함량의 cyanopropyl silicone 컬럼(예: HP-88)을 사용합니다.

가수 분해 및 메틸화는 별도의 단계를 사용합니다. 일반적인 시료 전처리는 수백 μ L(최대 수 mL)의 혈장 또는 혈액을 필요로 하며, 순차적인 지질 추출, 가수분해 및 메틸화 단계를 포함합니다. 이러한 단계 중 일부는 상대적으로 느리고 상당한 처리 및 취급(분획 이송, 기화 등)이 필요합니다. 최근, 혈액 한 방울로 지방산을 결정하는 간단한 분석법이 개발되었습니다[2,3]. 최상의 결과는 acetyl chloride의 methanol 용액을 사용한 단일 유도체화 단계를 사용합니다[3].

본 응용 자료에서는, Agilent 7693 시리즈 자동 시료 주입기(ALS)를 사용하여 이러한 간단한 분석법을 완전히 자동화된 분석법으로 바꾸었습니다. 분석법으로 혈장 및 혈액 시료를 시험하고, 재현성을 평가하였습니다.

실험

분석은 비분할 라이너(p/n 5062-3587)를 장착한 분할/비분할(S/SL) 주입구 및 불꽃 이온화 검출기(FID)를 갖춘 Agilent 7890 GC 시스템으로 수행하였습니다. 자동 시료 전처리 및 주입은 7693A ALS(G4520A)로 수행하였습니다. 자동 시료 주입기는 주입 타워 2개와 트레이 1개로 구성됩니다. PTFE-tipped plunger인 10 μ L 시린지(5181-3354)가 장착된 전면 주입 타워로 시료를 주입하였습니다.

PTFE-tipped plunger인 100 μ L 시린지(5183-2042)가 장착된 후면 주입 타워로 시약과 추출 용액을 첨가하였습니다. 시료 트레이는 가열 및 바코드 판독기/혼합 기능을 갖추었습니다. 후면 및 전면 터렛의 용매 바이알은 다음과 같이 채웠습니다.

후면 터렛

- 세척 A1: methanol
- 세척 A2: acetone
- 세척 A3: iso-octane
- 세척 B1: Methanol의 5% acetylchloride(각 시퀀스마다 새로 준비)
- 세척 B2: iso-octane(희석)

전면 터렛

- 세척 A1 – A2: iso-octane
- 세척 B1 – B2: iso-octane

시료 전처리 분석법은 혈액 한 방울의 지방산 결정을 위해 개발된 분석법에 기초합니다[3]. 이 분석법은 스크루 캡(5185-5829), 2mL 바이알(5182-0714)의 250 μ L 인서트(5181-3377)에 50 μ L 혈액 또는 혈장 시료를 담는 것으로 시작합니다. 자동 시료 주입기는 유도체화 시약(5% acetyl chloride, Sigma-Aldrich, methanol)을 첨가하고, 시료를 30분간 75°C로 가열 및 혼합합니다. 이 단계에서, free fatty acid, sterol ester, glycerol ester(주로 triglyceride) 및 phospholipid로 구성된 혈액 또는 혈장의 지질 분획을 가수 분해하고 Fatty Acid Methyl Esters(FAMES)로 메틸화합니다. 세 번의 가열 및 혼합 단계를 순차적으로 30분간 10분 간격으로 수행합니다. 이후, 추출 용액으로 100 μ L iso-octane을 첨가합니다. Fatty acid methyl ester를 추출하여 GC-FID로 분석합니다. GC ChemStation에 프로그래밍된 시료 전처리 시퀀스는 표 1과 같습니다.

표 1. 시료 전처리 시퀀스

1. 모든 바이알 회수
2. 전면 시퀀스 바이알에서 후면 터렛 포지션 #1으로 바이알 이동
3. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A1 50μL를 현재 폐기물 바이알에 1회 분주
> MeOH로 세척
4. 세척 B1 150μL를 후면 타워 시료 1에 분주
> 시료에 5% AcCl 첨가
5. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A1 50μL를 현재 폐기물 바이알에 1회 분주
> MeOH로 시린지 세척
6. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A2 50μL를 현재 폐기물 바이알에 1회 분주
> Acetone으로 시린지 세척
7. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A3 50μL를 현재 폐기물 바이알에 2회 분주
> iso-octane으로 시린지 세척
8. 후면 터렛 포지션 #1에서 혼합기로 바이알 이동
9. 4,000rpm으로 10초, 1회 혼합
10. 혼합기에서 가열 장치로 바이알 이동
11. 600초 동안 75°C로 바이알 가열
12. 가열 장치에서 혼합기로 바이알 이동
13. 4,000rpm으로 10초, 1회 혼합
14. 혼합기에서 가열 장치로 바이알 이동
15. 600초 동안 75°C로 바이알 가열
16. 가열 장치에서 혼합기로 바이알 이동
17. 4,000rpm으로 10초, 1회 혼합
18. 혼합기에서 가열 장치로 바이알 이동
19. 600초 동안 75°C로 바이알 가열
20. 가열 장치에서 후면 터렛 포지션 #1으로 바이알 이동
21. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A3 50μL를 현재 폐기물 바이알에 1회 분주
> iso-octane으로 시린지 세척
22. 세척 B2 100μL를 후면 타워 시료 1에 분주
> 100μL iso-octane으로 추출
23. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A2 50μL를 현재 폐기물 바이알에 1회 분주
> Acetone으로 시린지 세척
24. 후면 타워 시린지 세척, 세척 A1 50μL를 현재 폐기물 바이알에 1회 분주
> MeOH로 시린지 세척
25. 후면 터렛 포지션 #1에서 혼합기로 바이알 이동
26. 3,000rpm으로 30초, 4회 혼합
27. 2분 대기
> 상분리 대기
28. 혼합기에서 전면 시퀀스 바이알로 바이알 이동

분석 조건은 Bicalho et al[3]에서 기술한 GC-MS 분석법을 기초로 합니다. 길이가 길고 극성인 Agilent HP-88 GC 컬럼은 cis-trans 지방산에 대한 최적의 분리능과 중요한 omega-3(n-3) 및 omega-6(n-6) 지방산의 결정을 위해 사용합니다. 표 2는 분석 조건 요약입니다.

표 2. 분석 조건

주입	1.0μL 샘플링 깊이: 15mm(*)
주입구	S/SL 비분할 모드, 250°C
컬럼	100m×0.25mm, 0.2μm HP-88, p/n 112-88A7
운반 가스	헬륨 주입구 압력: 322kPa, 일정한 압력 (유량 = 2.14mL/분 @ 50°C)
GC 오븐 온도	50°C(1분 유지) @ 15°C/분으로 175°C까지, @ 1°C/분으로 250°C까지 총 분석 시간 = 84.33분(**)
FID	250°C, 30mL/분 H2, 400mL/분 air

(*): 준비된 시료의 샘플링 깊이는 육안으로 확인하였습니다. 니들 깊이는 iso-octane 상층액은 관통하고 aqueous/methanol 하층액은 피하도록 조정했습니다.

(**): 마지막 FAME는 60분 전 용리합니다. sterol (cholesterol) 용리에 추가 유지 시간 25분이 필요했습니다. HP-88 컬럼의 최대 작동 온도는 250°C입니다. 총 분석 시간은 컬럼 후 압력 제어 capillary flow technology 장치 (예: Purged Ultimate Union)를 이용한 백플러시로 단축할 수 있었습니다.

명명법:

표와 그림에 나열된 FAME는 다음 공식에 따라 약칭 주석을 사용하여 약자로 표현하였습니다.

$$Ca = b * nx * z$$

여기서 Ca는 지방산 사슬의 탄소 원자 수(methyl alcohol 부분 제외), b는 이중 결합의 수, nx는 마지막 methyl carbon에서 carbonyl carbon으로 카운트할 때 x번째 탄소-탄소 결합의 이중 결합 위치이며 z는 cis는 c로, trans는 t로 표현되는 기하학적 구성입니다.

결과 및 토의

그림 1은 혈장 시료의 fatty acid methyl ester 프로파일을 보여주는 전형적인 크로마토그램입니다.

표 3은 피크 식별입니다. 주 피크는 palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1 n9 c), linoleic

acid(18:2 n6 cc) 및 arachidonic acid(C20:4 n6)의 methyl-ester로 식별됩니다. 또한, 중요한 omega-3 지방산, C18:3 n3(alpha-linolenic acid, ALA), C20:5 n3(eicosapentadienoic acid, EPA) 및 C22:6(docosahexa-dienoic acid, DHA)가 결정됩니다. 길이가 긴 HP-88 컬럼 분리는 cis 및 trans 지방산의 구별을 가능하게 하며, trans 지방산은 식단의 직접적인 표현이므로 중요합니다.

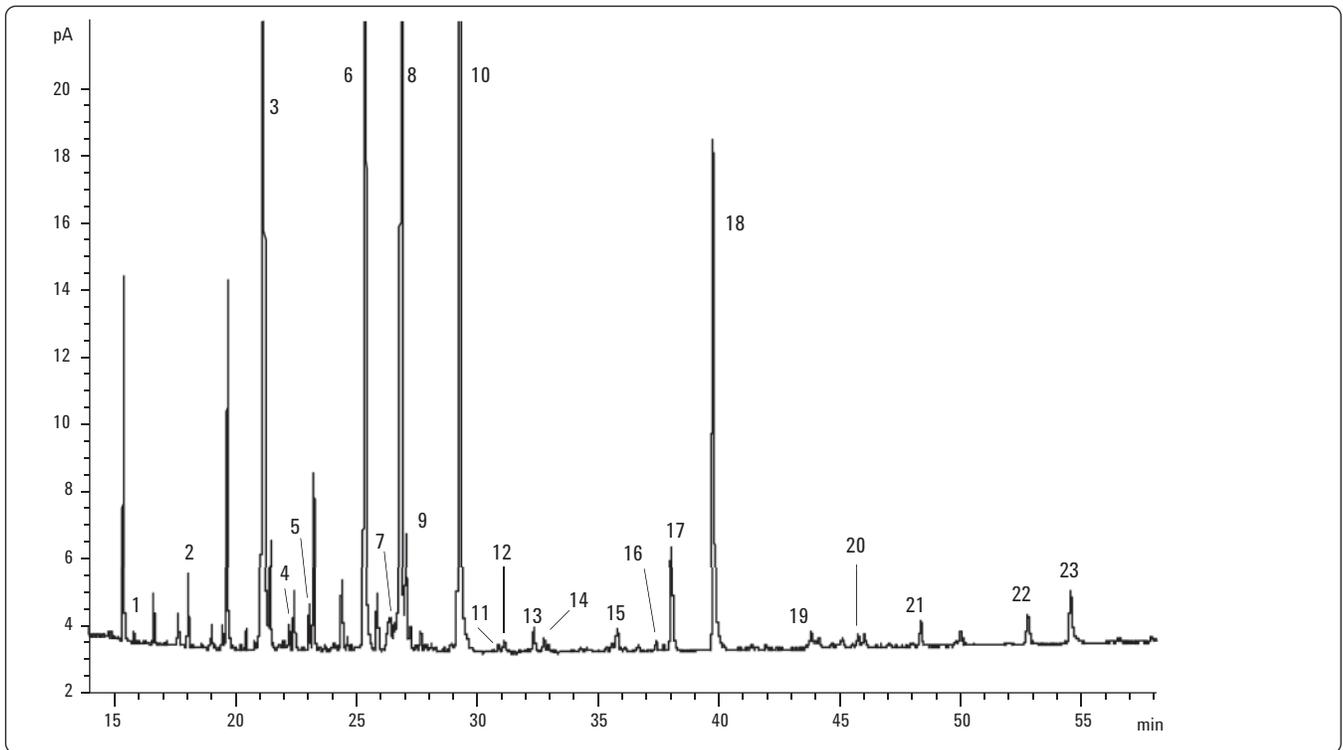


그림 1. 혈장 시료의 fatty acid methyl ester 프로파일

지방산의 상대적 성분은 표준 접근법과 같이 피크 면적 정규화를 사용하여 연산하였습니다. 동일한 혈장 시료 분취액으로 6회 반복 분석하였습니다. 시료 전처리 및 분석은 완전 자동화 시퀀스로 수행하였습니다. 표 3은 평균 면적%(n=6), 표준 편차 및 %RSD 결과 요약입니다. 데이터는 우수한 재현성을 얻을 수 있었음을 보여줍니다. 평균 RSD는 2%였고, 가장 많은 양의 지방산(상대 면적 > 0.5%)들은 대부분 1% 미만이었습니다. 이러한 높은 정밀도의 값은 시료 전처리 및 분석 단계의 조합에 의합니다.

그림 2는 6번 분석의 FID 크로마토그램 중첩을 도식화하여 재현성을 나타냅니다.

표 3. 혈장 지방산의 상대 피크 면적에 대한 피크 식별 및 재현성

피크	tR (분)	이름	평균 면적%	표준 편차	RSD (%)
1	15.877	C12:0	0.059	0.003	4.43
2	18.143	C14:0	0.557	0.010	1.81
3	21.216	C16:0	33.239	0.185	0.56
4	22.465	C16:1 n7	0.579	0.008	1.37
5	23.118	C17:0	0.384	0.005	1.39
6	25.408	C18:0	17.819	0.113	0.64
7	26.454	C18:1 trans	0.909	0.007	0.76
8	26.897	C18:1 n9	12.153	0.067	0.55
9	27.114	C18:1 n7	1.009	0.007	0.67
10	29.324	C18:2 n6 cc	20.047	0.169	0.84
11	30.906	C20:0	0.071	0.004	5.31
12	31.186	C18:3 n6	0.126	0.005	3.60
13	32.381	C18:3 n3 (ALA)	0.335	0.005	1.38
14	32.789	C20:1 n9	0.111	0.006	5.12
15	35.789	C20:2 n6	0.294	0.004	1.50
16	37.417	C22:0	0.128	0.002	1.73
17	38.051	C20:3 n6	1.556	0.011	0.71
18	39.779	C20:4 n6	9.050	0.063	0.70
19	43.826	C20:5 n3 (EPA)	0.177	0.008	4.76
20	45.730	C24:0	0.175	0.009	5.19
21	48.295	C22:4 n6	0.429	0.005	1.08
22	52.707	C22:5 n3	0.349	0.006	1.81
23	54.466	C22:6 n3 (DHA)	1.028	0.013	1.28

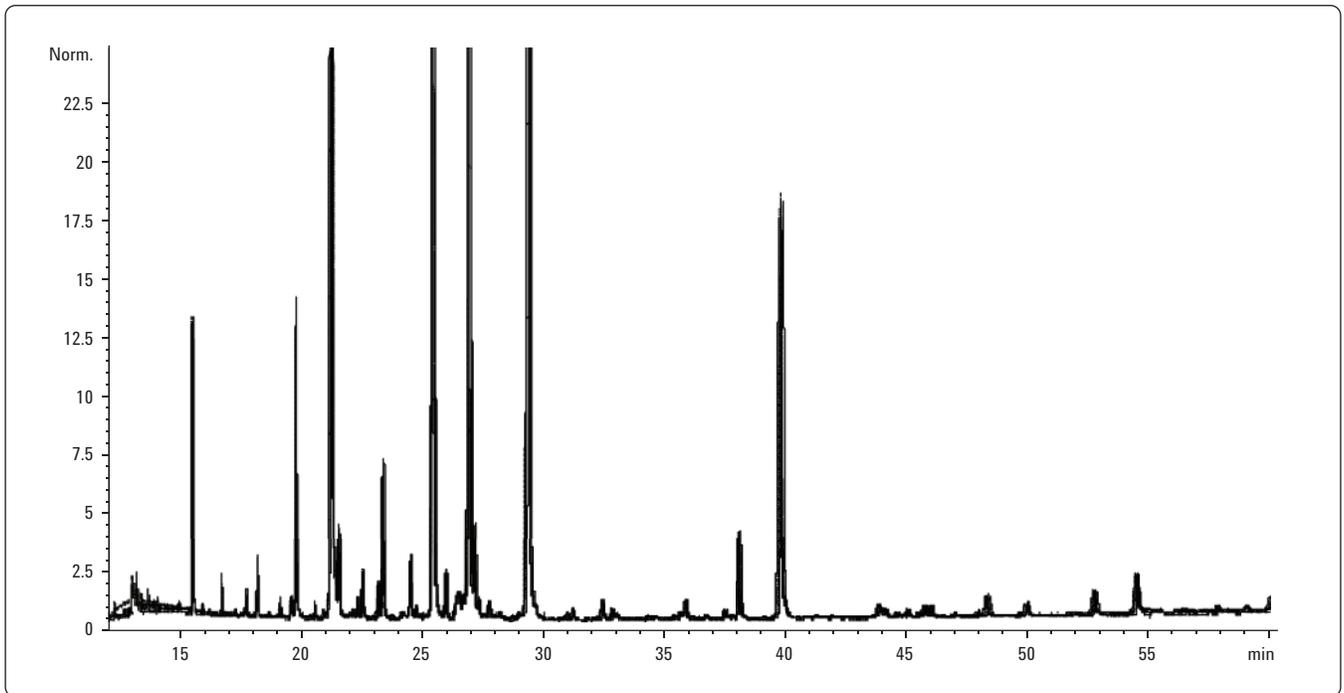


그림 2. 6번 분석 FID 크로마토그램 중첩

이 분석법은 또한 혈액 시료에도 적용할 수 있습니다. 그림 3은 50 μ L 혈액 시료(혈액 한 방울)에 대한 자동 시료 전처리 GC-FID 분석법으로 얻은 fatty acid methyl ester 프로파일입니다. 혈장과 비교하여 일부 흥미로운 차이가 눈에 띕니다. 이미 Marangoni et al[2]에 보고되었듯이, C20:5 n3, C22:4, C22:5 및 C22:6과 같이 높은 포화도와 사슬이 긴 지방산의 상대 농도는 혈장보다 전혈이 더 높게 나타납니다.

결론

혈액 및 혈장 시료의 지방산 결정은 7693 ALS로 완전히 자동화할 수 있습니다. 50 μ L 혈액 또는 혈장만 필요한 소형 시료 전처리 분석법은 단일 바이알 반응으로 바뀌었습니다.

가수분해 및 메틸전이반응에 뒤이은 마이크로 액-액 추출은 vortex 혼합과 시료 가열이 가능한 트레이를 갖춘 후면 주입 타워로 수행합니다. 추출 상층액 주입은 전면 주입기로 수행했습니다.

우수한 재현성을 가지며, 대부분 fatty acid methyl ester에 대한 RSD는 2% 이상이었습니다. 이 분석법은 생체의학, 식이 요법 및 대사체 연구에 대한 완전한 자동 지방산 프로파일링에 적용할 수 있습니다.

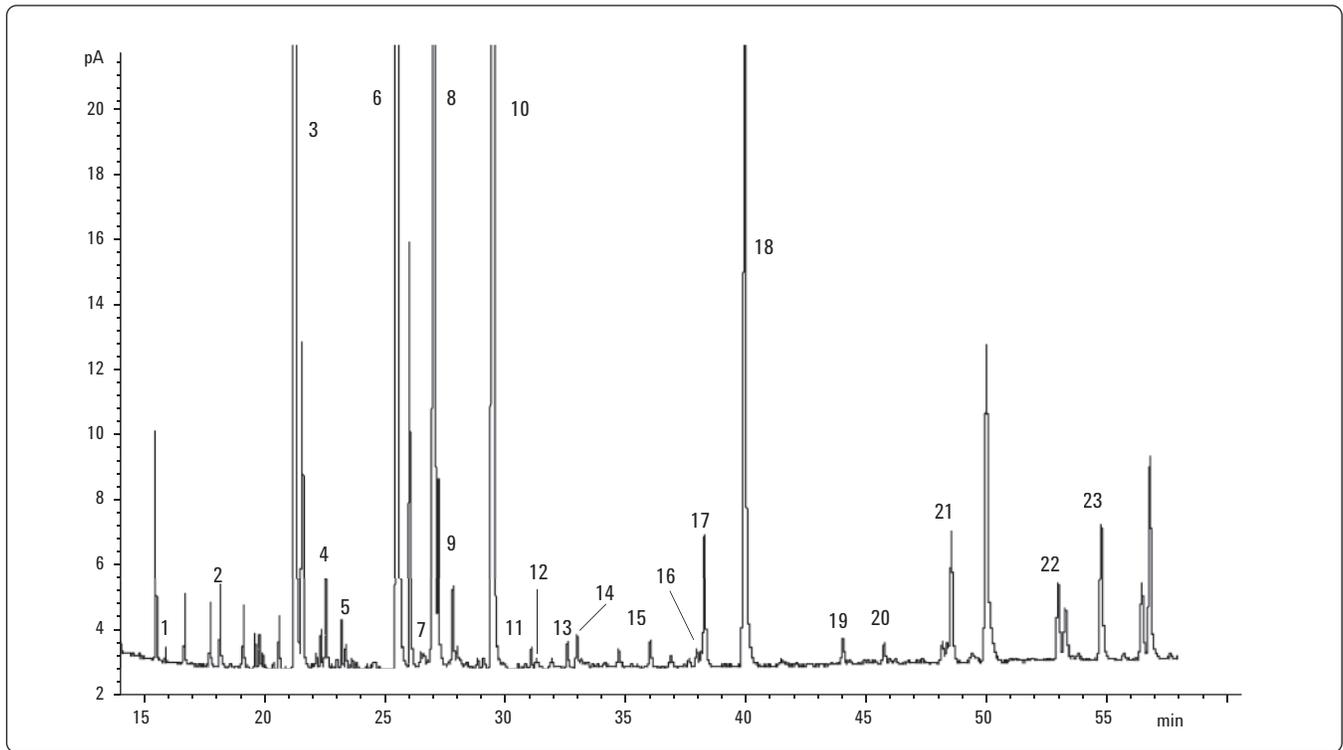


그림 3. 자동 시료 전처리 GC-FID 분석법을 이용한 50 μ L 혈액 시료(혈액 한 방울)의 fatty acid methyl ester 프로파일

참고문헌

1. L. Hodson, C. Murray Skeaff, B.A. Fielding, Progress in Lipid Research 47 (2008) 348-380
2. F. Marangoni, C. Colombo, C. Galli, Anal Biochemistry 326 (2004) 267-272
3. B. Bicalho, F. David, K. Rumpel, E. Kindt, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1211 (2008) 120-128
4. C. Milner, R. Kinghorn, M. S. Klee, Agilent Technologies Application note 5989-8588EN

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2009
한국에서 인쇄
2009년 10월 8일
5990-4822KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies