

Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием

Т.И Орлова, А.И. Уколов*, Е.И. Савельева, А.С. Радиллов

ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства
188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93

*Адрес для переписки: Уколов Антон Игоревич, E-mail: AntonUkolov@gmail.com

Поступила в редакцию 4 февраля 2015 г., после исправлений – 27 марта 2015 г.

Впервые предложена двухстадийная методика определения этерифицированных жирных кислот (**ЭЖК**) и свободных жирных кислот (**СЖК**) с использованием экстрактивного алкилирования. В крови человека **ЭЖК** в связанном виде входят в состав эфиров моно-, ди-, триглицеридов, а также глицерофосфолипидов. Перечень определяемых **ЖК** включает 12 насыщенных кислот (C_{11} - C_{24}) и 20 ненасыщенных кислот (C_{16} - C_{24}), в том числе ω -3, ω -6, ω -9 и полиненасыщенные жирные кислоты. Предложенная методика включает две стадии: переэтерификацию **ЭЖК** с помощью КОН в MeOH в метиловые эфиры с последующим их извлечением из матрицы и экстрактивное метилирование **СЖК** иодистым метилом в CH_2Cl_2 в присутствии гидроксида тетрабутиламмония. Количественное определение выполняли методом относительной градуировки с использованием пальмитиновой кислоты- d_{31} и метилпальмитата- d_{31} в качестве внутренних стандартов. Разработанный метод позволяет проводить количественное определение жирных кислот в плазме крови во всем диапазоне реальных концентраций. Диапазон измеряемых концентраций в плазме крови составляет от 0.2 до 800 мкг/мл. Относительная погрешность определения большинства аналитов не превышает 15 %. Методика характеризуется мягкими условиями проведения подготовки проб: комнатная температура и pH = 8 на стадии экстрактивного алкилирования. Благодаря мягким условиям отсутствуют или проходят в незначительной степени побочные реакции окисления и гидролиза. Показано, что во время процедуры извлечения этерифицированных жирных кислот не происходит конверсии **ЭЖК** в **СЖК**. Методика опробована при исследовании образцов плазмы крови людей.

Ключевые слова: плазма крови, свободные жирные кислоты, этерифицированные жирные кислоты, экстрактивное алкилирование, хроматомасс-спектрометрия, газовая хроматография.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 2, pp. 183-188

DOI: 10.15826/analitika.2015.19.2.002

GC-MS quantification of free and esterified fatty acids in blood plasma

T.I. Orlova, A.I. Ukolov*, E.I. Savel'eva and A.S. Radilov

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia
Build. 93, Kapitolovo Station, g/p Kuz'molovsky, Vsevolozhsky District, 188663 Leningrad Region, Russian Federation

*Corresponding author: Anton I.Ukolov, E-mail: AntonUkolov@gmail.com

Submitted 4 February 2015, received in revised form 27 March 2015

A GC-MS method was developed for quantification of 32 free and esterified fatty acids: 12 saturated fatty acids (C_{11} - C_{24}) and 20 unsaturated and polyunsaturated fatty acids (C_{16} - C_{24}). GC-MS quantification was performed in two stages. At first, esterified fatty acids were converted to methyl esters by transesterification with KOH in MeOH. At the second stage free fatty acids were converted to methyl esters by extractive alkylation with methyl iodide in CH_2Cl_2 and tetrabutylammonium hydroxide. Relative calibration was performed with deuterated palmitic acid and methyl palmitate as internal standards. Range of measured concentrations

was 0.2 to 800 mkg/ml. Relative standard deviation was below 15%. The soft conditions for preparing the samples tested lead to the absence of or minor transesterification side reactions, oxidation and hydrolysis. It is proved that during the extraction procedure esterified fatty acid does not increase the concentration of free fatty acids, indicating the absence of conversion of esterified to free fatty acids. The technique was tested in the study of fatty acids of blood plasma of human volunteers.

Key words: blood plasma, free fatty acids, esterified fatty acids, extractive alkylation, GC-MS.

Введение

В крови человека жирные кислоты (**ЖК**) присутствуют в связанном виде в составе различных соединений, зачастую объединяемых общим термином “липиды”. Наряду с этерифицированными **ЖК** (**ЭЖК**) в крови присутствуют и жирные кислоты в неэтерифицированной или свободной форме (**СЖК**).

Исследование профиля **ЖК** крови – одно из ключевых направлений в ранней диагностике сердечно-сосудистых рисков, метаболического синдрома и других кризисных состояний организма. **ЖК** могут служить биомаркерами ранних стадий развития различных патологий [1]. Подробное исследование статуса **ЖК** в динамике может быть весьма полезно не только при диагностике заболеваний, но и для оценки эффективности лекарственной терапии [2].

Основной метод определения **ЖК** – это газовая хроматография (**ГХ**) с пламенно-ионизационным детектированием [3], однако, в сочетании с масс-спектрометрией, метод **ГХ** имеет ряд неоспоримых преимуществ как в части надежности идентификации аналитов, так и чувствительности и селективности их определения [4]. К недостаткам метода **ГХ** при любом варианте детектирования стоит отнести необходимость предварительной дериватизации аналитов, т.к. жесткие условия дериватизации могут спровоцировать неблагоприятные побочные реакции: изомеризацию и окисление **ЖК**. Таким образом, разработка процедур мягкой дериватизации проводится в целях повышения правильности и точности определения **ЖК** в биологических образцах.

При изучении роли **ЖК** в организме, их метаболизма и патологических последствий его нарушений необходимо количественное определение **ЖК**, присутствующих в биологических образцах, как в свободной, так и в связанной форме [5,6]. При этом разработка способа селективного определения **СЖК** и **ЭЖК** в одной аликвоте образца позво-

ляет значительно сократить объем плазмы крови, требуемый для проведения анализа.

Определение **ЭЖК** в биологических образцах методом **ГХ** после переэтерификации в метиловые эфиры может рассматриваться в качестве классического подхода. В работе [7] проведено сравнение эффективности шести часто используемых методов дериватизации различных классов липидов. Рассмотренные дериватирующие агенты, такие как гидроксид триметилсульфония [8, 9], BF_3 в MeOH [10, 11], HCl в MeOH [12, 13], $\text{NaOH} + \text{BF}_3$ [14, 15], AcCl в MeOH [7] – способны с различной эффективностью этерифицировать **СЖК**, в то время как обработка пробы раствором KOH в MeOH [7] – это способ селективной дериватизации **ЭЖК**. В работе [16] предложено поэтапное метилирование **СЖК** и **ЭЖК**. Для этого сначала метилировали **ЭЖК** с помощью раствора NaOH в MeOH и извлекали из плазмы образовавшиеся метиловые эфиры. А затем в остаточной плазме проводили метилирование **СЖК** с помощью 5 % H_2SO_4 в метаноле. В качестве альтернативы жидкость-жидкостной экстракции, авторы [17] предлагают способ совместного определения **СЖК** и **ЭЖК** с использованием твердофазной экстракции.

Целью настоящей работы являлась разработка способа подготовки образцов к **ГХ-МС** анализу, позволяющего проводить селективное определение **СЖК** и **ЭЖК** в одной аликвоте образца в “мягких” условиях. Разработанная процедура основана на сочетании “классической” переэтерификации раствором KOH в MeOH и определения **СЖК** с использованием экстрактивного алкилирования. Впервые использовать экстрактивное алкилирование иодистым метилом для определения **СЖК** было предложено в работе [18] Крыловым А.И. с соавт. Этот метод был нами впоследствии оптимизирован для **ГХ-МС**, а количество определяемых соединений увеличено с 5 до 39 (см. [19]).

Разработанный метод характеризуется небольшой продолжительностью реакции, “мягкими” условиями и высокими выходами продуктов реакции. Объединение стадий экстракции и получения летучих производных позволяет работать с различными биологическими жидкостями без дополнительных стадий депротенизации и фильтрации (рисунок).

Экспериментальная часть

Оборудование. Для определения метиловых эфиров **ЖК** использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C. Газовый хроматограф оборудован ка-

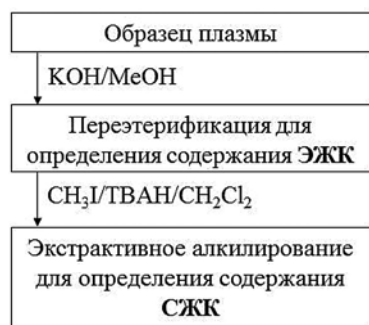


Рис. Схема последовательного определения **СЖК** и **ЭЖК** в образце плазмы крови

Таблица 1

Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования метиловых эфиров жирных кислот

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термоста- та колонки	3 минуты при температуре 50 °С, затем подъем до 140 °С со скоростью 20 °С/мин, затем подъем до 280 °С со скоростью 5°С/мин, затем 8 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250 °С
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280 °С. Температура квадруполя: 150 °С. Температура интерфейса: 280 °С. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга избранных ионов (SIM), см. табл. 2

пиллярной колонкой HP-5MS 30 м x 0.25 мм x 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования приведены в табл. 1.

Реактивы и стандарты. Смесь метиловых эфиров жирных кислот (F.A.M.E. Mix C4-C24, Supelco, кат № 18919), набор стандартов насыщенных жирных кислот с нечетным числом атомов углерода (Supelco, кат № OC9-1KT), с четным числом атомов углерода (Supelco, кат № EC10A-1KT) и ненасыщенных жирных кислот (Supelco, кат № UN10-1KT). Внутренний стандарт – дейтерированная пальмитиновая кислота d_{31} (Supelco, кат № 366897) и дейтерированный эфир пальмитиновой кислоты (Supelco, кат № 366897). CH_2Cl_2 , JTBaker, CH_3I , Sigma-Aldrich, водный раствор гидроксида тетрабутиламмония (ТБАГ), Sigma-Aldrich. Гидроксид натрия, Sigma-Aldrich. Гексан, Fluka Analytical.

Подготовка образцов для анализа. Последовательность определения СЖК и ЭЖК в образце приведена на рис. Образец плазмы крови объемом 0.1 мл отбирали в стеклянную пробирку для центрифугирования вместимостью 15 мл, прибавляли по 10 мкл внутренних стандартов (раствор пальмитиновой кислоты- d_{31} с концентрацией 10 мкг/мл и раствор метилового эфира пальмитиновой кислоты- d_{31} с концентрацией 10 мкг/мл). К полученному раствору прибавляли 1 мл 0.4 М раствора NaOH в метаноле, тщательно перемешивали в вортексе в течение 10 мин, затем добавляли 2 мл гексана и полученную смесь опять перемешивали 10 мин. После центрифугирования пробы верхний слой, содержащий ЭЖК, переносили в пробирки Эппендорф, выпаривали под током азота, перерастворяли в 100 мкл CH_2Cl_2 и анализировали методом ГХ-МС. В оставшийся нижний слой, содержащий СЖК, добавляли 3 мл фосфатного буфера pH = 8 и выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 5 минут, затем добавляли 200 мкл ТБАГ, 100 мкл CH_3I и 3 мл CH_2Cl_2 . Полученную смесь тща-

тельно перемешивали в течение 10 минут, затем центрифугировали и отделяли верхний водный слой. Оставшийся органический слой выпаривали под током азота, перерастворяли в 100 мкл CH_2Cl_2 и определяли СЖК методом ГХ-МС.

Газохроматографические времена удерживания, характеристичные ионы и относительные ошибки определения метиловых эфиров ЖК приведены в табл. 2.

Обсуждение результатов

Метод экстрактивного алкилирования был успешно применён для определения свободных жирных кислот в плазме крови [18]. Однако для проведения более детального исследования оказалось необходимым совместное определение СЖК и ЭЖК в одной пробе. На первой стадии пробоподготовки необходимо извлечь ЭЖК из матрицы пробы. Для этого применяли процедуру переэтерификации связанных ЖК в их метиловые эфиры с помощью 0.4 М раствора гидроксида натрия в метаноле и последующей экстракции гексаном. Условия протекания реакции можно охарактеризовать как мягкие, однако необходимо было проверить, не приводит ли влияние щелочной среды к образованию СЖК.

Требовало подтверждения отсутствие гидролиза ЭЖК, что могло бы приводить к завышенным результатам определения СЖК. Для этого образец плазмы крови разделили на две аликвоты: в одной аликвоте только определяли содержание СЖК, а во второй аликвоте определяли содержание СЖК после переэтерификации ЭЖК.

Относительное расхождение между результатами определения СЖК в двух аликвотах составило не более 15 %, что не превышает относительной погрешности метода, следовательно, на первой стадии пробоподготовки образование СЖК не происходит или происходит в незначительной степени.

Таблица 2

Масс-спектрометрические характеристики и времена удерживания метиловых эфиров жирных кислот

Метилловый эфир жирной кислоты	Время уд- ия, мин	<i>m/z</i>	Относительная погрешность, %	
			ЭЖК	СЖК
Ундециловая, C11:0	11.17	74, 143	14	17
Лауриновая, C12:0	12.68	74, 214	16	13
Тридекановая, C13:0	14.35	74, 228	15	8
Миристиновая, C14:0	16.14	74, 242	4	3
Миристолеиновая, C14:1	16.96	55, 208	4	7
<i>цис</i> -10-Пентадеценивая, C15:1	17.77	55, 222	16	-
Пентадекановая, C15:0	17.99	74, 256	2	7
Пальмитолеиновая, C16:1n-7	19.47	55, 236	3	11
Пальмитиновая, C16:0	19.88	74, 270	3	11
<i>цис</i> -10-Гептадеценивая, C17:1	21.32	55, 250	12	-
Маргариновая, C17:0	21.68	74, 284	2	16
γ -Линоленовая, C18:3n6	22.63	79, 292	5	8
Линолевая, C18:2n6c	22.92	294	5	16
Олеиновая, C18:1n9c	23.03	296	6	12
Линоленовая, C18:3n3	23.03	292	10	5
Линоэлаидиновая, C18:2t	23.05	294	-	-
Элаидиновая, C18:1n9t	23.13	296	8	12
Стеариновая, C18:0	23.47	74, 298	3	11
Арахидоновая, C20:4n6	25.75	79, 150	6	11
<i>цис</i> -5,8,11,14,17-Эйкозапентаеновая, C20:5	25.87	79, 201	8	14
<i>цис</i> -8,11,14-Эйкозатриеновая, C20:3n8	26.05	79, 320	5	13
<i>цис</i> -11,14-Эйкозадиеновая, C20:2	26.36	322	11	10
<i>цис</i> -11-эйкозеновая, C20:1	26.46	292	9	8
<i>цис</i> -11,14,17-Эйкозатриеновая, C20:3n11	26.50	320	17*	12
Арахидиновая, C20:0	26.88	74, 326	9	12
Генэйкозановая, C21:0	28.49	74, 340	15	4
<i>цис</i> -13,16-Докозадиеновая, C22:2	29.61	350	-	-
Эруковая, C22:1n9	29.67	320	25*	15
<i>цис</i> -4,7,10,13,16,19-Докозагексаеновая, C22:6n3	29.90	79, 91	13	5
Бегеновая, C22:0	30.06	74, 354	12	-
Трикозановая, C23:0	31.55	74, 368	24*	-
Нервоновая, C24:1n9	32.66	55, 348	4	-
Лигноцериновая, C24:0	33.01	74, 382	18*	6
Внутренний стандарт: пальмитиновая кислота-d ₃₁	19.47	301	-	-

Примечание: * – высокая погрешность обусловлена низкими концентрациями в исследуемых пробах, близкими к нижней границе диапазона измеряемых концентраций.

Процесс двухстадийного определения **ЖК** заключался в последовательном выполнении стадий переэтерификации **ЭЖК** в метиловые эфиры и экстрактивного метилирования **СЖК**. Переэтерификация **ЭЖК** протекает при pH > 11, в то время как экстрактивное алкилирование протекает при pH = 8. Таким образом, переход от первой стадии процедуры ко второй требовал коррекции pH пробы. Было опробовано три варианта создания необходимого pH в пробе: добавка серной или соляной кислот и разбавление пробы фосфатным буфером с pH = 8. Коэффициенты извлечения пальмитиновой кислоты составили 5, 10 и 73 %, соответственно. Количество реагентов, необходимые для достижения требуемого pH среды, определяли титриметрически. Установлено, что наибольший выход продук-

тов реакции экстрактивного метилирования достигается при коррекции pH с помощью фосфатного буферного раствора.

Для определения содержания жирных кислот в плазме крови использовали метод относительной градуировки с внутренним стандартом. Градуировочные графики строили по стандартным растворам метиловых эфиров **ЖК** в дихлорметане. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированную пальмитиновую кислоту d₃₁, которую добавляли в анализируемый образец в виде свободной кислоты (для определения **СЖК**) и в виде метилового эфира (для определения **ЭЖК**). Для построения градуировочных графиков площади хроматографических пиков определяемых соеди-

нений были отнесены к площади пика внутренне-го стандарта.

Построение градуировочных графиков осложнялось различными биогенными уровнями содержания в крови свободных и связанных **ЖК**. Требования к диапазону определяемых концентраций метиловых эфиров **ЖК** после первой и второй стадий подготовки проб не совпадали. Так, например, содержание свободной линолевой кислоты в плазме крови человека составляет 15-70 мкг/мл, а в этерифицированном виде может достигать 600 мкг/мл. Повышение воспроизводимости анализа достигали разбиением градуировочных графиков на линейные диапазоны для высоких и низких концентраций.

Оценку воспроизводимости метода осуществляли следующим образом: плазму крови, полученную от нескольких добровольцев, объединяли, тщательно перемешивали и разделяли на 15 частей равного объема. В каждой аликвоте определяли **СЖК** и **ЭЖК**. Результаты приведены в табл. 2. Относительная погрешность определения большинства **ЖК** была менее 15 %. Исключение составляют **ЖК**, фоновое содержание которых находится возле нижней границы диапазона измеряемых концентраций. Разработанную методику использовали для определения эндогенного содержания **ЭЖК** и **СЖК** в плазме крови доноров.

Заключение

Разработана двухстадийная процедура количественного определения **ЭЖК** и **СЖК** в плазме крови с использованием газовой хромато-масс-спектрометрии. Диапазон измеряемых концентраций составил 0.2-800 мкг/мл. Относительная погрешность определения большинства аналитов не превышает 15 %. При переходе от первой стадии (перезэтерификация **ЭЖК** в метиловые эфиры и экстракция их из матрицы) ко второй (экстрактивное метилирование **СЖК**) предложено проводить коррекцию pH пробы путем разбавления фосфатным буфером (pH = 8). Разработанная процедура позволяет проводить количественное определение **ЖК** в плазме крови на уровне биологически обусловленных концентраций. Показано отсутствие конверсии **ЭЖК** в **СЖК** в ходе процедуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gas chromatographic–mass spectrometric determination of plasma saturated fatty acids using pentafluorophenyl dimethylsilyl derivatization / Y.J. Yang [et al.] // *J Chromatogr. B*. 2000. V. 742. P. 37-46.
2. The effects of rosiglitazone and metformin on the plasma concentrations of rosiglitazone and metformin on the plasma concentrations of resistin in patients with type 2 diabetes mellitus / H.S. Jung [et al.] // *Metabolism*. 2005. V. 54. P. 314-320.
3. Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition // *Anal. Chim. Acta*. 2002. V. 465. P. 39-62.

4. Fast, sensitive and highly discriminant gas chromatography–mass spectrometry method for profiling analysis of fatty acids in serum / N. Sanchez-Avila [et al.] // *J Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 6864-6872.
5. Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA / L.Z. Yi [et al.] // *FEBS Letters*. 2006. V. 580. P. 6837-6845.
6. Jones P.M., Bennett M.J. Clinical applications of 3-hydroxy fatty acid analysis by gas chromatography–mass spectrometry // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V.1811. P. 657-662.
7. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures / A.I. Ostermann [et al.] // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2014. V. 91. P. 235-241.
8. Determination of the fatty acid profile of neutral lipids, free fatty acids and phospholipids in human plasma / N. Firl [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013. V. 51. P. 799-810.
9. Transesterification of fatty-acids from microorganisms and human blood-serum by trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) for GC analysis / K.D. Müller [et al.] // *Chromatographia*. 1990. V. 30. P. 245-248.
10. Maintenance of lower proportions of (N-6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (N-3) fatty-acids / W.E.M. Lands [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1180. P. 147-162.
11. Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans / E. Vognild [et al.] // *Lipids*. 1998. V. 33. P. 427-436.
12. Lepage G., Roy C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction // *J. Lipid Res*. 1986. V. 27. P. 114-120.
13. King I.B., Lemaitre R.N., Kestin M. Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesteroles: investigation of a biomarker of total fat intake // *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. V. 83. P. 227-236.
14. Plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids as biomarkers of their dietary intakes: across-sectional study within a cohort of middle-aged Frenchmen and women / P. Astorg [et al.] // *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008. V. 62. P. 1155-1161.
15. Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans / K.L. Weaver [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 15400-15407.
16. Simultaneously quantitative measurement of comprehensive profiles of esterified and non-esterified fatty acid in plasma of type 2 diabetic patients / L.Yi [et al.] // *Chem. Phys. Lipids*. 2007. V. 150. P. 204-216.
17. Validation of a new procedure to determine plasma fatty acid concentration and isotopic enrichment / B.W. Patterson [et al.] // *J. Lipid Res*. 1999. V. 40. P. 2118-2124.
18. Крылов А.И., Хлебникова Н.С., Полуяктова С.К. Газохроматографическое определение свободных жирных кислот крови с применением экстрактивного алкилирования // *Журн. анал. химии*. 1991. Т. 46, № 12. С.2428-2435.
19. Хромато-масс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием экстрактивного алкилирования / А.И. Уколов [и др.] // *Журн. анал. химии*. 2015; в печати.

REFERENCES

1. Yang Y.J., Choi M.H., Paik M.J., Yoon H.R., Chunga B.C. Gas chromatographic–mass spectrometric determination of plasma saturated fatty acids using pentafluorophenyl dimethylsilyl

- derivatization. *J Chromatogr. B*, 2000, vol. 742, pp. 37-46. Doi: 10.1016/S0378-4347(00)00098-0.
2. Jung H.S., Youn B.S., Cho Y.M., Yu K.Y. The effects of rosiglitazone and metformin on the plasma concentrations of rosiglitazone and metformin on the plasma concentrations of resistin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2005, vol. 54, no. 3, pp. 314-320. Doi: 10.1016/j.metabol.2004.05.019.
 3. Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Anal. Chim. Acta*, 2002, vol. 465, no. 1-2, pp. 39-62. Doi: 10.1016/S0003-2670(02)00397-5.
 4. Sanchez-Avila N., Mata-Granadosa J.M., Ruiz-Jimenez J., Luque de Castro M.D. Fast, sensitive and highly discriminant gas chromatography–mass spectrometry method for profiling analysis of fatty acids in serum. *J. Chromatogr. A*, 2009, vol. 1216, no. 40, pp. 6864-6872. Doi: 10.1016/j.chroma.2009.08.045.
 5. Yi L.Z., He J., Liang Y.Z., Yuan D.L., Chau F.-T. Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA. *FEBS Letters*, 2006, vol. 580, pp. 6837-6845. Doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.043.
 6. Jones P.M., Bennett M.J. Clinical applications of 3-hydroxy fatty acid analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, vol.1811, no. 11, pp. 657-662. Doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.026.
 7. Ostermann A.I., Müller M., Willenberg I., Scheb N.H. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2014, vol. 91, no. 6, pp. 235-241. Doi: 10.1016/j.plefa.2014.10.002.
 8. Firl N., Kienberger H., Hauser T., Rychlik M. Determination of the fatty acid profile of neutral lipids, free fatty acids and phospholipids in human plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, vol. 51, no. 4, pp. 799-810. Doi: 10.1515/cclm-2012-0203.
 9. Müller K.D., Husmann H., Nalik H.P., Schomburg G. Transesterification of fatty-acids from microorganisms and human blood-serum by trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) for GC analysis. *Chromatographia*, 1990, vol. 30, no. 5-6, pp. 245-248. Doi: 10.1007/BF02319701.
 10. Lands W.E.M., Libelt B., Morris A., Kramer N.C., Prewitt T.E., Bowen P., Schmeisser D., Davidson M.H., Burns J.H. Maintenance of lower proportions of (N-6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (N-3) fatty-acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, vol. 1180, no. 2, pp. 147-162. Doi: 10.1016/0925-4439(92)90063-S.
 11. Vognild E., Elvevoll E.O., Brox J., Olsen R.L., Barstad H., Aursand M., Osterud B., Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids*, 1998, vol. 33, no. 4, pp. 427-436. Doi: 10.1007/s11745-998-0224-8.
 12. Lepage G., Roy C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 1986, vol. 27, pp. 114-120.
 13. King I.B., Lemaitre R.N., Kestin M. Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesterolesters: investigation of a biomarker of total fat intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006, vol. 83, pp. 227-236.
 14. Astorg P., Bertrais S., Laporte F., Arnault N., Estaquio C., Galan P., Favier A., Hercberg S. Plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids as biomarkers of their dietary intakes: across-sectional study within a cohort of middle-aged Frenchmen and women. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2008, vol. 62, pp. 1155-1161.
 15. Weaver K.L., Ivester P., Seeds M., Case L.D., Arm J.P., Chilton F.H. Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, pp. 15400-15407.
 16. Yi L., He J., Liang Y., Yuan D., Gao H., Zhou H. Simultaneously quantitative measurement of comprehensive profiles of esterified and non-esterified fatty acid in plasma of type 2 diabetic patients. *Chem. Phys. Lipids.*, 2007, vol. 150, pp. 204-216. Doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.08.002.
 17. Patterson B.W., Zhao G., Elias N., Hachey D.L., Klein S. Validation of a new procedure to determine plasma fatty acid concentration and isotopic enrichment. *J. Lipid Res.*, 1999, vol. 40, pp. 2118-2124.
 18. Krylov A.I., Khlebnikova N.S., Poluyaktova S.K. [Gas chromatographic determination of free fatty acids of blood using extractive alkylation]. *Zhurnal analiticheskoi khimii* [Journal of Analytical Chemistry], 1991, vol. 46, no. 12, pp. 2428-2435 (in Russian).
 19. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. [GC-MS determination of free fatty acids in plasma and urine using extractive alkylation]. *Zhurnal analiticheskoi khimii* [Journal of Analytical Chemistry], 2015, article in press (in Russian).