

SCIEX液相色谱串联质谱系统测定人血清中13种胆汁酸浓度

Determination of 13 Bile Acids in Serum by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

荆莲艳 (Jing Lianyan), 李国庆 (Li Guoqing)
SCIEX China Clinical BU

Keywords: Serum; Bile Acids; Cholic acid (CA); Glycocholic acid (GCA); Glycine ursodeoxycholic acid (GUDCA); Taurine cholic acid (TCA); Taurine ursodeoxycholic acid (TUDCA); Ursodeoxycholic acid (UDCA); Goose deoxycholic acid (CDCA); Glycine goose deoxycholic acid (GCDCA); Taurine deoxycholic acid (TDCA); Taurine goose deoxycholic acid (TCDCA); Deoxycholic acid (DCA); Calcic acid (LCA); Taurine cholic acid (TLCA)

引言

胆汁酸是胆汁中存在的一类胆烷酸的总称，按结构可分为游离型胆汁酸和结合型胆汁酸，游离型胆汁酸包括胆酸 (CA)、去氧胆酸 (DCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA) 和少量的石胆酸 (LCA)；结合型胆汁酸包括甘氨酸胆酸 (GCA)、甘氨酸鹅去氧胆酸 (GCDCA)、牛磺胆酸 (TCA) 和牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA) 等。胆汁酸参与肠肝循环，肝胆疾病引起胆汁酸的肝肠循环障碍，是血清胆汁酸异常的主要因素，而血清胆汁酸变化亦会影响肝脏对胆汁酸的合成和分泌。故血清胆汁酸是衡量肝胆功能正常与否的重要标志。

目前胆汁酸的分析方法主要包括气相色谱、GC-MS，高效液相色谱、液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。其中 LC-MS/MS。具有方法简便、灵敏，特异性好，适合较大通量样本的分析。因此，本方法采用SCIEX液相色谱串联质谱系统，以待测目标物的同位素标记物为内标，测定人血清中胆汁酸有胆酸 (CA)、甘氨酸胆酸 (GCA)、甘氨酸熊脱氧胆酸 (GUDCA)、牛磺胆酸 (TCA)、牛磺熊脱氧胆酸 (TUDCA)、熊脱氧胆酸 (UDCA)、鹅脱氧胆酸 (CDCA)、甘氨酸鹅去氧胆酸 (GCDCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA)、脱氧胆酸 (DCA)、石胆酸 (LCA)、牛磺石胆酸 (TLCA) 浓度。

实验部分

样品处理: 取血浆样品50 μ L，先后加入25 μ L 250 nM的胆汁酸混合内标溶液和150 μ L 乙腈，混匀，15000 rpm 4 $^{\circ}$ C离心10min，转移上清液100 μ L，再加入100 μ L纯水稀释，混匀，取上清液100 μ L，LC-MS/MS分析。

色谱条件: 色谱柱使用Phenomenex (Gemini NX 3 μ C18 110A 100 \times 2.0 mm) 进行分离，流动相选用水 (含0.1%甲酸和0.5%氨水) 作为A相，和乙腈作为B相，柱温设为40 $^{\circ}$ C，进行梯度洗脱，液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件。

时间	流速	A相	B相
min	mL/min	%	%
0.00	0.40	75.0	25.0
4.00	0.40	65.0	35.0
6.50	0.40	50.0	50.0
6.60	0.40	5.0	95.0
8.90	0.40	5.0	95.0
9.00	0.40	75.0	25.0
12.00	0.40	75.0	25.0

质谱条件: 采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为55和45 psi，脱溶剂气温度为600 $^{\circ}$ C；气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为30 psi，碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为6 psi；喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为 -3500V。为了获取较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE)，目标物定量离子对、

定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表2。

表2. 13种胆汁酸及内标物MRM离子通道参数。

化合物	离子对 Q1 / Q3 m/z	去簇电压 DP Volts	碰撞电压 CE Volts	驻留时间 Dwell msec
Period 1 4.0 min				
CA	407.1/407.1 ^a	-165	-20	25
	407.1/343.3 ^b	-165	-48	25
GCA	464.3/74.1 ^a	-150	-78	25
	464.3/464.3 ^b	-150	-15	25
GUDCA	448.3/74 ^a	-150	-70	25
	448.3/386.1 ^b	-150	-50	25
TCA	514.3/80 ^a	-200	-135	25
	514.3/124.1 ^b	-200	-67	25
TUDCA	498.3/80 ^a	-210	-130	25
	498.3/498.4 ^b	-210	-35	25
UDCA	391.3/391.3 ^a	-165	-25	25
	391.3/355.2 ^b	-165	-48	25
GCA-d5	469.3/74.1 ^a	-150	-78	25
	469.3/469.3 ^b	-150	-15	25
Period 2 1.9 min				
CDCA	391.3/391.3 ^a	-160	-24	30
	391.3/373.2 ^b	-160	-46	30
GCDCA	448.3/74 ^a	-150	-72	30
	448.3/386.4 ^b	-150	-47	30
TCDCA	498.3/80 ^a	-200	-130	30
	498.3/498.3 ^b	-200	-35	30
TDCA	498.3/80.1 ^a	-210	-133	30
	498.3/355.1 ^b	-210	-67	30
DCA	391.3/391.3 ^a	-165	-25	30
	391.3/345.2 ^b	-165	-46	30
CDCA-d4	395.3/395.3	-160	-24	30
DCA-d5	396.3/396.3	-165	-25	30
GCDCA-d7	455.3/74	-150	-72	30
Period 2 1.9 min				
LCA	375.3/375.3 ^a	-210	-30	90
	375.3/357.3 ^b	-210	-48	90
TLCA	482.3/80 ^a	-180	-135	90
	482.3/124 ^b	-180	-63	90
LCA-d4	379.3/379.3	-210	-30	90

结果与讨论

13种胆汁酸的回归方程和线性范围见表3，r均大于0.997，胆汁酸在相应的浓度范围内线性良好。

表3. 回归方程和线性范围

化合物	回归方程	相关系数r	线性范围nM
CA	$y = 0.01445x + 0.01495$	$r = 0.99897$	2~5000
GCA	$y = 0.00898x + 0.00461$	$r = 0.99876$	1~5000
GUDCA	$y = 0.01242x + 3.06617e-4$	$r = 0.99893$	2~5000
TCA	$y = 0.01976x - 0.00787$	$r = 0.99910$	2~5000
TUDCA	$y = 0.02370x + -0.00205$	$r = 0.99892$	1~5000
UDCA	$y = 0.00819x + -0.00391$	$r = 0.99919$	10~5000
CDCA	$y = 0.00359x + 0.00239$	$r = 0.99839$	5~5000
GCDCA	$y = 0.09026x + 0.02005$	$r = 0.99733$	2~5000
TCDCA	$y = 0.01053x + 2.11234e-4$	$r = 0.99947$	1~5000
TDCA	$y = 0.00998x + -2.66326e-4$	$r = 0.99822$	1~5000
DCA	$y = 0.00835x + 0.01426$	$r = 0.99915$	5~5000
LCA	$y = 0.00125x + 8.60809e-4$	$r = 0.99809$	10~5000
TLCA	$y = 0.02124x + -2.99630e-4$	$r = 0.99853$	0.5~5000

为了考察方法的重现性及准确性，分别进行胆汁酸基质加标的精密度和回收率方法验证。从表4可以看出，胆汁酸低、中、高浓度的精密度的(RSD)均在10%以内，回收率均在95.32%~106.40%之内。

表4. 胆汁酸加标回收率和精密度的。

化合物	加标量(nM)	检测结果 (nM)	RSD %	回收率 %
CA	0	132.81	6.84	/
	100	240.91	10.07	103.48%
	400	535.10	6.58	100.40%
GCA	0	487.68	5.29	/
	400	856.88	4.78	96.53%
	1000	1497.64	5.52	100.67%
GUDCA	0	177.19	4.28	/
	100	280.01	8.17	101.00%
	400	565.76	5.6	98.02%
TCA	0	131.82	6.01	/
	100	240.63	4.07	103.80%
	400	547.16	5.95	102.88%

表4. 胆汁酸加标回收率和精密度。(续)

化合物	加标量(nM)	检测结果 (nM)	RSD %	回收率 %
TUDCA	0	18.01	8.29	/
	10	29.80	7.16	106.40%
	100	120.80	3.31	102.37%
UDCA	0	111.50	5.36	/
	100	218.78	3.65	103.40%
	400	518.92	6.35	101.45%
CDCA	0	266.28	5.76	/
	100	357.56	5.17	97.62%
	400	652.18	3.67	97.88%
GCDCA	0	1620.27	6.41	/
	1000	2575.87	6.44	98.31%
	2000	3533.84	5.84	97.61%
TCDCA	0	71.15	5.55	/
	100	181.38	2.49	105.98%
	400	480.47	1.82	101.98%
TDCA	0	70.48	5.4	/
	10	82.81	6.4	102.90%
	100	180.38	4.99	105.81%
DCA	0	221.80	4.98	/
	100	313.27	3.09	97.30%
	400	619.04	4.06	99.56%
LCA	0	32.41	2.53	/
	10	41.85	2.32	98.70%
	100	131.32	2.79	99.20%
TLCA	0	4.29	6.83	/
	5	8.85	2.09	95.32%
	10	14.64	6.63	102.50%

总结

本方法使用SCIEX 高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统，克服了复杂血清样本基质中胆汁酸浓度测定带来的挑战。同时结合成熟的样品提取手段，实现了血清中13种胆汁酸的浓度测定。因此，本方法采用ESI-电喷雾离子源和MRM多反应监测模式，可对血清中13种胆汁酸进行快速的定性和定量分析。该方法具有线性好、准确度高等优点，且每个样本分析仅需12 min，具有较高的分析通量。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9820-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX