

血清中 15 种胆汁酸含量的测定

AB10021

应用及技术服务部

摘要: **目的** 建立同时测定血清中 15 种胆汁酸类化合物的检测方法。**方法** 以同位素胆汁酸为内标, 使用甲醇对血清中胆汁酸进行提取, 经 Cleanert PEP 96 微孔板净化后, 采用 Phenomenex Kinetex EVO C18 色谱柱对 15 种胆汁酸进行分离, 液质串联质谱在负离子模式下采用 MRM 进行定性定量分析血清中胆汁酸的浓度。**结果** 15 种胆汁酸分离度良好, 在 2~1000nmol/L 范围线性相关系数均大于 0.990; 目标物在 5nM~500nM 间分别三个加标水平下回收率为 70%~120%, 相对标准偏差均在 10%内。**结论** 该方法灵敏度高, 基质干扰较小, 适用于血清中胆汁酸体外的分析研究。

关键词: 胆汁酸; Cleanert PEP 96 Well Microphates; Kinetex EVO C18; LCMSMS; 牛血清

样品信息

表 1. 胆汁酸类化合物待测组分与内标物质信息

中文名称	英文名称	缩写	CAS 号	分子式
胆酸	Cholic acid	CA	81-25-4	C ₂₄ H ₄₀ O ₅
甘氨酸胆酸	Glycocholic acid hydrate	GCA	475-31-0	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆
牛黄胆酸	Taurocholic acid	TCA	81-24-3	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S
胆酸-D4	Cholic acid-[d4]	d4-CA	——	C ₂₄ H ₃₆ D ₄ O ₅
脱氧胆酸	Deoxycholic acid	DCA	83-44-3	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
甘氨酸脱氧胆酸	Glycodeoxycholic acid	GDCA	360-65-6	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅
牛磺脱氧胆酸钠	Taurodeoxycholic acid sodium salt	TDCA	1180-95-6	C ₂₆ H ₄₄ NNaO ₆ S
鹅脱氧胆酸	Chenodeoxycholic acid	CDCA	474-25-9	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
甘氨酸鹅脱氧胆酸钠	Glycochenodeoxycholic acid sodium salt	GCDCA	16564-43-5	C ₂₆ H ₄₂ NNaO ₅
牛黄鹅脱氧胆酸钠	Taurochenodeoxycholic acid sodium salt	TCDCA	6009-98-9	C ₂₆ H ₄₄ NNaO ₆ S

中文名称	英文名称	缩写	CAS 登录	分子式
熊脱氧胆酸	Ursodeoxycholic acid	UDCA	128-13-2	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
甘氨熊脱氧胆酸	Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA	64480-66-6	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅
牛黄熊脱氧胆酸	Tauroursodeoxycholic acid Dihydrate	TUDCA	14605-22-2	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S
甘氨熊脱氧胆酸-D4	Glycoursodeoxycholic acid-[d4]	d4-GUDCA	——	C ₂₆ H ₄₁ D ₄ NO ₆
石胆酸	Lithocholic acid	LCA	434-13-9	C ₂₄ H ₄₀ O ₃
甘氨石胆酸	Glycolithocholic acid	GLCA	474-74-8	C ₂₆ H ₄₃ NO ₄
牛黄石胆酸	Taurolithocholic acid sodium salt	TLCA	6042-32-6	C ₂₆ H ₄₄ NNaO ₅ S

实验部分

仪器、试剂与材料

主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪（AB SCIEX API 4500MD），配有电喷雾离子源（ESI）；
96 孔板正压固相萃取装置（Agela SPE-M96）。

试剂材料

96 微孔 SPE 净化板：Cleanert PEP 96 Well Microplates，5mg/1mL 2/pkg；
实验用水、甲醇、正己烷、乙酸铵为色谱级；

样品基质

实验采用的基质为脱本底 EDTA 抗凝牛血清样本；

溶液配制

5mM 乙酸铵溶液：准确称取 0.385g 乙酸铵加入至 1000mL 纯水中，混匀。

17 种胆汁酸及内标标准溶液（50 mg/L）：外购。标准溶液避光-18℃保存。

胆汁酸混合标准溶液（2 mg/L）：分别吸取 40 μ L 胆汁酸单标溶液，甲醇定容至 1 mL 备用。

内标混合溶液（1000 nmol/L）：准确分别吸取适量内标储备液，甲醇定容至 1 mL 备用。

基质标准工作曲线：分别精确吸取适量的混合标准溶液和内标混合溶液，用

空白基质溶液稀释至质量浓度分别为 2 nmol/L、5 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、500 nmol/L，内标终浓度 100 nmol/L，供液相色谱-质谱联用仪测定。

分析步骤

样品制备：

取 200 μL +200 μL 甲醇（含内标），涡旋混匀，10000g5min 离心，上清完全转移至活化后 96 微孔 SPE 净化板（400 μL）进行待净化。具体空白、样品、质控移取体积见下表 2。

净化：

- 活化：依次使用 400uL 甲醇、400ul 水对 96 微孔 SPE 净化板进行活化；
- 上样：400 μL 全部上样，弃去流出液；
- 淋洗：依次 400 μL 水，400 μL 正己烷，淋洗去杂，弃去流出液，压干净化板；
- 洗脱：取 200 μL 甲醇进行洗脱，分两次洗脱，每次洗脱加入 100 μL，收集全部洗脱液，混匀，待上样。

净化过程中需在有光源的情况下观察流速，流速控制在每孔 3~5s/滴。

表 2. 胆汁酸类化合物待测组分与内标物质信息

样品编号	基质类型	基质体积 μL	内标体积 μL	加标体积 μL	甲醇 μL
Sample	EDTA 牛血清	200	20	0	180
BK	脱本底血清	200	0	0	200
MB	脱本底血清	200	20	0	180
SK1*6（5nM）	脱本底血清	200	20	50（20nM）	130
SK2*6（10nM）	脱本底血清	200	20	50（40nM）	130
SK3*6（100nM）	脱本底血清	200	20	50（400nM）	130
SK4*6（500nM）	脱本底血清	200	20	50（2000nM）	130

测定

色谱条件

- 色谱柱： Phenomenex Kinetex EVO C18 （2.1 × 100 mm, 2.6 μm, 100 Å）；
- 流动相 A 相：水（含 5 mM 乙酸铵）；

流动相 B 相：甲醇；

流 速：0.4 mL/min；

柱 温：40 °C；

进样量：5 µL；

梯度程序见表 3：

表3. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	70	30
2.5	0.4	45	55
8.2	0.4	15	85
9.7	0.4	15	85
10.0	0.4	70	30
12.0	0.4	70	30

质谱条件

离子源类型：电喷雾离子源（ESI）

扫描方式：多反应监测负离子模式（MRM）

喷雾针电压：负源-4000 V

离子源温度：600 °C

加热器（GS1）：55 psi

辅助加热气（GS2）：45 psi

气帘气（CUR）：30 psi

碰撞气（CAD）：8 psi

为获得较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压（DP）和碰撞电压（CE），目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均经过系统优化，优化信息参见表4。

表4. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
CA	407.1	343.5	-165	-40
GCA	464.3	74.2	-150	-75
TCA	514.2	79.9	-170	-117

d-CA-1	411.0	411*	-210	-30
	411.0	347.3	-210	-43
DCA	391.2	345.1	-180	-45
GDCA	448.3	74	-150	-75
TDCA	498.3	79.9	-90	-126
CDCA	391.0	391	-100	-27
GCDCA	448.3	74.1	-170	-70
TCDCA	498.3	80	-160	-116
UDCA	390.9	390.9	-100	-27
GUDCA	448.3	74.2	-150	-70
TUDCA	498.3	80	-210	-120
d-GUDCA	452.0	452*	-150	-30
	452.0	74.1	-150	-55
LCA	374.9	374.9	-150	-30
GLCA	432.3	74	-180	-60
TLCA	482.5	80	-200	-114

注：表 3 中标 “*” 为定量离子。

结果与讨论

15 种胆汁酸在浓度 2 nmol/L~1000 nmol/L 范围内分离度、灵敏度、线性范围均良好。根据人体血清中胆汁酸浓度的大致水平范围，在空白基质的基础上分别进行低、中、高水平浓度的加标回收实验，其中 TUDCA、LCA、GLCA、TLCA 的 3 个添加水平分别为 5 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L，其余物质的添加水平分别为 10 nmol/L、100 nmol/L、500 nmol/L，由表 5、6 可以看出，胆汁酸低、中、高浓度的回收率均在 70%~120%范围，精密度 RSD 均在 10%以内。测试结果表明血清样品分的回收率和精密度良好。本实验所建立的测定血清中 15 种胆汁酸的方法能够满足生物样本的检测要求。

表 5. 牛血清基质加标回收实验结果

化合物	加标量	检测结果					
	(nM)						
CA	10	9.36	9.21	10.24	9.75	10.10	9.24
	100	82.26	80.28	78.85	79.61	83.70	81.47
	500	476.67	493.10	500.08	535.28	494.37	497.42

GCA	10	7.66	7.12	7.67	7.91	7.35	7.01
	100	78.26	75.95	77.53	75.20	78.39	74.56
	500	456.91	483.97	482.19	513.94	485.34	472.52
TCA	10	9.50	9.18	9.56	9.52	9.38	9.28
	100	83.88	80.69	81.03	78.87	82.60	78.65
	500	441.24	456.96	471.17	501.05	477.30	480.75
DCA	10	11.79	11.33	11.06	11.86	11.88	11.49
	100	129.02	127.31	127.93	120.02	124.82	129.65
	500	497.53	483.76	477.29	500.67	512.66	499.62
GDCA	10	11.96	11.20	11.99	11.68	11.20	12.13
	100	114.34	115.06	115.04	111.16	114.80	112.53
	500	505.90	495.28	516.45	494.03	509.67	512.84
TDCA	10	12.16	12.07	13.68	11.74	12.27	12.14
	100	116.82	113.84	114.36	111.20	111.64	121.48
	500	476.71	460.04	488.31	470.18	476.11	489.09
CDCA	10	10.94	10.22	10.39	10.92	11.12	10.78
	100	83.74	81.75	80.33	81.08	85.18	82.95
	500	515.28	499.75	517.37	488.68	507.27	524.36
GCDCA	10	11.57	10.91	10.85	11.55	11.14	11.96
	100	111.09	108.50	113.65	105.21	110.26	117.87
	500	519.45	492.35	521.57	509.33	514.56	510.69
TCDCA	10	11.75	11.01	11.38	11.85	11.29	12.17
	100	107.44	105.54	107.01	106.30	105.18	113.27
	500	494.36	494.62	519.75	506.59	520.90	517.66
UDCA	10	10.57	10.42	10.96	10.46	10.92	10.68
	100	88.19	84.70	83.81	82.81	86.38	90.14
	500	515.43	505.31	529.59	548.39	551.65	557.55
GUDCA	10	10.23	10.31	11.01	10.70	10.51	10.25
	100	85.91	79.07	80.45	79.15	83.43	86.59
	500	450.26	450.93	464.37	505.46	476.10	488.27
TUDCA	5	5.50	5.44	5.35	5.14	5.58	5.58
	10	11.62	11.63	12.21	12.48	11.83	12.52
	100	76.86	73.77	72.56	67.86	76.31	77.81
LCA	5	4.85	4.58	4.37	4.09	4.25	4.41
	10	11.02	11.55	11.80	11.83	11.68	12.03
	100	110.73	115.58	113.10	107.74	113.13	120.31
GLCA	5	4.77	4.28	4.25	4.38	4.13	4.63
	10	11.91	11.83	11.68	11.23	12.70	12.08
	100	121.22	120.32	119.14	114.83	119.64	118.55

TLCA	5	5.42	4.60	4.64	4.43	4.52	5.21
	10	11.62	11.63	12.21	12.48	11.83	12.52
	100	106.16	104.72	102.27	99.23	101.97	107.21

表 6. 牛血清基质加标回收率与 RSD 结果

化合物	加标量 (nM)	回收率%						RSD%
CA	10	93.6%	92.1%	102.4%	97.5%	101.0%	92.4%	4.7%
	100	82.3%	80.3%	78.9%	79.6%	83.7%	81.5%	2.2%
	500	95.3%	98.6%	100.0%	107.1%	98.9%	99.5%	3.9%
GCA	10	76.6%	71.2%	76.7%	79.1%	73.5%	70.1%	4.7%
	100	78.3%	76.0%	77.5%	75.2%	78.4%	74.6%	2.1%
	500	91.4%	96.8%	96.4%	102.8%	97.1%	94.5%	3.9%
TCA	10	95.0%	91.8%	95.6%	95.2%	93.8%	92.8%	1.6%
	100	83.9%	80.7%	81.0%	78.9%	82.6%	78.6%	2.5%
	500	88.2%	91.4%	94.2%	100.2%	95.5%	96.1%	4.4%
DCA	10	117.9%	113.3%	110.6%	118.6%	118.8%	114.9%	2.9%
	100	129.0%	127.3%	127.9%	120.0%	124.8%	129.7%	2.8%
	500	99.5%	96.8%	95.5%	100.1%	102.5%	99.9%	2.6%
GDCA	10	119.6%	112.0%	119.9%	116.8%	112.0%	121.3%	3.5%
	100	114.3%	115.1%	115.0%	111.2%	114.8%	112.5%	1.4%
	500	101.2%	99.1%	103.3%	98.8%	101.9%	102.6%	1.8%
TDCA	10	121.6%	120.7%	136.8%	117.4%	122.7%	121.4%	5.5%
	100	116.8%	113.8%	114.4%	111.2%	111.6%	121.5%	3.3%
	500	95.3%	92.0%	97.7%	94.0%	95.2%	97.8%	2.3%
CDCA	10	109.4%	102.2%	103.9%	109.2%	111.2%	107.8%	3.3%
	100	83.7%	81.8%	80.3%	81.1%	85.2%	82.9%	2.2%
	500	103.1%	99.9%	103.5%	97.7%	101.5%	104.9%	2.6%
GCDCA	10	115.7%	109.1%	108.5%	115.5%	111.4%	119.6%	3.9%
	100	111.1%	108.5%	113.6%	105.2%	110.3%	117.9%	3.9%
	500	103.9%	98.5%	104.3%	101.9%	102.9%	102.1%	2.0%
TCDCA	10	117.5%	110.1%	113.8%	118.5%	112.9%	121.7%	3.7%
	100	107.4%	105.5%	107.0%	106.3%	105.2%	113.3%	2.8%
	500	98.9%	98.9%	103.9%	101.3%	104.2%	103.5%	2.4%
UDCA	10	105.7%	104.2%	109.6%	104.6%	109.2%	106.8%	2.1%
	100	88.2%	84.7%	83.8%	82.8%	86.4%	90.1%	3.2%
	500	103.1%	101.1%	105.9%	109.7%	110.3%	111.5%	4.0%

GUDCA	10	102.3%	103.1%	110.1%	107.0%	105.1%	102.5%	2.9%
	100	85.9%	79.1%	80.5%	79.2%	83.4%	86.6%	4.1%
	500	90.1%	90.2%	92.9%	101.1%	95.2%	97.7%	4.6%
TUDCA	5	110.0%	108.8%	107.1%	102.9%	111.7%	111.6%	3.1%
	10	116.2%	116.3%	122.1%	124.8%	118.3%	125.2%	3.4%
	100	76.9%	73.8%	72.6%	67.9%	76.3%	77.8%	5.0%
LCA	5	97.0%	91.7%	87.4%	81.7%	85.0%	88.2%	6.0%
	10	110.2%	115.5%	118.0%	118.3%	116.8%	120.3%	3.0%
	100	110.7%	115.6%	113.1%	107.7%	113.1%	120.3%	3.8%
GLCA	5	95.3%	85.6%	85.0%	87.6%	82.6%	92.5%	5.5%
	10	119.1%	118.3%	116.8%	112.3%	127.0%	120.8%	4.1%
	100	121.2%	120.3%	119.1%	114.8%	119.6%	118.5%	1.9%
TLCA	5	108.4%	92.0%	92.8%	88.5%	90.4%	104.1%	8.5%
	10	116.2%	116.3%	122.1%	124.8%	118.3%	125.2%	3.4%
	100	106.2%	104.7%	102.3%	99.2%	102.0%	107.2%	2.9%

实验谱图

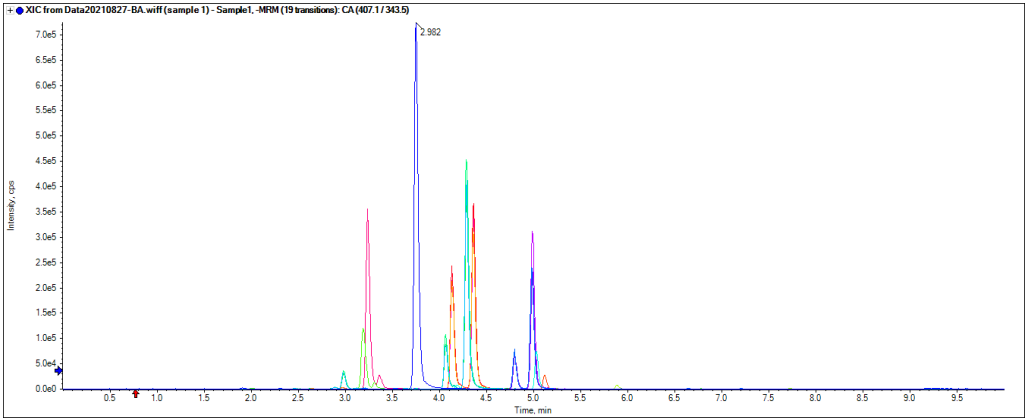


图 1. EDTA 牛血清样品本底总 XIC 色谱图

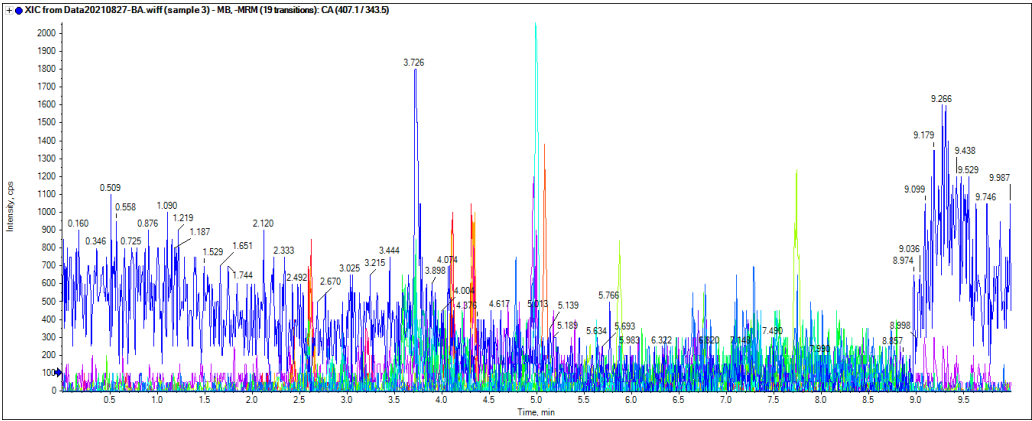


图 2. EDTA 牛血清样品脱本底后总 XIC 色谱图

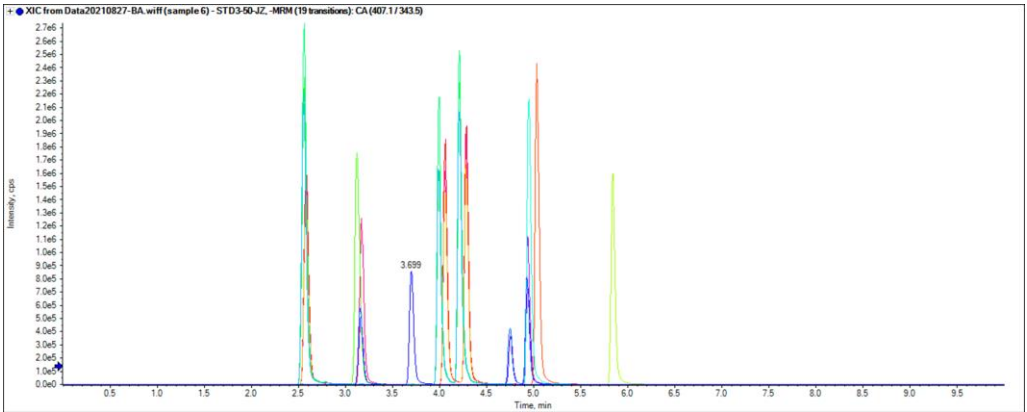


图 3. 50nM 牛血清基质加标总 XIC 色谱图

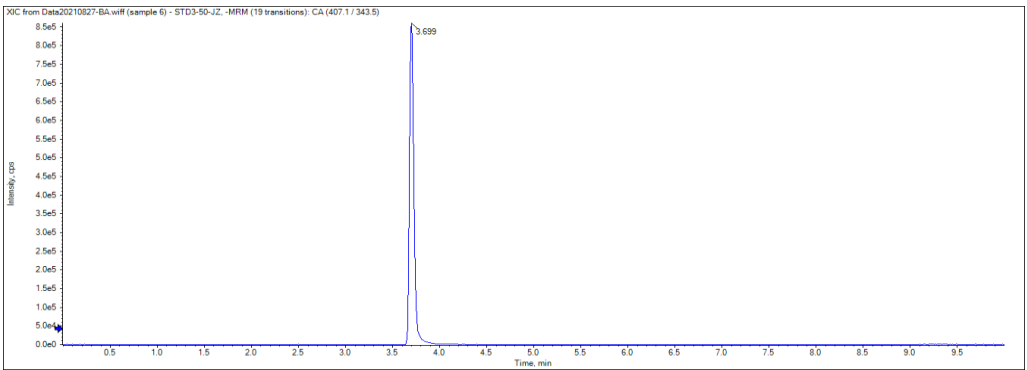


图 4. CA 分离色谱图

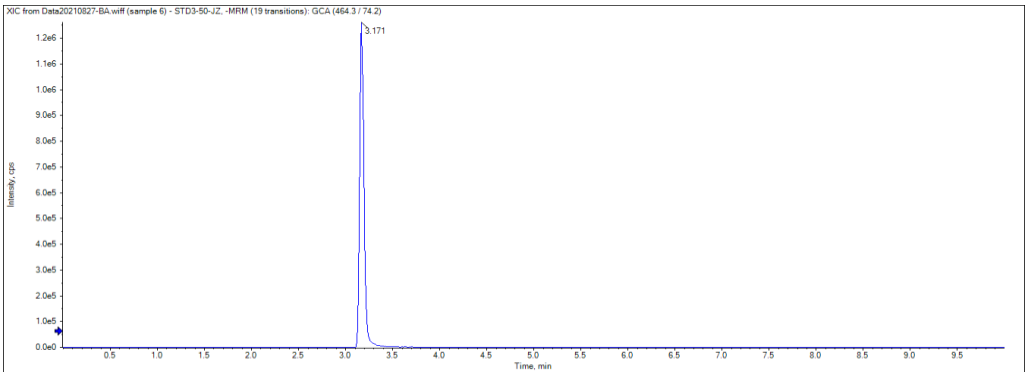


图 5. GCA 分离色谱图

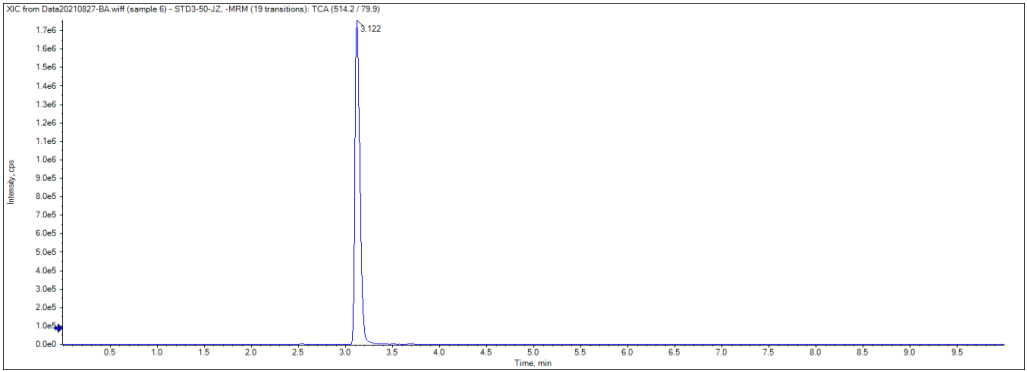


图 6. TCA 分离色谱图

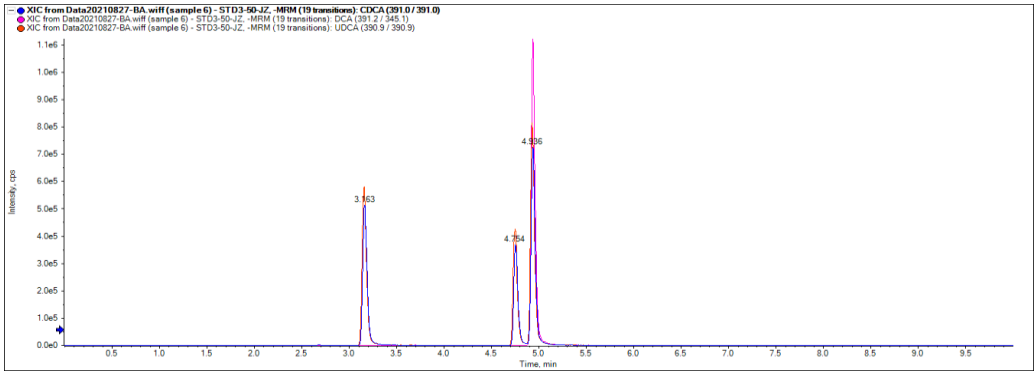


图 7. DCA/CDCA/UDCA 分离色谱图

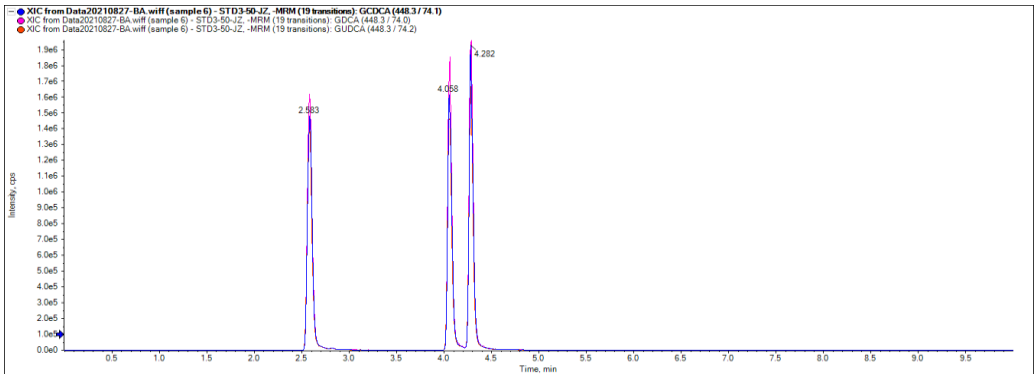


图 8. GDCA/GCDCA/GUDCA 分离色谱图

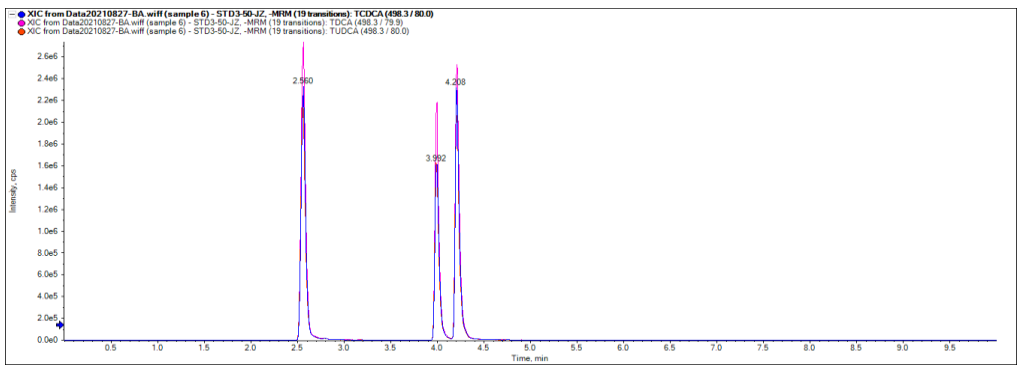


图 9. TDCA/TCDCA/TUDCA 分离色谱图

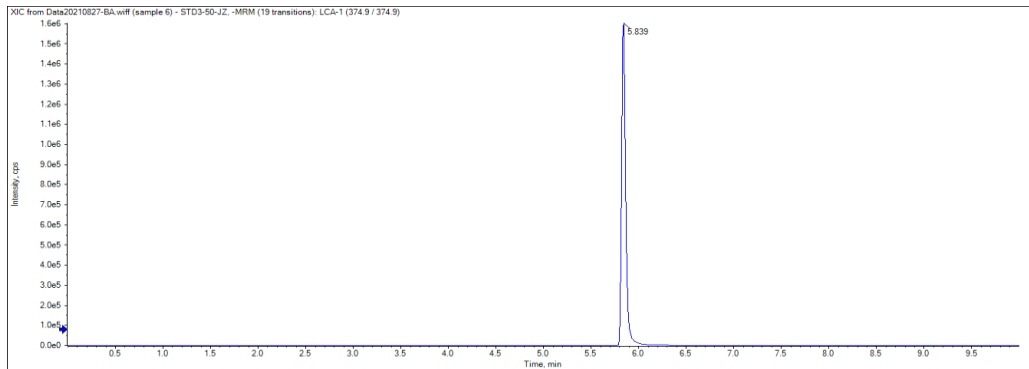


图 10. LCA 分离色谱图

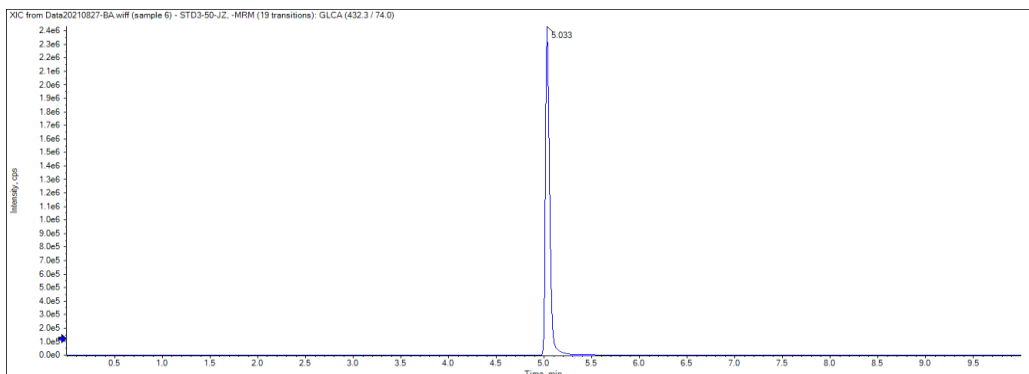


图 11. GLCA 分离色谱图

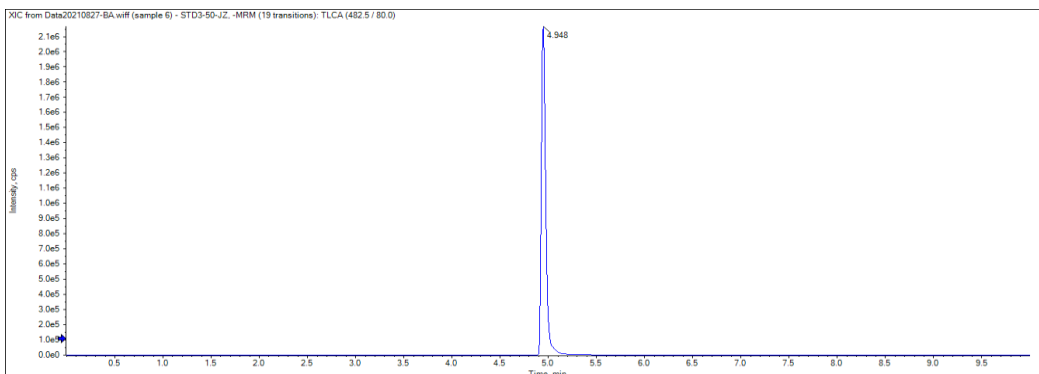


图 12. TLCA 分离色谱图

结论

本方法使用甲醇提取，Cleanert PEP 96 Well Microplates 固相萃取净化手段，Phenomenex Kinetex EVO C18 色谱柱结合液相色谱串联质谱建立了血清样本中常见的 15 中胆汁酸的检测方法。该方法实现了较小的基质干扰、良好的分离度和灵敏度，按照方法学要求进行的 3 水平添加实验回收率均满足 70% ~ 120%，RSD 值均小于 10%，平行性稳定性良好，能够满足实验要求。实验证明 Cleanert PEP 96 Well Microplates 微孔 SPE 板中高分子填料对胆汁酸类化合物具有高效均

衡的吸附作用，可一定程度去除基质中的杂质干扰，可用于生物样本胆汁酸成分的分析。