

# 串联质谱测定人血清中 17 种胆汁酸含量

## LCMSMS-571

**摘要：** 本文使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用建立了人体血清中 17 种胆汁酸同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，可以为临床人血清中胆汁酸的检测提供很好的借鉴和参考。

**关键词：** LCMS-8050 CL 胆汁酸 血清

胆汁酸由胆固醇代谢产生，根据合成途径，可以分为由胆固醇为原料直接合成的初级胆汁酸和代谢产生的次级胆汁酸。研究发现胆汁酸在动物体内可乳化脂肪，扩大与脂肪酶的接触面积；调控胰脂肪酶和脂蛋白酯酶的活性提高其对脂肪的水解代谢；在肠道内转运脂肪，促进脂肪的吸收。而不同的胆汁酸亚型在临床上具有不同的诊断意义，不同种类的胆汁酸对疾病的作用差异较大，如去氧胆酸是胃肠道致癌因子，而熊去氧胆酸具有一定的抑制癌症作用。因此检测每一种亚型的胆汁酸在体内的水平而非简单地定量测量

总胆汁酸水平，对于肝胆疾病的筛查、诊断和鉴别诊断具有重要意义。

目前临床上主要开展胆汁酸的检测方法包括气相色谱法、液相色谱法、毛细管电泳法、气相色谱-质谱联用法，以及液相色谱-串联质谱法等，但是目前对于检测人体血清中多种胆汁酸亚型的研究相对较少。本实验使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL，建立了人血清中 17 种胆汁酸含量测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，供相关人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为 LC-30AD CL×2（输液泵），DGU-20A<sub>5R</sub> CL（在线脱气机），SIL-30AC<sub>MP</sub> CL（自动进样器），CTO-30A CL（柱温箱），CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18（100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm，岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-32001-03）

流动相：A 相 -5 mM 乙酸铵水溶液；B 相 - 甲醇：乙腈 =1：1

流速：0.5 mL/min

柱温：60°C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 35%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	泵	B.Conc	40
2.50	泵	B.Conc	45
3.50	泵	B.Conc	50
4.60	泵	B.Conc	55
5.70	泵	B.Conc	55
5.80	泵	B.Conc	70
7.50	泵	B.Conc	70
7.50	泵	T.Flow	0.5
7.51	泵	B.Conc	95
7.51	泵	T.Flow	0.8
8.50	泵	B.Conc	95
8.50	泵	T.Flow	0.8
8.51	泵	B.Conc	35
8.51	泵	T.Flow	0.5
10.00	控制器	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8050 CL

离子源: ESI (-)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 400°C

DL 温度: 300°C

加热模块温度: 500°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	英文简写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q1 Pre Bias (V)
石胆酸	LCA	375.1	375.1	11	21	16
脱氧胆酸	DCA	391.2	391.1	15	38	18
鹅脱氧胆酸	CDCA	391.2	391.1	15	40	18
熊脱氧胆酸	UDCA	391.2	391.1	12	21	18
胆酸	CA	407.2	407.1	12	39	18
甘氨石胆酸	GLCA	432.3	74.1	18	39	15
甘氨脱氧胆酸	GDCA	448.2	74.1	11	28	15
甘氨鹅脱氧胆酸	GCDCA	448.2	74.1	11	20	15
甘氨熊脱氧胆酸	GUDCA	448.2	74.1	11	37	15
甘氨猪脱氧胆酸	GHDCA	448.2	74.1	11	37	15
甘氨酸	GCA	464.3	74.1	11	41	15
牛磺石胆酸	TLCA	482.2	124.0	11	52	11
牛磺脱氧胆酸	TDCA	498.2	80.0	12	84	27

牛磺鹅脱氧胆酸	TCDCA	498.3	79.9	19	76	28
牛磺熊脱氧胆酸	TUDCA	498.3	79.9	12	74	28
牛磺猪脱氧胆酸	THDCA	498.2	79.9	19	76	16
牛磺胆酸	TCA	514.2	80.0	20	78	17
石胆酸 -D4	LCA-D4	379.1	379.1	11	21	16
脱氧胆酸 -D5	DCA-D5	396.2	396.1	15	37	18
鹅脱氧胆酸 -D4	CDCA-D4	395.2	395.1	15	23	18
熊脱氧胆酸 -D4	UDCA-D4	395.2	395.1	12	21	18
胆酸 -D4	CA-D4	411.2	411.1	12	21	18
甘氨酸鹅脱氧胆酸 -D5	GCDCA-D5	453.2	74.1	11	37	15
甘氨酸熊脱氧胆酸 -D7	GUDCA-D7	455.2	74.1	11	37	15
甘氨酸胆酸 -D5	GCA-D5	469.3	74.1	11	41	15
牛磺石胆酸 -D5	TLCA-D5	487.2	124.0	11	52	11
牛磺鹅脱氧胆酸 -D5	TCDCA-D5	503.2	124.0	12	54	11
牛磺熊脱氧胆酸 -D5	TUDCA-D5	503.2	124.0	12	50	11
牛磺胆酸 -D5	TCA-D5	519.2	124.0	20	54	11
牛磺脱氧胆酸 -D4	TDCA-D4	502.3	124.1	12	54	11

### 1.3 标准品及样品制备

标准溶液配制：取 17 种胆汁酸混标母液，用初始流动相逐步稀释成系列浓度的标准工作液，具体浓度见表 3。内标溶液使用初始流动相配置成内标工作液。取 100  $\mu\text{L}$  标准溶液，加入 10  $\mu\text{L}$  内标，涡旋混匀，进样 10  $\mu\text{L}$ 。

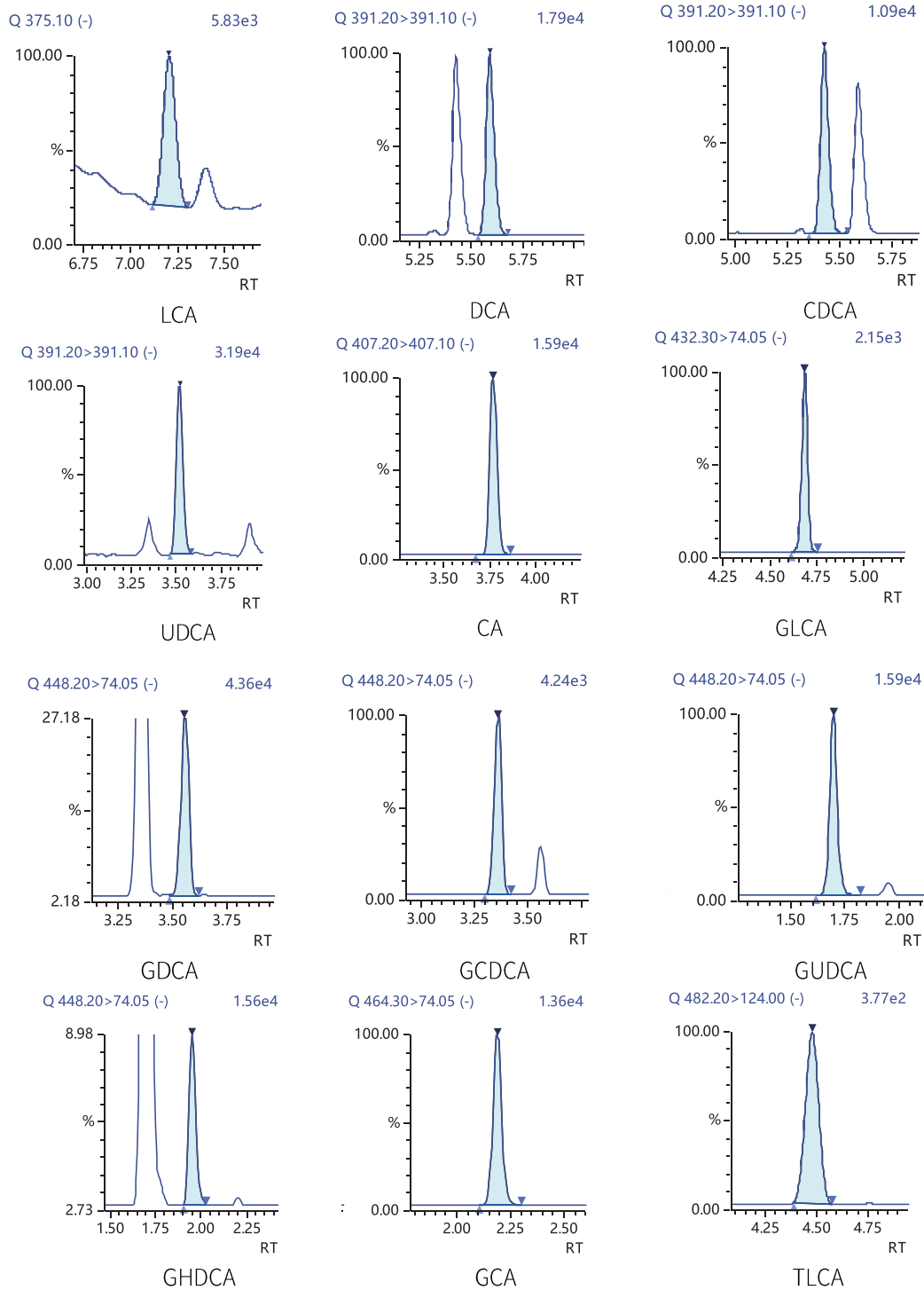
表 3 标准曲线浓度信息 (ng/mL)

编号	名称	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	LCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
2	DCA	5	10	50	100	500	1000	2000
3	CDCA	5	10	50	100	500	1000	2000
4	UDCA	1.25	2.5	12.5	25	125	250	500
5	CA	5	10	50	100	500	1000	2000
6	GLCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
7	GDCA	6.25	12.5	62.5	125	625	1250	2500
8	GCDCA	12.5	25	125	250	1250	2500	5000
9	GUDCA	2.5	5	25	50	250	500	1000
10	GHDCA	0.125	0.25	1.25	2.5	12.5	25	50
11	GCA	3.75	7.5	37.5	75	375	750	1500
12	TLCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
13	TDCA	2.5	5	25	50	250	500	1000
14	TCDCA	2.5	5	25	50	250	500	1000
15	TUDCA	0.25	0.5	2.5	5	25	50	100
16	THDCA	0.125	0.25	1.25	2.5	12.5	25	50
17	TCA	0.625	1.25	6.25	12.5	62.5	125	250

样品前处理方法：取 100  $\mu\text{L}$  血清样本，加入 300  $\mu\text{L}$  乙腈（内含 10  $\mu\text{L}$  内标），涡旋均匀，13000 rpm 离心 5 min，取 300  $\mu\text{L}$  上清液，60 $^{\circ}\text{C}$  氮气吹干，用 100  $\mu\text{L}$  初始流动相复溶，振荡均匀后，转瓶进样 10  $\mu\text{L}$ 。

## ■ 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图



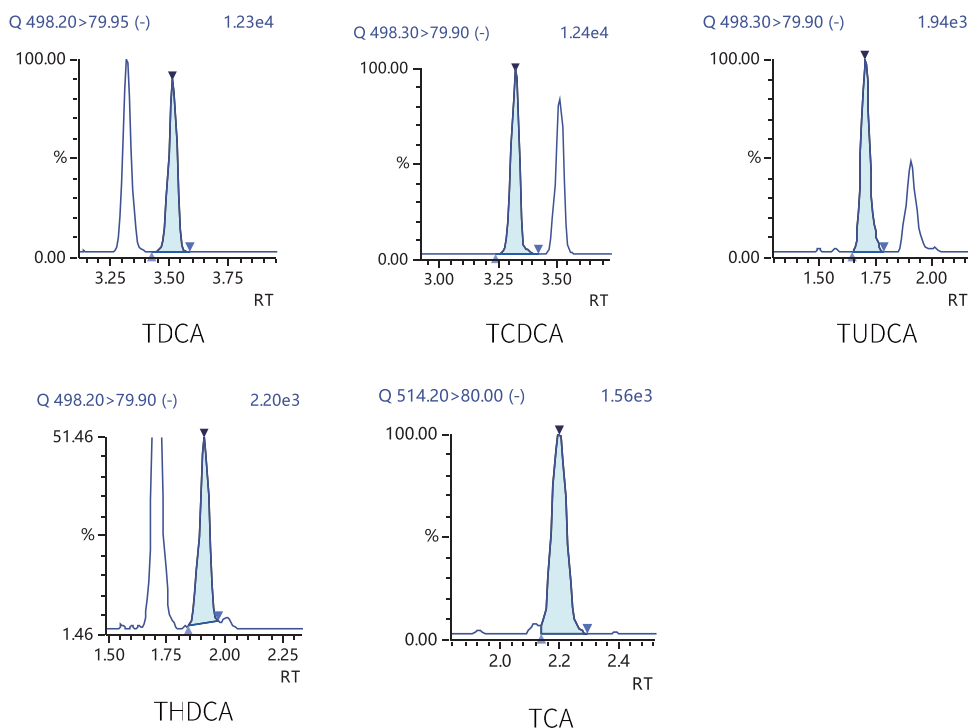


图 1 标准曲线 L1 浓度点色谱图

## 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 4，17 种胆汁酸在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.994，准确度满足 100±15% 以内的要求。

表 4 标准曲线浓度信息 (ng/mL)

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	LCA	$Y = (0.107336)X + (0.00484765)$	0.25~100	0.999	95.3~106.8
2	DCA	$Y = (0.00465773)X + (0.00226675)$	5~2000	0.999	97.7~102.3
3	CDCA	$Y = (0.000470887)X + (0.000572060)$	5~2000	0.999	96.6~101.4
4	UDCA	$Y = (0.0162286)X + (0.00650418)$	1.25~500	0.999	95.0~110.6
5	CA	$Y = (0.000608651)X + (0.000332210)$	5~2000	0.999	95.4~103.1
6	GLCA	$Y = (0.00268132)X + (-1.18436e-005)$	0.25~100	0.999	96.2~107.1
7	GDCA	$Y = (0.000833592)X + (-0.000634302)$	6.25~2500	0.998	92.2~107.6
8	GCDCA	$Y = (0.000459801)X + (0.000742539)$	12.5~5000	0.999	94.8~106.4
9	GUDCA	$Y = (0.206122)X + (-0.00552275)$	2.5~1000	0.999	95.5~106.0
10	GHDCA	$Y = (0.271931)X + (-0.00569851)$	0.125~50	0.997	89.6~110.5
11	GCA	$Y = (0.00614234)X + (0.000231065)$	3.75~1500	0.999	96.5~106.1
12	TLCA	$Y = (0.0708446)X + (-0.000773494)$	0.25~100	0.998	89.7~107.2
13	TDCa	$Y = (0.0128844)X + (-0.000860893)$	2.5~1000	0.996	91.3~114.0
14	TCDCA	$Y = (0.0164394)X + (-0.00236681)$	2.5~1000	0.994	87.7~113.1
15	TUDCA	$Y = (0.0115057)X + (0.00153150)$	0.25~100	0.999	94.7~106.7
16	THDCA	$Y = (0.793129)X + (0.00922271)$	0.125~50	0.996	87.9~103.7
17	TCA	$Y = (0.0625649)X + (-0.000302437)$	0.625~250	0.997	87.1~107.6

### 2.3 准确度及精密度测定结果

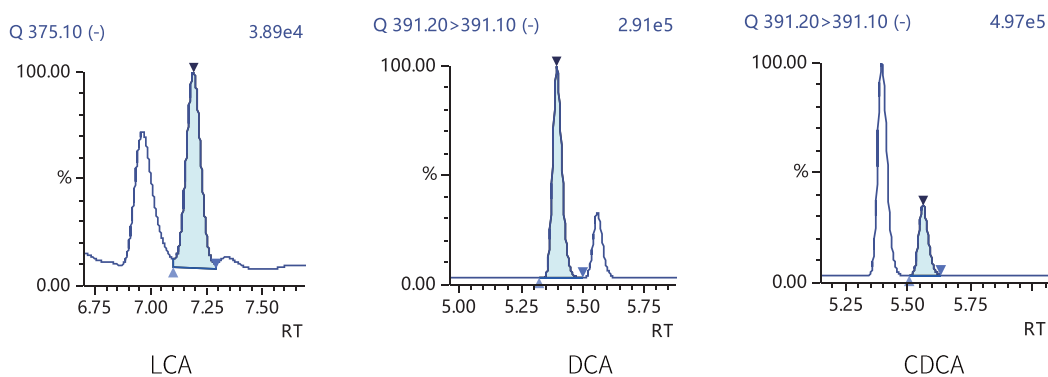
按 1.3 中的前处理方法对空白血清添加低中高浓度标准品作为低中高浓度质控品，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 6 份，质控品的准确度结果如表 5 所示，结果显示质控品测定回收率结果与理论值接近，均在 90.9~113.4 之间，满足临床测定需求。样品平行制备 6 份进样分析，峰面积的 RSD 在 0.2%~13.5% 之间，满足临床测定需求。

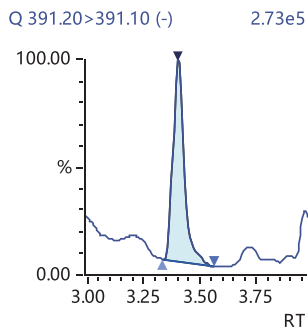
表 5 质控准确度及精密度考察结果 (n=6)

名称	LQC			MQC			HQC		
	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD(%)	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD(%)	添加浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD(%)
LCA	1.0	101.3	2.6	10.0	97.5	1.8	80.0	93.2	2.1
DCA	20	94.9	1.9	200	94.6	1.7	1600	95.9	1.8
CDCA	20	97.9	0.2	200	95.7	1.8	1600	93.3	1.4
UDCA	5.0	95.2	3.0	50.0	93.4	4.2	400	92.2	3.0
CA	20	93.6	3.6	200	95.4	3.7	1600	96.9	2.1
GLCA	1.0	96.5	2.1	10.0	94.9	3.6	80.0	98	2.5
GDCA	25	92.5	4.6	250	100.6	2.0	2000	94.7	2.4
GCDCA	50	97.3	1.1	500	100.7	1.3	4000	109.5	2.4
GUDCA	10	99.3	5.0	100	98.4	1.9	800	107.5	1.9
GHDCA	0.5	90.9	8.0	5.0	93.5	6.4	40.0	100.9	2.2
GCA	15	99.4	0.7	150	100.5	1.0	1200	106.3	1.3
TLCA	1.0	99.3	13.5	10.0	100.8	5.7	80.0	107.2	1.0
TDCA	10	102.4	2.7	100	108.3	2.6	800	113.4	3.2
TCDCA	10	91.5	1.3	100	91.9	3.2	800	102.8	4.3
TUDCA	1.0	97.7	4.9	10.0	104.5	1.0	80.0	92.1	2.1
THDCA	0.5	96.3	10.0	5.0	112.5	6.1	40.0	94.3	7.2
TCA	2.5	99.4	5.5	25.0	95.3	0.3	200	95.7	4.8

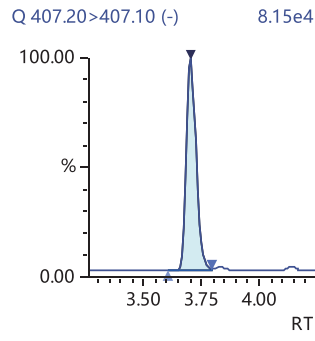
### 2.4 临床样品测定结果

取 4 批次血清样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 2 和表 6，该方法灵敏度及分离度可满足临床检验需求。

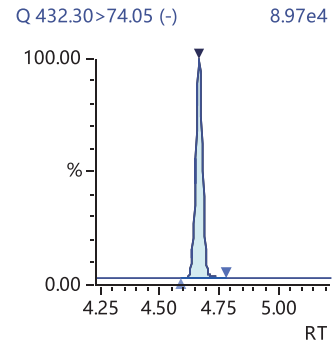




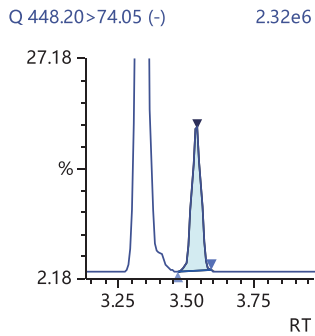
UDCA



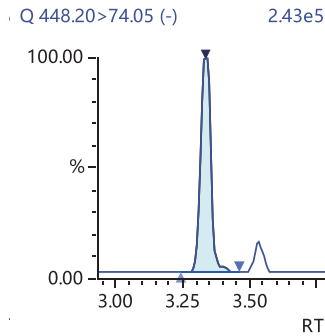
CA



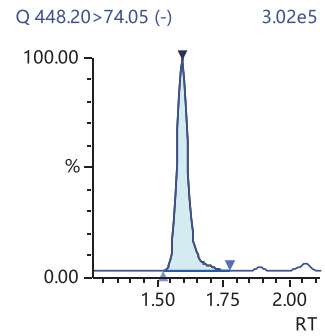
GLCA



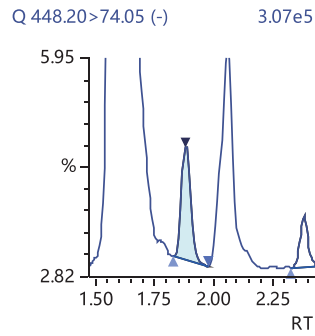
GDCA



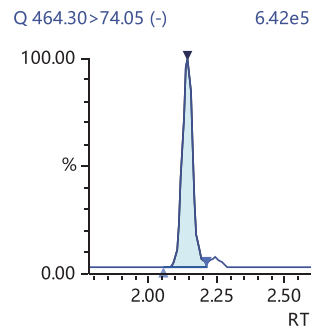
GCDCA



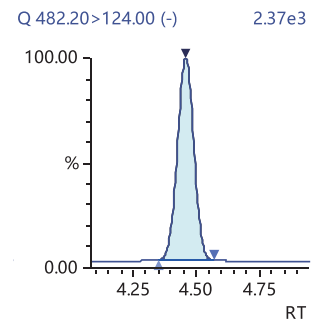
GUDCA



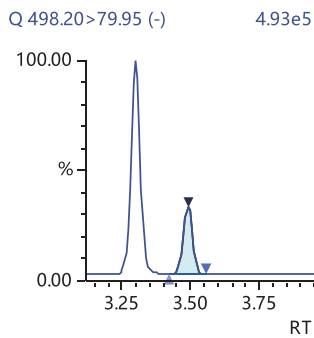
GHDCa



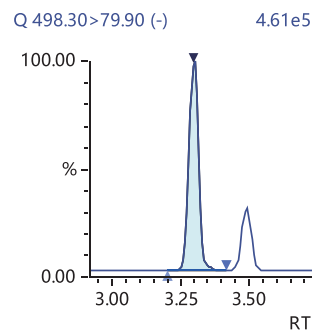
GCA



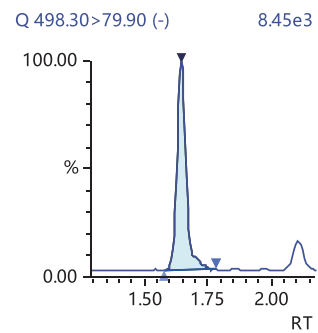
TLCA



TDCA



TCDCA



TUDCA

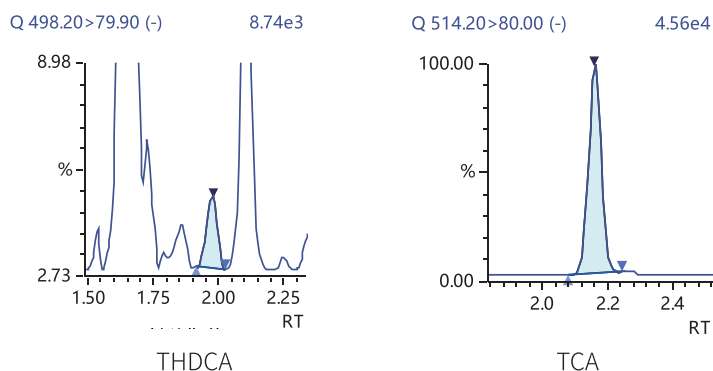


图 2 sample1 色谱图

表 6 临床样品测定结果

Name	sample1	sample2	sample3	sample4
LCA	4.5	3.0	1.9	3.4
DCA	79.5	55.4	44.4	54.8
CDCA	255.2	49.0	45.7	112.1
UDCA	27.9	8.8	6.7	15.0
CA	48.3	15.6	12.8	18.4
GLCA	8.2	1.6	0.8	3.8
GDCA	175.7	18.7	46.9	24.2
GCDCA	15.5	43.3	72.7	110.2
GUDCA	132.3	5.9	9.6	14.7
GHDCA	1.0	0.4	0.5	0.6
GCA	257.4	17.7	43.4	13.8
TLCA	1.9	1.2	0.5	0.4
TDCA	48.1	45.5	69.9	7.0
TCDCA	212.3	62.3	56.1	18.5
TUDCA	5.1	1.3	1.1	0.3
THDCA	0.1	0.6	0.5	0.2
TCA	44.2	17.9	24.1	2.1

## ■ 结论

使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用建立了人体血清中 17 种胆汁酸同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求。该方法可以为临床人血清中胆汁酸的检测提供很好的借鉴和参考。

岛津应用云

