

LCMSMS 检测人血清中 15 种胆汁酸含量

LCMSMS-595

摘要： 本文使用三重四极杆液质联用仪及胆汁酸谱试剂盒（质谱生物科技有限公司），建立了同时测定人血清中 15 种胆汁酸含量的方法。通过对灵敏度、线性、精密度及基质干扰的考察，显示所建立的方法灵敏度高、重复性好，低、高质控样本重复进样 RSD 在 13.13 % 以内，线性相关系数 r^2 均大于 0.99，基质效应均在 $100 \pm 15\%$ 以内。该方法可以供临床研究参考及应用。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 血清 胆汁酸

胆汁中的胆汁酸按结构可分为两类：一类为游离型胆汁酸，包括胆酸、脱氧肌酸、鹅脱氧胆酸和石胆酸；另一类为结合型胆汁酸，是各种游离型胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合的产物，主要有甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸和牛磺鹅脱氧胆酸等。

胆汁酸作为一种信号分子，不仅可以调节甘油三酯、胆固醇和葡萄糖代谢，而且在临床急、慢性肝炎、病毒性肝炎、肠道溃疡、癌症等疾病的诊断中，起重要辅助作用。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、气质联用法，以及液质联用法等。但由于游离型与结合型胆汁酸极性差异较大，且存在多种同分异构体，因此准确测定生物基质中胆汁酸的含量，其前处理过程及分析条件相对复杂。

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪结合质谱生物科技有限公司的胆汁酸谱试剂盒，建立了人血清中 15 种胆汁酸含量测定方法。结果表明该方法分析灵敏度高、专属性强、重复性好，可供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40 在线脱气机：DGU-405
 输液泵：LC-40B X3 质谱仪：LCMS-8045
 自动进样器：SIL-40C 色谱工作站：LabSolutions Version 5.99
 柱温箱：CTO-40C

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D. , 2.7 μm ，岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-32003-03)

流动相：A 相 -5 mmol/L 乙酸铵水溶液，B 相 - 甲醇：乙腈 =1:1

流速：0.5 mL/min

柱温：50°C

进样体积：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15 %，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	泵	B.Conc	15
15.00	泵	B.Conc	95
18.00	泵	B.Conc	95
18.01	泵	B.Conc	15
20.00	控制器		

质谱条件

分析仪器: LCMS-8045	DL 温度: 170°C
离子源: ESI(-)	加热模块温度: 400°C
雾化气流速: 2.0 L/min	接口温度: 400°C
加热气流速: 20.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
干燥气流速: 15.0 L/min	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No	名称	前体离子	产物离子	CE(V)	内标组 *
15 种胆汁酸					
1	胆酸 (CA)	407.4	407.4	20	1
2	脱氧胆酸 (DCA)	391.4	391.4	12	2
3	鹅脱氧胆酸 (CDCA)	391.4	391.4	18	3
4	熊脱氧胆酸 (UDCA)	391.4	391.4	20	4
5	石胆酸 (LCA)	375.4	375.4	19	5
6	甘氨酸 (GCA)	464.3	74.05	40	6
7	甘氨酸脱氧胆酸 (GDCA)	448.3	74	20	7
8	甘氨酸鹅脱氧胆酸 (GCDCA)	448.3	74	37	8
9	甘氨酸熊脱氧胆酸 (GUDCA)	448.3	73.95	40	8
10	甘氨酸石胆酸 (GLCA)	432.3	73.95	40	1
11	牛黄胆酸 (TCA)	514.3	124.05	54	10
12	牛黄脱氧胆酸 (TDCA)	498.3	79.95	54	9
13	牛磺鹅脱氧胆酸 (TCDCA)	498.3	80	70	9
14	牛磺熊脱氧胆酸 (TUDCA)	498.3	79.95	70	10
15	牛磺石胆酸 (TLCA)	482.3	79.95	70	1
10 种胆汁酸内标					
16	IS-1 胆酸 (CA-D4)	411.3	411.3	15	1
17	IS-2 脱氧胆酸 (DCA-D4)	395.3	395.3	15	2
18	IS-3 鹅脱氧胆酸 (CDCA-D4)	395.3	395.3	15	3
19	IS-4 熊脱氧胆酸 (UDCA-D4)	395.3	395.3	15	4
20	IS-5 石胆酸 (LCA-D4)	379.1	379.1	15	5
21	IS-6 甘氨酸 (GCA-D4)	468.3	73.95	43	6
22	IS-7 甘氨酸脱氧胆酸 (GDCA-D6)	454.1	73.9	22	7
23	IS-8 甘氨酸熊脱氧胆酸 (GUDCA-D4)	452.3	73.9	42	8
24	IS-9 牛磺鹅脱氧胆酸 (TCDCA-D4)	502.3	79.95	70	9
25	IS-10 牛磺熊脱氧胆酸 (TUDCA-D4)	502.1	79.9	70	10

* 相同内标组号的化合物, 表示采用同一内标进行校正。

1.3 标准品配制

按照试剂盒 (质谱生物科技有限公司 - 胆汁酸谱检测试剂盒 Lot#210601) 说明, 试剂盒中所有成分与样本于冰箱取出后 (2~8°C、-20°C), 需平衡至室温 (约 30 min), 且所有样本前处理步骤均在避光条件下完成。

试剂盒中包含: 15 种胆汁酸校准品、校准品稀释液、质控品 (低、高浓度)、内标、内标稀释液、蛋白沉淀剂、复溶液、以及流动相 A、流动相 B。

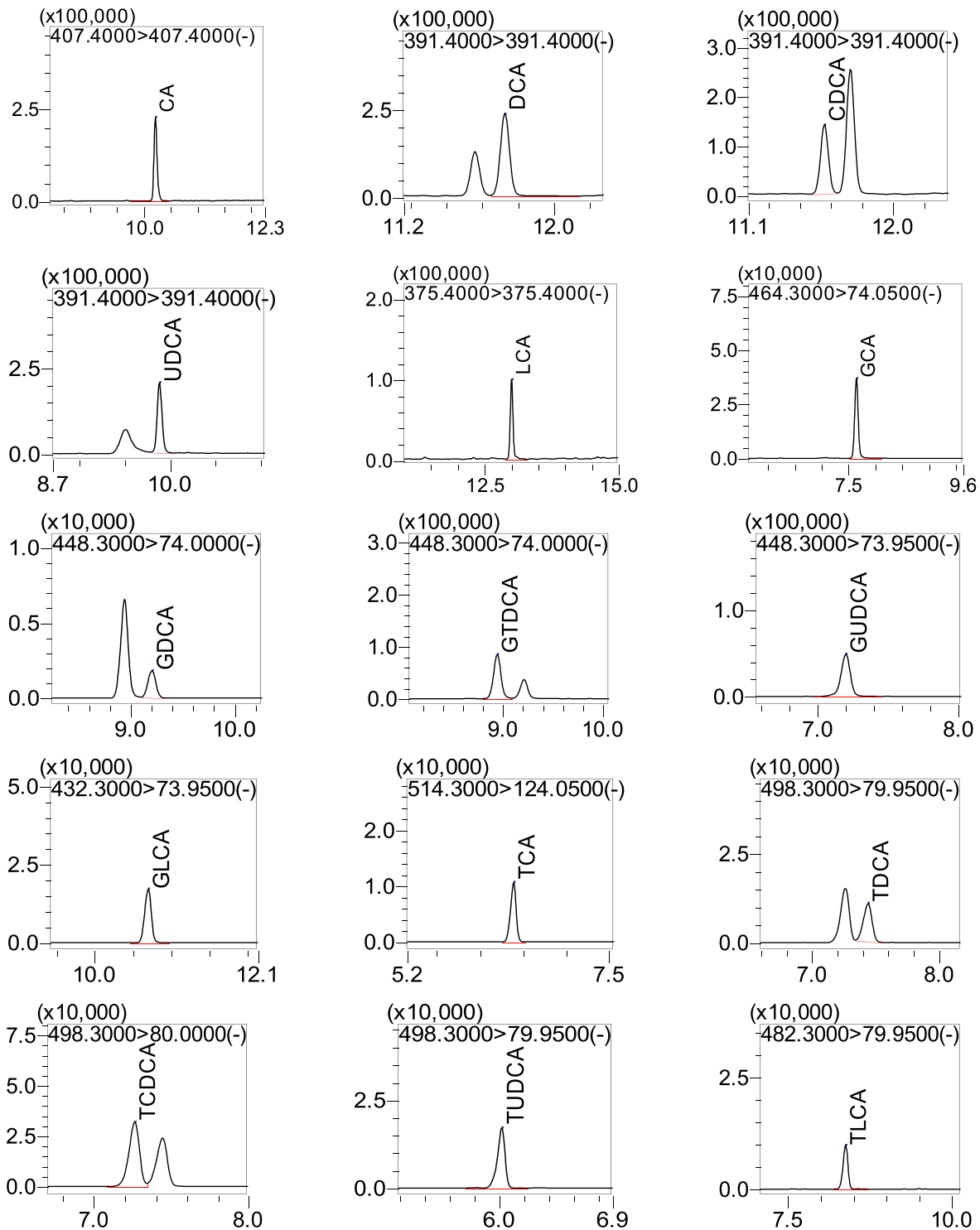
1.4 样品制备

取校准品、质控品、人血清样品各 100 μ L，加入 16 μ L 内标液，混合 30 s；再加入 300 μ L 蛋白沉淀剂，混合 1 min 后静置 5 min，于 18800 g、常温离心 15 min；取上层清液 300 μ L 于氮气吹干；吹干加入 100 μ L 复溶液，于 700 转 /min 震荡 15 min 后进样。（上机前可加入纯水 60 μ L，以避免溶剂效应）

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

使用建立的分析条件，测定胆汁酸校准品 1，所得 MRM 色谱图见图 1。



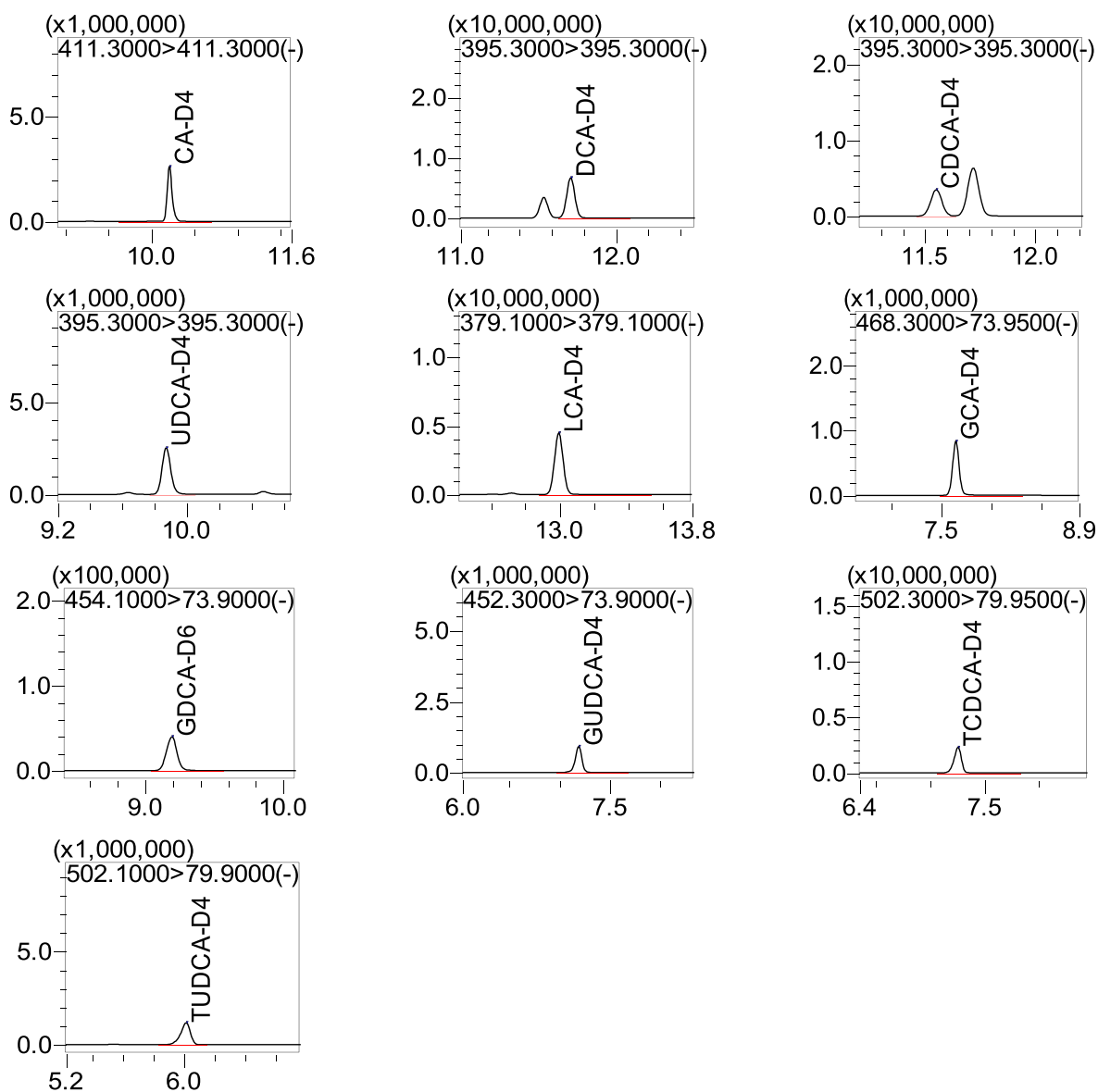


图 1 15 种胆汁酸校准品（校准品 1）及内标 MRM 色谱图

2.2 标准曲线、检出限、定量限

按照 1.4 项下分析条件，对系列浓度的混合标准工作液进样分析，使用内标法制作标准曲线（回归系数 1/C），标准曲线、检出限及定量限信息见表 3。

表 3 15 种胆汁酸 - 标准曲线及准确度

No	化合物	标准曲线	判定系数 r^2	准确度 (%)	线性范围 (nmol/L)	检出限 (nmol/L)	定量限 (nmol/L)
1	CA	$Y = (0.0013749)X + (0.00822444)$	0.9994	95.9-108.6	58.10~3446.83	5.05	15.32
2	DCA	$Y = (0.000558702)X + (0.00652311)$	0.9992	93.7-108.5	59.74~3345.76	2.14	6.50
3	CDCA	$Y = (0.000664383)X + (0.00544210)$	0.9992	93.3-108.8	59.09~3389.11	1.87	5.66
4	UDCA	$Y = (0.00130743)X + (0.0100064)$	0.9987	90.2-108.7	58.44~3407.16	0.87	2.65
5	LCA	$Y = (0.000961172)X + (0.00491485)$	0.9985	93.1-107.5	20.30~1122.19	0.79	2.39
6	GCA	$Y = (0.000615449)X + (0.0155958)$	0.9980	95.8-111.8	64.53~3466.88	0.10	0.30
7	GDCA	$Y = (0.000698755)X + (0.00989180)$	0.9972	95.9-113.5	58.53~3532.31	0.37	1.11
8	GCDCA	$Y = (0.000902351)X + (0.0099084)$	0.9960	91.1-113.6	85.84~6456.72	0.14	0.42
9	GUDCA	$Y = (0.000814358)X + (0.0155471)$	0.9964	87.3-103.0	63.04~3627.70	0.10	0.30
10	GLCA	$Y = (0.000680688)X + (0.00137987)$	0.9971	88.1-110.0	18.57~992.01	0.03	0.10
11	TCA	$Y = (0.000722736)X + (0.00131558)$	0.9951	90.6-105.2	12.51~1241.36	0.54	1.64
12	TDCA	$Y = (0.0000790736)X + (0.00130962)$	0.9972	89.0-113.0	49.82~3221.25	0.43	1.31
13	TCDCA	$Y = (0.000185404)X + (0.00458497)$	0.9987	89.9-110.2	69.70~3407.68	0.16	0.47
14	TUDCA	$Y = (0.000410663)X + (0.00361513)$	0.9983	89.5-110.0	23.13~1668.07	0.26	0.79
15	TLCA	$Y = (0.000389949)X + (0.00045608)$	0.9972	88.5-111.7	7.76~842.84	0.21	0.62

2.3 重复性

按照 1.4 项下分析条件, 对低、高浓度的质控样品进样分析 ($n=6$), 所得结果见表 4。由结果可知, 15 种胆汁酸的回算浓度均在试剂盒要求范围以内, 回算浓度 RSD% 均在 13.13 % 以内。表明该方法具有良好的重复性。

表 4 质控样品精密度结果 ($n=6$)

No	化合物	低浓度 QC			高浓度 QC		
		理论均值 (nmol/L)	回算均值 (nmol/L)	标准偏差 (RSD%)	理论均值 (nmol/L)	回算均值 (nmol/L)	标准偏差 (RSD%)
1	CA	1146.98	1213.70	2.47	2262.26	2372.39	2.91
2	DCA	1149.87	1253.43	4.88	2193.67	2423.62	3.23
3	CDCA	1142.63	1313.55	5.95	2188.68	2367.48	4.75
4	UDCA	478.58	500.06	4.53	925.07	962.22	4.79
5	LCA	63.39	70.10	13.13	123.77	126.75	8.45
6	GCA	1159.50	1272.48	1.10	2281.88	2432.19	0.77
7	GDCA	1927.53	2184.10	2.47	3908.73	4212.13	4.16
8	GCDCA	2297.90	2300.96	3.23	4571.25	4357.62	2.07
9	GUDCA	483.35	539.74	2.27	953.09	1021.35	3.11
10	GLCA	50.02	56.19	6.69	95.63	109.95	3.41
11	TCA	107.48	137.18	5.54	238.46	271.12	3.79
12	TDCA	416.21	487.87	5.53	860.52	932.11	4.93
13	TCDCA	460.32	505.86	1.25	886.28	968.00	2.07
14	TUDCA	43.25	43.77	4.68	85.10	90.38	6.28
15	TLCA	17.31	22.07	3.25	37.25	44.26	2.28

2.4 基质效应考察

基质样本: 取人空白血清样品 90 μ L, 加入 10 μ L 低、高质控样品, 按照 1.4 项下前处理方式制备; 工作液样本: 取纯水 90 μ L, 加入 10 μ L 低、高质控样品, 按照 1.4 项下前处理方式制备; 基质效应 = 基质样本 / 工作液样本 * 100%。测定结果见表 5。

表 5 基质效应测定结果 (n=3)

No	化合物	低质控样本		高质控样本
		空白血清 (nmol/L)	基质效应 %	基质效应 %
1	CA	/	110.73	102.74
2	DCA	/	108.02	103.17
3	CDCA	/	105.60	98.54
4	UDCA	/	109.27	105.00
5	LCA	/	109.16	104.92
6	GCA	/	108.06	106.84
7	GDCA	/	109.16	85.96
8	GCDCA	/	112.39	101.85
9	GUDCA	/	113.61	105.73
10	GLCA	/	109.40	109.19
11	TCA	/	113.17	104.24
12	TDCA	/	104.61	104.59
13	TCDC	/	112.19	103.72
14	TUDCA	/	98.10	100.05
15	TLCA	/	113.78	97.66

* 空白血清 “/” 表示未检出

■ 结论

实验使用岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪建立了同时测定 15 种胆汁酸含量的方法。该方法灵敏度、分离度、重复性良好, 可用于临床相关的课题研究。

岛津应用云

