

Application News

No. M283

GC/MS

通过 GC-MS 进行胆汁酸分析

随着肠道菌群研究的兴起，对肠道菌群产生成分的分析引起了人们的关注，而这些成分之一就是胆汁酸。

胆汁酸是具有胆酸骨架化合物的通称，是一种类固醇衍生物，通常使用 LC-MS/MS 对其进行分析。但是，许多化合物的分子结构相似，为了实现更好的分离，在很多情况下也使用 GC-MS。利用 GC-MS 分析胆汁酸时，必须对亲水性侧链（例如羧基和羟基）进行衍生化，以确保挥发性。

本文介绍了通过对羧基进行甲基化以及对羟基进行三甲基硅烷化 (TMS) 化，来对胆汁酸进行定量分析的示例。在该示例中，22 种胆汁酸化合物的线性范围在 100 倍以上以及线性相关系数 $R^2 > 0.995$ 。

T. Sakai

■ 胆汁酸的结构和衍生化

胆汁酸化合物的分子量较大，并且官能团具有亲水性，因此挥发性较差，在这种状态下无法直接进行 GC-MS 分析。为了开展 GC-MS 分析，必须将亲水性官能团衍生化。胆汁酸中重要的官能团是羟基和羧基，至少需将它们进行衍生化，从而置换成其他基团。

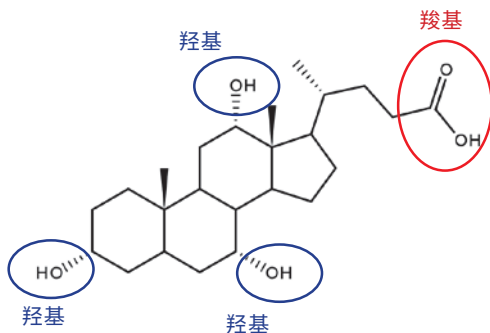


图 1 胆汁酸化合物之一 Cholic acid 的结构
分子内存在 3 个羟基和 1 个羧基

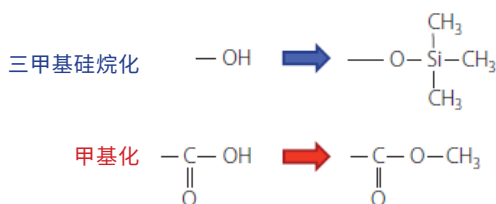


图 2 衍生化示意图
羟基的三甲基硅烷化，羧基的甲基化

三甲基硅烷化通常可以对羟基和羧基的亲水性基团进行衍生化，但形成的胆汁酸衍生化合物不稳定，因此本文采用了将羧基甲基化后，将羟基三甲基硅烷化的衍生化方法。预处理的详情如图 3 所示。

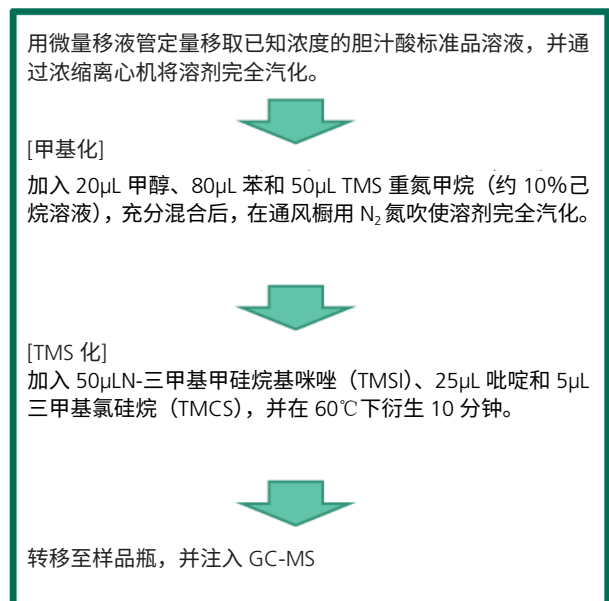


图 3 胆汁酸的衍生化方案

■ 衍生化胆汁酸的测定

通过 GC-MS 对上述衍生化胆汁酸进行分析。分析条件如下所示。

表 1 测定条件

GC-MS	: GCMS-QP™2020 NX
色谱柱	: DB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m)
- GC -	
进样模式	: 不分流
气化室温度	: 310 $^{\circ}$ C
柱温箱温度	: 230 $^{\circ}$ C (2 min) \rightarrow (8 $^{\circ}$ C / min) \rightarrow 310 $^{\circ}$ C (5 min)
控制模式	: 线速度 (45.3 cm/sec)
吹扫气流量	: 3.0 mL/min
- MS -	
测定模式	: scan 或 SIM (扫描范围: m/z 35 - 700)
离子源温度	: 200 $^{\circ}$ C
接口温度	: 280 $^{\circ}$ C
事件时间	: 0.3 sec

■ 定量准确性确认

对 22 种胆汁酸标准品，各取 8 μ g 实施上述预处理，并以 scan 模式进行 GC-MS 分析。图 4 显示了胆酸的峰。

在确认了各胆汁酸的保留时间和质谱图后，对 22 种胆汁酸标准品混合溶液 (0.1、0.5、1.0、5.0、10、50、100、500ng) 进行与上述相同的预处理，并进行 SIM 分析，将胆酸-d5 作为内标，采用内标法制定了标准曲线。图 5 为标准曲线。表 2 为每种胆汁酸的线性范围和线性相关系数。对于检测到多个峰的化合物，每个峰均用括号中的数字加以区分。表 2 还显示了线性范围内最小浓度下重复进样 3 次时的重现性。

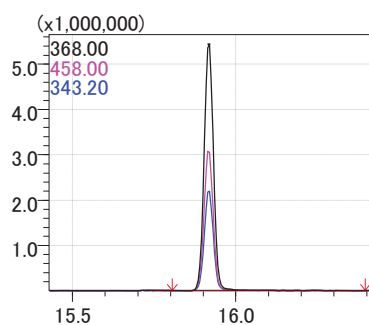


图 4 8 μ g Cholic acid 的质谱图

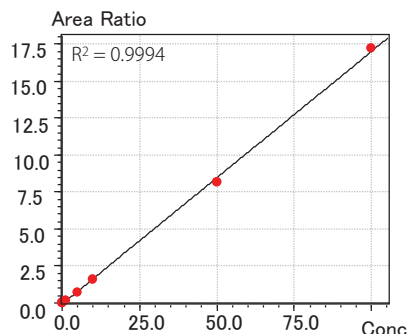


图 5 Cholic acid 的标准曲线

■ 样品稳定性验证

对 22 种胆汁酸标准品，各取 8 μ g 进行上述预处理，并在首次分析 20 小时后再次进行分析。当时峰的相对强度（与首次分析时的峰强度之比）列在表 2 中的“20 小时后峰面积的相对值”一列中。所有胆汁酸峰的重现性良好，为 70% - 120%。另外，在 38 小时也进行了同样的分析，结果有几种胆汁酸的峰面积呈减少趋势，但对于其他多种胆汁酸，均可以进行稳定的测量。

表 2 22 种胆汁酸的测定结果

胆汁酸名	CAS No.	定量离子 m/z	定性离子 m/z	线性范围 (ng)	线性 (R ²)	n=3 的 重现性 (%RSD)	20 小时后的 峰面积相对值	38 小时后的 峰面积相对值
Cholic acid	81-25-4	368.0	458.0	0.1 - 100	0.999	6.65	0.984	1.011
Chenodeoxycholic acid	474-25-9	370.0	355.0	0.5 - 100	0.999	4.71	0.949	0.920
Ursodeoxycholic acid	128-13-2	460.0	370.0	0.5 - 500	0.999	2.24	1.206	0.924
eoxycholic acid	302-95-4	255.0	370.0	0.5 - 100	0.999	6.11	0.980	0.714
Lithocholic acid	434-13-9	372.0	357.0	1 - 500	0.999	7.66	0.991	0.750
Hyocholic acid	547-75-1	458.0	369.0	0.1 - 100	0.999	5.51	1.036	1.035
3-oxocholic acid (1)	2304-89-4	546.0	341.0	1 - 500	0.999	7.95	0.848	0.575
3-oxocholic acid (2)	2304-89-4	269.0	384.0	0.5 - 500	0.999	2.36	0.914	0.714
7-oxodeoxycholic acid	911-40-0	341.0	359.0	1 - 500	0.999	5.51	1.029	1.053
7-oxolithocholic acid	4651-67-6	293.2	353.25	5 - 500	0.998	8.89	0.817	0.920
Ursocholic acid	2955-27-3	253.0	343.0	0.5 - 100	0.999	5.52	1.019	0.840
3-oxodeoxycholic acid (1)	4185-01-7	548.0	343.0	5 - 500	0.999	4.27	0.959	0.645
3-oxodeoxycholic acid (2)	4185-01-7	548.0	343.0	10 - 500	0.999	12.39	0.930	0.633
3-oxodeoxycholic acid (3)	4185-01-7	271.0	253.0	5 - 500	0.999	8.20	1.043	0.867
3-oxolithocholic acid (1)	1553-56-6	460.0	431.0	5 - 500	0.999	5.43	0.959	0.924
3-oxolithocholic acid (2)	1553-56-6	460.0	431.0	10 - 500	0.997	7.97	0.720	0.481
3-oxolithocholic acid (3)	1553-56-6	273.0	318.0	5 - 500	0.999	3.08	0.885	0.809
Hyodeoxycholic acid	83-49-8	370.0	255.0	0.5 - 500	0.999	6.44	1.139	0.860
3 β -hydroxy-5-cholenoic acid	5255-17-4	331.0	370.0	5 - 500	0.999	3.95	0.993	0.927
a-muricholic acid	2393-58-0	458.0	443.0	5 - 500	0.999	5.09	1.027	0.834
3 β -muricholic acid	2393-59-1	285.0	458.0	0.5 - 500	0.998	7.21	0.866	1.033
w-muricholic acid	6830-03-1	285.0	369.0	0.5 - 500	0.999	4.49	0.842	0.882
Phoenodeoxycholic acid	566-17-6	255.0	370.0	0.5 - 500	0.999	5.48	0.977	0.962
Isolithocholic acid	1534-35-6	372.0	215.0	1 - 500	0.999	2.38	1.051	0.920
Alloisolthocholic acid	2276-93-9	372.0	447.0	5 - 500	0.999	4.35	1.080	1.033
12-oxolithocholic acid	5130-29-0	476.0	386.0	5 - 500	0.998	8.51	0.769	0.937
isodeoxycholic acid	570-63-8	255.0	345.0	0.5 - 500	0.999	0.68	0.952	0.623

岛津应用云



本文件中描述的产品尚未根据《药品和医疗器械法》被批准为医疗器械。无法用于治疗诊断目的，无法通过正常程序使用。

GCMS-QP 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2019 年 8 月