

应用 LCMS-8050 CL 检测人血清中多种游离胆汁酸含量

LCMSMS-387

摘要：本文应用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及人血清中多种胆汁酸检测试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法），建立了同时测定人血清中 15 种游离胆汁酸含量的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法专属性良好，标准曲线相关系数均大于 0.99，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对肝胆功能相关疾病的临床诊断、治疗管理和生理评估具有重要的意义。

关键词：LCMS-8050 CL 游离胆汁酸 人血清

胆汁酸，为胆汁的主要有机成分，是几种结构类似的类固醇酸的统称，由一个含四元环的甾核、一个末端为羧酸的 5 - 8 个碳侧链以及数目和方向不等的羟基组成。其是人体脂肪代谢的必需物质，在体内具有重要的生理功能，包括乳化脂肪、产生胆汁、防止胆结石等。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

谱的变化亦会影响到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物。

本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及人血清中多种胆汁酸检测试剂盒（高效液相色谱 - 串联质谱法），建立了人血清中游离胆汁酸的含量测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，可供相关人员参考。

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-20A5R CL（在线脱气机），SIL-30ACMP 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	: 游离胆汁酸专用色谱柱（试剂盒提供）
流动相	: 流动相 A 流动相 B（试剂盒提供）
流速	: 0.5 mL/min
柱温	: 40°C
进样量	: 5 μL
洗脱方式	: 梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.10	Pumps	Pump B Conc.	50
9.00	Pumps	Pump B Conc.	80
10.50	Pumps	Pump B Conc.	80
10.51	Pumps	Pump B Conc.	50
13.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器	: LCMS-8050 CL	DL 温度	: 300°C
离子源	: ESI (-)	加热模块温度	: 500°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	干燥气流速	: 10.0 L/min
加热气流速	: 10.0 L/min	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
接口温度	: 400°C	MRM 参数	: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
CA	407.50	407.50	15.0	34.0	20.0
CA_d5	412.00	412.00	15.0	34.0	20.0
DCA	391.40	391.40	21.0	34.0	23.0
CDCA	391.40	391.40	19.0	11.0	20.0
UDCA	391.40	391.40	25.0	15.0	13.0
DCA_d5	396.50	396.50	14.0	35.0	15.0
LCA	375.40	375.40	30.0	17.0	12.0
LCA_d4	379.20	379.20	14.0	22.0	15.0
GCA	464.40	74.00	25.0	43.0	25.0
GLCA	432.40	74.05	23.0	38.0	26.0
GDCA	448.50	74.05	16.0	45.0	27.0
GUDCA	448.50	74.05	13.0	39.0	26.0
GLCA_d4	436.40	74.00	23.0	39.0	26.0
TCA	514.50	124.10	20.0	54.0	10.0
TCA_d5	519.50	124.10	20.0	54.0	10.0
TLCA	482.50	124.10	10.0	52.0	10.0
TLCA_d5	487.50	124.10	10.0	52.0	10.0
TCDCA	498.50	124.10	10.0	52.0	10.0
TCDCA_d5	503.50	124.10	10.0	52.0	10.0
GCDCA	448.50	74.05	23.0	39.0	25.0
TDCA	498.50	124.05	10.0	55.0	10.0
TUDCA	498.50	107.05	10.0	55.0	18.0
TUDCA_d5	503.40	107.05	10.0	55.0	18.0

1.3 标准品、质控品及样品制备

前处理操作步骤：

将待测样本、校准品、质控品、提取液、转化液和复溶液取出放置室温 (23±2)°C 并混匀；分别取待测样本、校准品、质控品、空白样本各 100 μL 于 EP 管中，加入内标提取液 500 μL，涡旋混匀 (2500 rpm, 5 min)；离心 (13000 rpm, 10 min)；取上清液 400 μL 于 96 孔板中，60°C 氮气吹干；加入复溶液 1(F2)100 μL，将 96 孔板放置在微孔板恒温振荡器中 700 rpm 混匀 10 min，转移 96 孔板中的复溶液到专用过滤板中，过滤板下放置 96 孔进样板，将上下两个 96 孔板放置于多管自动平衡离心机中进行过滤，离心 (4000 rpm, 1 min)，用 96 孔板进样板收集滤液，待检。

结果讨论

2.1 MRM 色谱图

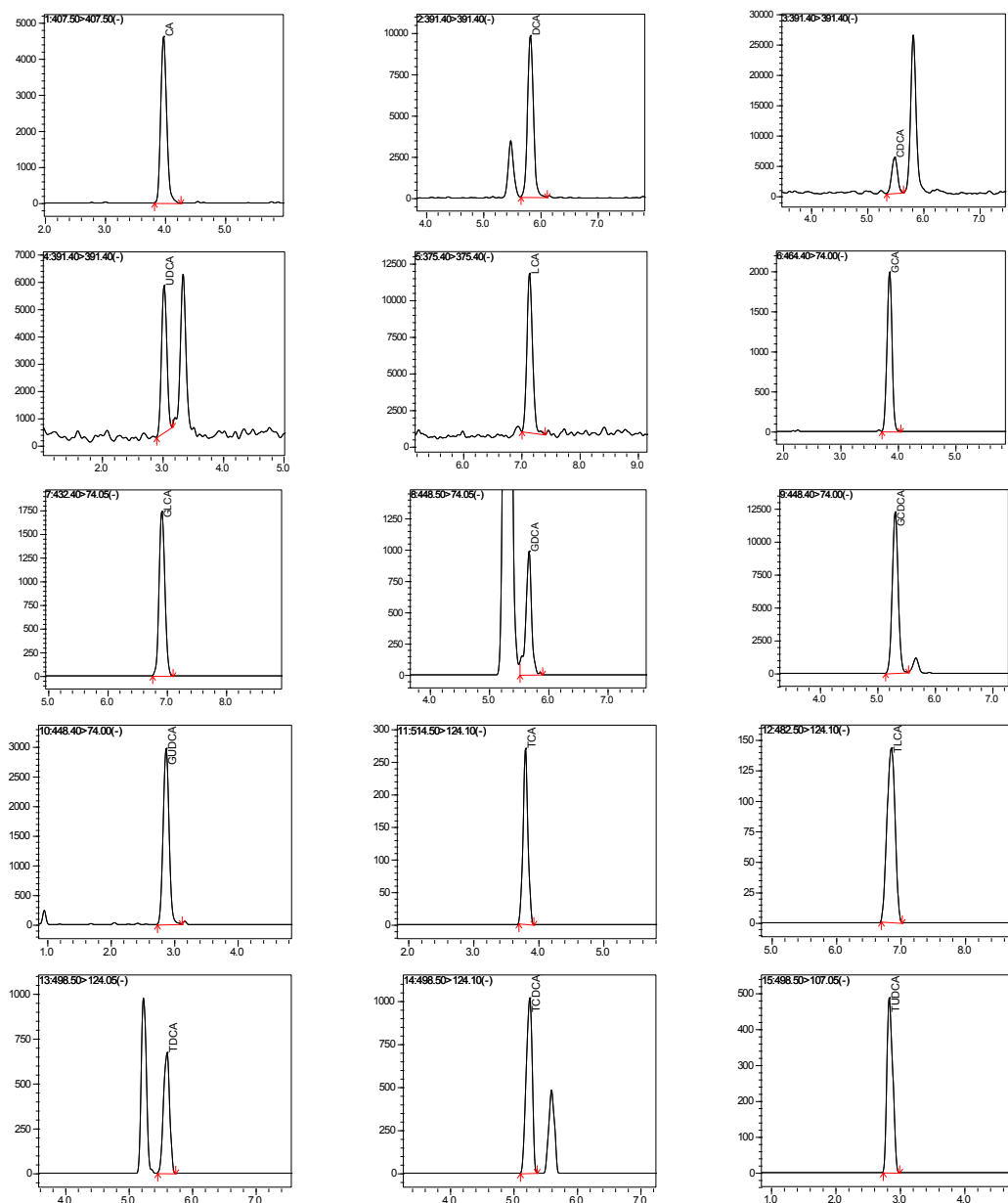


图 1 标准曲线最低浓度点色谱图

2.2 线性关系

采用内标法建立标准曲线结果如表 3 所示。结果显示，15 种胆汁酸在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.99 以上。

表 3 标准曲线结果

目标物	线性方程	线性范围 (nmol/L)	相关系数	准确度 (%)
CA	$Y = (0.00326648)X + (-0.00154006)$	20~2000	0.999	98.5~101.4
DCA	$Y = (0.000438377)X + (0.00316078)$	40~4000	0.999	98.8~101.3
CDCA	$Y = (0.000295700)X + (0.00100965)$	40~4000	0.999	99.0~100.9
UDCA	$Y = (0.000491301)X + (0.000972102)$	20~2000	0.999	99.2~100.9
LCA	$Y = (0.000603775)X + (0.00208389)$	30~3000	0.999	99.7~100.4
GCA	$Y = (0.000563305)X + (-0.00403582)$	30~3000	0.999	97.7~102.0
GLCA	$Y = (0.00111805)X + (0.00135653)$	10~1000	0.999	99.6~100.6
GDCA	$Y = (0.000800769)X + (-0.00143658)$	10~1000	0.999	98.8~101.3
GCDCA	$Y = (0.00165137)X + (-0.0100881)$	100~10000	0.998	93.7~105.7
GUDCA	$Y = (0.00113495)X + (-0.00216187)$	20~2000	0.999	98.9~101.2
TCA	$Y = (0.00232753)X + (-0.00308800)$	6~600	0.999	97.3~102.5
TLCA	$Y = (0.0139655)X + (-0.00464660)$	2~200	0.999	96.5~103.1
TDCA	$Y = (0.000700495)X + (0.00129712)$	10~1000	0.999	98.4~101.5
TCDCA	$Y = (0.00119082)X + (0.00343788)$	10~1000	0.999	98.2~101.6
TUDCA	$Y = (0.000933184)X + (0.000436855)$	5~500	0.999	96.2~103.5

2.3 质控样本准确度及精密度考察

按 1.3 中的前处理方法和 1.2 中的分析条件对试剂盒中的高低质控品进行分析，每个样品平行处理分析 6 次，质控品的准确度结果如表 4 及表 5 所示，结果显示质控品测定结果与理论值接近，完全符合试剂盒质控品准确度 70%~130% 的要求。低浓度质控品 15 种胆汁酸测定结果准确度在 90.9%~107.4% 之间，高浓度质控品 15 种胆汁酸测定结果准确度在 88.6%~113.8% 之间。低浓度质控品 15 种胆汁酸测定结果（平行处理 6 份）RSD 在 2.6%~5.8% 之间，高浓度质控品 15 种胆汁酸测定结果（平行处理 6 份）RSD 在 2.0%~6.2% 之间。

表 4 高质控准确度及精密度考察结果 (n=6)

编号	名称	高质控理论值 (nmol/L)	高质控测定平均值 (nmol/L)	平均准确度 (%)	RSD (%)
1	CA	774.9	771.1	99.5	3.4
2	DCA	1556.5	1510.8	97.1	2.7
3	CDCA	1502.2	1470.2	97.9	2.6
4	UDCA	760.8	748.7	98.4	2.3
5	LCA	1151.7	1120.1	97.2	3.2
6	GCA	1153.3	1021.8	88.6	3.6
7	GLCA	389.1	385.2	99.0	2.0
8	GDCA	378.7	357.1	94.3	3.7
9	GCDCA	4251.5	4165.8	98.0	4.6
10	GUDCA	759.1	700.2	92.2	4.7
11	TCA	227.9	241.4	105.9	6.2
12	TLCA	74.7	75.3	100.7	4.4
13	TDCA	361.7	384.6	106.3	4.5
14	TCDCA	397.1	452.0	113.8	2.6
15	TUDCA	192.0	187.6	97.7	4.1

表 5 低质控准确度及精密度考察结果 (n=6)

编号	名称	低质控理论值 (nmol/L)	低质控测定平均值 (nmol/L)	平均准确度 (%)	RSD (%)
1	CA	103.0	102.2	99.2	3.2
2	DCA	208.0	196.7	94.6	4.3
3	CDCA	197.1	196.6	99.7	4.7
4	UDCA	100.9	100.9	100.0	4.9
5	LCA	152.5	150.8	98.9	4.3
6	GCA	151.8	139.1	91.7	4.4
7	GLCA	51.0	49.8	97.5	2.6
8	GDCA	51.0	49.2	96.6	3.9
9	GCDCA	493.8	499.5	101.1	3.9
10	GUDCA	100.2	91.4	91.3	4.9
11	TCA	29.4	29.9	102.0	4.8
12	TLCA	10.2	9.3	91.0	4.5
13	TDCA	47.2	50.7	107.4	5.8
14	TCDCA	50.0	48.4	96.8	5.0
15	TUDCA	24.4	22.2	90.9	5.5

2.4 临床样品测定结果

取三份人血清样品，按 1.3 中的前处理方法及 1.2 中的分析条件进行测定，结果见表 6。

表 6 人血清临床样品检测结果 (nmol/L)

目标物	Sample-001	Sample-002	Sample-003
CA	107.6	20.8	102.4
DCA	754.1	885.1	38.4
CDCA	699.8	573.7	729.9
UDCA	516.5	482.4	433.6
LCA	11.3	89.0	6.0
GCA	473.4	55.1	297.2
GLCA	18.5	16.3	0.7
GDCA	1,473.0	112.6	80.2
GCDCA	1,220.2	269.7	740.8
GUUCA	325.6	45.3	644.8
TCA	27.6	23.0	36.4
TLCA	4.5	2.5	0.4
TDCA	213.4	42.5	12.0
TCDCA	120.0	92.8	108.6
TUDCA	5.7	3.0	13.9

■ 结论

本文使用岛津临床用液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 及人血清中游离胆汁酸检测试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法），建立了人血清中 15 种游离胆汁酸同时测定的方法。使用试剂盒的内标、标准品及质控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良好，标准曲线相关系数均大于 0.99，准确度及精密度均满足试剂盒要求。该方法对肝胆功能相关疾病的临床诊断、治疗管理和生理评估具有重要的意义。