

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 16. 016

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定 15 种胆汁酸的方法分析^{*}

罗腾飞, 胡文胜[△]

(浙江省杭州市妇幼保健院产科 310008)

摘要:目的 初步建立同时测定人体血清中 15 种胆汁酸的超高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的分析方法。**方法** 通过同位素标记的胆汁酸作为内标,使用乙腈对血清中的胆汁酸进行提取,采用 Waters BEH C18 色谱柱,对 15 种胆汁酸进行分离。使用串联质谱进行检测,在负离子模式使用多反应监测模式定量分析血清中胆汁酸的浓度。**结果** 15 种胆汁酸在 1.0~6 000.0 nmol/L 范围内线性关系良好,线性相关系数 $r^2 > 0.993$;目标物的定量限为 1.0~10.0 nmol/L;低、中、高浓度的平均回收率为 97.1%~108.3%,日内、日间平均相对标准偏差小于 7.8%。所开发的方法被应用于检测 24 例健康志愿者的血清标本,健康者的胆汁酸以甘氨酸结合型为主,游离型胆汁酸和牛磺酸结合型胆汁酸浓度相对较低。男性血清中脱氧胆酸浓度显著高于女性,男性血清中甘氨酸脱氧胆酸浓度显著低于女性,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** LC-MS/MS 法能有效分离并定量检测人血清中 15 种胆汁酸的水平,其线性范围广、灵敏度高、精密度好,有望作为临床血清 15 种胆汁酸检测的参考方法。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; 胆汁酸; 胆固醇

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)16-2412-04

Analysis of simultaneous detection of 15 bile acids in human serum by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry^{*}

LUO Tengfei, HU Wensheng[△]

(Department of Obstetrics, Hangzhou Maternal and Child Health Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310008, China)

Abstract: **Objective** To initially establish a method for simultaneous detecting 15 bile acids in human serum by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Acetonitrile was used to extract the bile acids from serum, isotope-labeled bile acid as internal standard. Subsequently, 15 bile acids were separated using Waters BEH C18 column with acetonitrile:methanol-water (with formic acid) as the mobile phase. Tandem mass spectrometry was performed. The concentration of bile acids in the serum was quantified using a multiple reaction monitoring mode in negative ion mode. **Results** Fifteen bile acids had a good linear relationship in the concentration range of 1.0~6 000.0 nmol/L, linear correlation coefficient $r^2 > 0.993$. The limit of quantitation of the target was 1.0~10.0 nmol/L. The average recovery rate of the samples at low, middle and high concentrations were 97.1%~108.3%. Intraday and average inter-day relative standard deviation(RSDs) were less than 7.8%. The developed method was further applied to the detection of serum samples from 24 healthy volunteers that were mainly glycine-binding. Free bile acid and taurine-bound bile acid concentrations were relatively low. The concentration of deoxycholic acid (DCA) in male serum was significantly higher than that in female ($P < 0.05$). While, the concentration of Glycine ursodeoxycholic acid(GUDCA) in male serum was significantly lower than that in female ($P < 0.05$). **Conclusion** The established LC-MS/MS method could effective separate and quantitative detect the levels of 15 bile acids in serum. With character of wide linear range, high sensitivity and precision, this method is expected to be used as a reference method for the detection of 15 kinds of bile acids in clinical serum.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; bile acids; cholesterol

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^[1]。胆汁酸是胆汁的重要组成部分,是人体脂肪代谢的必须物质^[2]。胆汁酸不仅能够

^{*} 基金项目:杭州市社会发展科研自主申报项目(20180533B84)。

作者简介:罗腾飞,女,主治医师,主要从事妇产科方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: huws@zju.edu.cn。

调节葡萄糖和脂代谢,还能与肠道菌群相互作用,具有重要的临床意义^[3]。不同的胆汁酸亚型在临床上具有不同的诊断意义,因此检测每一种亚型的胆汁酸在体内水平而非简单地定量测量总胆汁酸水平,对于肝胆和肠道疾病的筛查、诊断和鉴别诊断具有重要意义^[4]。

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^[5-9],但是目前对于检测人体血清中胆汁酸亚型的研究相对较少,方法通量较低,也缺乏健康人参考范围。本文旨在建立一种基于超高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析胆汁酸亚型的快速方法,并且初步尝试建立了健康人血清中 15 种胆汁酸的参考范围,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 24 例体检健康志愿者(其中男 17 例,女 7 例)为研究对象,年龄 20~45 岁。于上午 10:00—11:00 空腹采集静脉血,室温放置 0.5 h,3 500 r/min 离心 5 min,分离血清后于-80 ℃保存。

1.2 仪器与试剂 Waters Xevo TQD IVD 串联质谱;Acquity UPLC I-Class 超高效液相色谱仪;Masslynx 4.1 工作站(美国 Waters 公司);真空离心浓缩仪(湖南赫西仪器公司);台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪公司);BT125D 电子天平(德国赛多利斯公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒公司);旋涡混合器(美国 Scientific Industries 公司);超纯水机(PALL)。甘氨石胆酸(GLCA)标准品(Toronto Research Chemicals 公司);14 种胆汁酸[胆酸(CA)、石胆酸(LCA)、脱氧胆酸(DCA)、熊脱氧胆酸(UDCA)、鹅脱氧胆酸(CDCA)、牛磺胆酸(TCA)、甘氨胆酸(GCA)、牛磺石胆酸

(TLCA)、牛磺脱氧胆酸(TDCA)、牛磺熊脱氧胆酸(TUDCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)、甘氨脱氧胆酸(GDCA)、甘氨鹅脱氧胆酸(GCDCA)、甘氨熊脱氧胆酸(GUDCA)]标准品及同位素标记的内标氘代胆酸(d4-CA)、氘代脱氧胆酸(d4-DCA)、氘代熊脱氧胆酸(d4-UDCA)(Sigma Aldrich 公司);色谱纯乙腈和色谱纯甲醇(德国 Merck 公司);色谱级甲酸(上海阿拉丁公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清标本处理 移取 100 μL 血清于 1.5 mL 离心管,加入 300 μL 低温保存的含内标乙腈溶液,静置 1 min 后旋涡振荡 5 min,在 4 ℃下高速(11 000 r/min)离心 5 min,吸取上清液 300 μL,低温浓缩至接近干燥,100 μL 的乙腈与水的体积比为 30:70,复溶;在 4 ℃下高速(11 000 r/min)离心 5 min,取上清液于 96 孔板用于 LC-MS/MS 上样分析。

1.3.2 色谱和质谱条件 色谱柱:Waters BEH C18 (50 mm×2.1 mm,1.7 μm)。流动相:A 相为 0.1% 甲酸水溶液,B 相为 0.1% 甲酸-乙腈与甲醇(体积比为 3:1)的溶液;流速为 0.4 mL/min;柱温为 45 ℃。梯度洗脱程序:0~2 min,35%~43%,B;2.0~3.5 min,43%~46%,B;3.5~5.0 min,46%~59%,B;5.0~7.0 min,59%,B;7.0~8.7 min,59%~66%,B;8.7~10.7 min,66%~98%,B;10.7~11.3 min,35%,B。离子源:电喷雾离子源(ESI)。扫描方式:负离子扫描。检测方式:多反应监测(MRM)模式。毛细管电压:3.0 kV。离子源温度:150 ℃。脱溶剂气温度:400 ℃。脱溶剂气流速:800 L/h。锥孔气流速:50 L/h。用时间分段来提高待测物响应值,15 种胆汁酸质谱参数见表 1。

表 1 15 种胆汁酸质谱参数

胆汁酸	离子对(m/z)	驻留时间(s)	锥孔电压(V)	碰撞能量(ev)	胆汁酸	离子对(m/z)	驻留时间(s)	锥孔电压(V)	碰撞能量(ev)
CA	407.3/407.3	0.18	-80	10	GCA	464.3/74.0	0.17	-76	42
d4-CA	411.3/411.3	0.18	-80	10	TLCA	482.3/80.0	0.20	-88	60
LCA	375.3/375.3	0.18	-95	10	GLCA	432.3/74.0	0.16	-64	36
DCA	391.3/391.3	0.18	-84	10	TDCA	498.3/80.0	0.23	-92	62
d4-DCA	395.3/395.3	0.18	-84	10	TUDCA	498.3/80.0	0.17	-92	62
UDCA	391.3/391.3	0.20	-84	10	TCDCA	498.3/80.0	0.23	-92	62
d4-UDCA	395.3/395.3	0.20	-84	10	GDCA	448.3/74.0	0.18	-74	40
CDCA	391.3/391.3	0.25	-84	10	GCDCA	448.3/74.0	0.18	-74	40
TCA	514.3/80.0	0.16	-90	67	GUDCA	448.3/74.0	0.16	-74	40

1.4 统计学处理 用 Masslynx 软件分析 LC-MS/MS 结果;数据结果导出后,用 Microsoft Excel 2017 软件分析 15 种胆汁酸水平;非正态分布的计量资料采用中位数和四分位数间距表示 $[M(P_{25},P_{75})]$,组间比较采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 方法学性能评价

2.1.1 专属性 分别取 6 份不同健康人的空白血清、标准血清样品,按“1.3.1 血清标本处理”要求操作,在 LC-MS/MS 条件下对样品进行测定。在选用条件下,血清中内源性物质不干扰被测物和内标的测定,专属性良好,在上述分析条件下,15 种胆汁酸在各个离子通道中分离良好。

2.1.2 标准曲线线性范围 将倍比稀释的胆汁酸系列混合标准工作溶液取 100 μL,加入内标溶液 300

μL,按“1.3.1 血清标本处理”项下处理并测定。以待测物浓度 X 为横坐标,相对响应值 Y(待测物与相应内标物响应值之比)为纵坐标,用加权最小二乘法进行线性回归分析。建立 15 种胆汁酸的标准曲线,得到线性回归方程和线性相关系数。其中 CA、CDCA、DCA、LCA、UDCA 质量浓度为 1.0~2 000.0 nmol/L,GCA、GDCA、TCA、TCDCA 质量浓度为 10.0~2 000.0 nmol/L,其余物质质量浓度为 10.0~6 000.0 nmol/L。15 种胆汁酸在其范围内呈现良好的线性关系,线性相关系数 r^2 均大于 0.993。

2.1.3 定量限 按照“1.3.1 血清标本处理”平行配制、处理 5 份血清标准曲线最低点样品,并进行测定。根据标准曲线计算获得 15 种胆汁酸实测浓度,CA、CDCA、DCA、LCA、UDCA 的定量限为 1.0 nmol/L,其余物质定量限为 10.0 nmol/L。

2.1.4 提取回收率和精密度试验 向血清中分别添加低、中、高 3 种浓度的标准溶液,其中 CA、CDCA、DCA、LCA、UDCA 的 3 个加标水平分别为 3.0、1 000.0 和 1 500.0 nmol/L;GCA、GDCA、TCA、TCDCA 其余物质的 3 个加标水平分别为 30.0、3 000.0 和 4 500.0 nmol/L;其余每个胆汁酸加标水平分别为 30.0、1 000.0 和 1 500.0 nmol/L,按照“1.3.1 血清标本处理”项方法处理标本,每个添加浓度平行测定 6 次,连续测定 3 d。根据样品结果计算本法的回收率和精密度,见表 2。结果表明,日内、日间平均相对标准偏差(RSD)<7.8%,平均回收率均为 97.1%~108.3%。测定结果表明,血清样品分析的回收率和精密度良好。可见本试验所建立的 LC-MS/MS 法测定血清中 15 种胆汁酸的回收率和精密度符合生物样品测定要求。

2.1.5 稳定性 胆汁酸标准品溶液放置于进样器中,测定 12 h 内胆汁酸浓度,得到胆汁酸对照品溶液稳定性;将含有一定胆汁酸的血清样品按“1.3.1 血清

标本处理”项下处理并测定 12 h 内后胆汁酸浓度,得到处理后放置稳定性;将同一样品放置在室温,测定 24 h 内胆汁酸的浓度,得到室温放置稳定性;将血清样标本放入-20℃冰箱中,第 2 天拿出复融,如此反复 3 次,按“1.3.1 血清标本处理”项下处理并测定,得到反复冻融稳定性。试验结果显示相对偏差均小于 15%,胆汁酸浓度均未出现明显变化,说明该试验方法稳定性良好。

2.2 血清标本的测定 收集 24 例健康人的血清样品,用本法测定其中胆汁酸浓度。结果显示,健康人的胆汁酸以甘氨酸结合型(GCA、GDCA、GCDCA、GUDCA)为主。游离型胆汁酸和牛磺酸结合型胆汁酸浓度相对较低。男性血清中 DCA 浓度显著高于女性,男性血清中 GUDCA 浓度显著低于女性,差异均有统计学意义($P<0.05$),其余胆汁酸差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 2 15 种胆汁酸日内和日间的回收率和精密度(%)				
胆汁酸种类	日内($n=6$)		日间($n=18$)	
	回收率	精密度	回收率	精密度
CA	101.8	4.6	104.3	4.9
CDCA	101.1	3.6	102.1	4.7
DCA	101.7	3.7	104.1	4.3
LCA	108.3	2.7	107.5	3.5
UDCA	100.9	3.8	102.8	4.8
GCA	100.9	2.0	98.9	7.5
GCDCA	105.2	3.7	106.3	5.0
GDCA	102.3	2.2	103.8	3.9
GLCA	98.9	1.6	100.7	3.6
GUDCA	101.3	2.9	100.8	7.8
TCA	99.2	2.2	101.7	6.4
TDCA	104.4	1.8	104.7	3.6
TLCA	101.8	1.8	104.9	3.8
TUDCA	97.1	1.8	99.6	6.4
TCDCA	102.5	2.0	102.5	6.4

表 3 健康男性和健康女性血清中胆汁酸浓度比较[nmol/L, $M(P_{25},P_{75})$]						
性别	n	CA	CDCA	DCA	LCA	UDCA
男	17	48.5(36.1,65.5)	141.9(69.6,254.4)	246.1(152.8,400.5)	8.7(6.0,15.3)	42.5(15.8,79.4)
女	7	44.8(13.8,99.6)	175.0(24.1,234.4)	159.5(79.5,443.4)	7.2(4.1,9.8)	18.4(10.7,84.1)
性别	n	GCA	GCDCA	GDCA	GLCA	GUDCA
男	17	242.6(158.2,398.4)	1798.6(1299.5,2973.4)	481.7(226.4,735.7)	24.5(12.0,38.4)	221.8(141.6,327.1)
女	7	333.8(148.3,470.9)	2795.6(1342.6,3144.7)	417.7(279.8,727.7)	13.6(9.3,27.7)	267.1(149.5,547.8)
性别	n	TCDCA	TDCA	TLCA	TUDCA	TCA
男	17	112.9(52.0,212.7)	37.2(17.8,67.8)	4.6(3.5,5.5)	4.3(2.3,7.0)	22.3(11.3,40.0)
女	7	117.8(71.0,208.0)	36.2(17.4,82.8)	2.1(1.6,6.9)	2.9(17.4,82.8)	21.5(17.3,30.6)

3 讨 论

胆汁酸是胆固醇经肝脏组织代谢的最终产物,是胆汁中的主要成分,胆汁酸的检测具有重要的临床意

义。血液中胆汁酸浓度的增加程度提示患者可能患有不同种类的肝胆疾病。目前临床常规检测方法均只能检测总胆汁酸的浓度变化,不能定性、定量鉴别

不同组分的胆汁酸代谢物谱的变化;血清胆汁酸谱分析可提供胆汁酸肠肝循环是否正常的一项非常重要的信息;在肝脏病变早期,血清中的总胆汁酸不会发生明显改变,而血清中各种亚型胆汁酸浓度将产生相应的变化,因此,鉴别并测定胆汁酸代谢物谱有助于对肝病的早期诊断。

由于 15 种胆汁酸极性分布范围很广,试验采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18、Waters ACQUITY UPLC HSS T3、Thermo Hypersil gold AQ 分离柱。试验表明,BEH C18 对 15 种胆汁酸分离效果最好。本试验尝试使用甲醇-水作为流动相,样品峰洗脱能力较差;使用乙腈-水作为流动相,乙腈洗脱能力较强导致同分异构体分离效果较差;将有机相调整为甲醇与乙腈的混合组分,有机相中甲醇与乙腈的比例为 1:3 时得到的峰形和响应值较理想。水相中加入甲酸配制成 0.1% 甲酸水溶液使目标物响应增大,提高灵敏度。本试验中血清标本采用蛋白沉淀法,经过乙腈处理后,得到良好的效果。整个操作方便快捷,简化了样品前处理过程,降低了检测成本,又提高了检测效率。

本文建立了一种灵敏度高、简便快速和选择性好的 LC-MS/MS 分析法用于测定人血清中胆汁酸的浓度。试验结果显示,15 种胆汁酸在各个离子通道中分离良好,在 1.0~6 000.0 nmol/L 线性范围内线性关系良好,线性相关系数 $r^2 > 0.993$;目标物的定量限为 1.0~10.0 nmol/L;平均回收率在 97.1%~108.3%,日内、日间 RSD 均小于 7.8%,符合生物样品测定要求;胆汁酸对照样品稳定性、血清样品处理后放置稳定性、样品室温放置稳定性、样品反复冻融稳定性的结果显示相对偏差均小于 15%,胆汁酸浓度均未出现偏差。说明该分析方法专属性强,灵敏度高,可以达到较低的定量限,进样量少,可延长色谱柱的寿命,而且用量少,分析时间短,流动相使用少。在对健康人血清标本进行检测时发现健康人的胆汁酸以甘氨酸结合型为主,游离型胆汁酸次之,而牛磺酸结合型胆汁酸浓度最低。牛磺酸结合型胆汁酸的离子化程度较高,甘氨酸结合型离子化程度中等,而游离胆汁酸较低。胆汁酸盐极性越差,越容易与未吸收的纤维素或细菌结合,也越容易通过被动扩散被吸收,因此在人体中的胆汁酸以甘氨酸结合型为主。甘氨酸结合型胆汁酸浓度增加提示糖尿病和妊娠期有胆汁淤积症风险,牛磺酸结合型胆汁酸浓度增加提示有胆汁淤积性肝损伤^[10-12]。本研究发现,男性血清中 DCA 浓度显著高于女性,GUDCA 浓度显著低于女性,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。同样可以观察到,胆汁酸在健康者体内的变化水平较大,需要更多的临床

样本数据,从而建立人体内合理的胆汁酸血清参考范围;而未来进一步通过对不同临床疾病样本的检测,能够准确评估不同胆汁酸亚型对临床疾病的诊断价值。

综上所述,本研究建立的检测方法可应用于人体血清中 15 种胆汁酸亚型浓度的检测,对于未来临床诊断不同的肝胆疾病有较大的应用价值。

参考文献

- [1] 张柳,牛尚梅,马慧娟.胆汁酸与代谢综合征的研究进展[J].医学综述,2016,22(5):964-967.
- [2] 陈德莹,苏小玲,李君,等.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱对血清中结合型胆汁酸的定性分析研究[J].药物分析杂志,2013,33(8):1303.
- [3] VITEK L, HALUZIK M. The role of bile acids in metabolic regulation[J]. J Endocrinol, 2016, 228(3):R85-R96.
- [4] POUPON R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012, 36(Suppl 1):S3-S12.
- [5] GHAFFARZADEGAN T, NYMAN M, JONSSON J A, et al. Determination of bile acids by hollow fibre liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 944:69-74.
- [6] 王文娟,郑丹,刘彬.结合型胆汁酸对胆管癌的诊断价值[J].遵义医学院学报,2016,39(4):403-405.
- [7] NATALINI B, SARDELLA R, GIOIELLO A, et al. Determination of bile salt critical micellization concentration on the road to drug discovery[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 87:62-81.
- [8] BRIAND G, LEMAIRE-EWING S, PARENTE F, et al. Mass spectrometry and inherited metabolic diseases diagnosis[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2015, 73(1):93-106.
- [9] TETZNER N F, MANIERO M G, RODRIGUES-SILVA C, et al. On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils[J]. J Chromatogr A, 2016, 1452:89-97.
- [10] 张菁,许静静,方丽,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测人微量血清中 9 种胆汁酸及其临床意义[J].内科理论与实践,2015,10(3):205-209.
- [11] 胡晓玲,王卫光,吴畏.孕妇血清胆汁酸与甘胆酸测定的临床意义[J].放射免疫学杂志,2004,17(4):294-295.
- [12] 梁春耕.胆汁淤积性肝损伤胆酸谱变化及茵陈蒿汤对其的影响[D].上海:上海中医药大学,2015.

(收稿日期:2017-11-26 修回日期:2018-02-20)