

LC-MS/MS 测定大鼠血清中 15 种胆汁酸成分

王猛猛^{1a}, 俞蕴莉^{1a}, 屈昱晨², 华雯妍^{1a*}, 王吉^{1b}, 张全英^{1a}(1.苏州大学附属第二医院, a.药物临床试验机构, b.肿瘤科, 江苏 苏州 215004; 2.苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 目的 建立同时测定大鼠血清中 15 种胆汁酸浓度的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。方法 血清样本用乙腈蛋白沉淀后, 采用 Xterra RP18(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm)色谱柱分离操作, 以乙腈-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 用电喷雾离子源, 负离子多反应监测。结果 15 种胆汁酸成分在定量范围内线性关系良好, 日内和日间精密度均<10%, 低、中、高浓度提取回收率在 69.93%~88.83%。结论 本研究建立的 LC-MS/MS 法简便、快速、专属性强, 能够适用于大鼠血清中 15 种胆汁酸组分的检测。

关键词: 胆汁酸; 液质联用; 方法学; 分型检测

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1030-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.002

引用本文: 王猛猛, 俞蕴莉, 屈昱晨, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血清中 15 种胆汁酸成分[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1030-1034.

Determination of Fifteen Bile Acids Concentration in Rats' Serum by LC-MS/MS

WANG Mengmeng^{1a}, YU Yunli^{1a}, QU Yuchen², HUA Wenyan^{1a*}, WANG Ji^{1b}, ZHANG Quanying^{1a}(1.The Second Affiliated Hospital of Soochow University, a.Department of Clinical Pharmacology, b.Department of Oncology, Suzhou 215004, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS method for simultaneous determination of 15 bile acids in rats' serum. **METHODS** Serum samples were protein precipitated with acetonitrile and the separation was performed on a Xterra RP18 column(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm). All analytes were gradient eluted with acetonitrile and 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate in aqueous solution, of which flow rate was 1 mL·min⁻¹. Quantitative analysis of 15 bile acids was conducted by a triple-quadrupole mass spectrometer with negative-electrospray ionization(ESI) source, monitored under a multiple reaction monitoring(MRM) mode. **RESULTS** The calibration curves of 15 bile acids were linear in the quantitative range. The RSDs of the intra-day and inter-day precision results were all < 10%. The average extraction recoveries of the control samples at low, middle and high concentrations were between 69.93%~88.83%. **CONCLUSION** Established LC-MS/MS method is simple, rapid and specific, and can be used for the determination of 15 bile acids in rat serum.

KEYWORDS: bile acids; LC-MS/MS; method validation; typing detection

胆汁酸是一类由肝细胞胆固醇代谢生成的甾体化合物, 其结构具有两亲性, 一直以来, 胆汁酸都被认为在机体内扮演着脂肪乳化剂的角色, 在体内能够形成胶束, 进而促进膳食脂肪以及肠道脂溶性维生素的吸收^[1-2]。肝细胞内主要合成 2 种游离型初级胆汁酸——胆酸(choleic acid, CA)以及鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA), 在肝脏内游离型胆汁酸能够与甘氨酸、牛磺酸结合, 形成相应的结合型胆汁酸。机体进食后, 胆汁酸随胆汁被分泌到小肠, 在肠道内, 初级胆汁酸在肠道微生物的作用下形成亲脂性的次级胆汁酸脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)和石胆酸

(lithocholic acid, LCA), 其中大部分组分能够在回肠末端经肝肠循环重吸收返回肝脏, 仅有少量胆汁酸能够进入全身循环或随粪便排出体外^[3-5]。

近年研究发现, 胆汁酸能够作为体内信号分子通过法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)以及孕烷 X 受体(pregnane X receptor, PXR)等核受体介导体内生物信号的传导^[6-7]。同时, 胆汁酸也存在着不同程度的细胞毒性, 不同胆汁酸亚型在体内的生理及病理生理学功能差异很大。例如, LCA 是毒性最强的胆汁酸组分, 它是 PXR 最有效的内源性受体^[8], 而 CDCA 细胞毒性较小, 它是 FXR 最有效的内源性配体^[9]。目前对于不同胆汁

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81603181); 苏州市科技发展计划(SYSD2018234); 苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2017015)

作者简介: 王猛猛, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0512)67783687 E-mail: wangmm25@126.com *通信作者: 华雯妍, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0512)67783682 E-mail: huawenyan2010@163.com

酸组分在机体内所具有的具体生理以及病理学功能还不是十分清楚, 其中一部分原因就是体内胆汁酸成分复杂, 同分异构体较多, 对不同胆汁酸亚型的定量较为困难。

本实验建立了 HPLC-MS/MS 测定大鼠血清中 15 种胆汁酸组分浓度的方法, 旨在为大鼠胆汁酸谱的研究提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

API-4000 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Applied Biosystem Sciex 公司); 1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Analyst1.4.2 数据处理系统。

1.2 药品及试剂

CA(批号: SLBH1420V; 纯度 $\geq 98\%$)、DCA(批号: BCBQ4388V; 纯度 $\geq 98\%$)、CDCA(批号: MKBS2816V; 纯度 $\geq 97\%$)、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA, 批号: SLBQ1474V; 纯度 $\geq 99\%$)、LCA(批号: BCBS3684V; 纯度 $\geq 95\%$)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA, 批号: SLBQ5062V; 纯度 $\geq 98\%$)、牛磺去氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA, 批号: SLBR0659V; 纯度 $\geq 98\%$)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA, 批号: SLBR7538V; 纯度 $\geq 97\%$)、牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA, 批号: 026M4184V; 纯度 $\geq 95\%$)、牛磺石胆酸(taurolithocholic acid, TLCA, 批号: SLBQ8462V; 纯度 $\geq 98\%$)、甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA, 批号: SLBR1284V; 纯度 $\geq 97\%$)、甘氨酸去氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA, 批号: BCBN5741V; 纯度 $\geq 97\%$)、甘氨酸鹅去氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA, 批号: SLBM3327V; 纯度 $\geq 97\%$)、甘氨酸熊去氧胆酸(glycoursodeoxycholic acid, GUDCA, 批号: BCBR4054V; 纯度 $\geq 96\%$)以及 2,2,3,4,4- d_5 氘代石胆酸(lithocholic acid-2,2,3,4,4- d_5 , D5-LCA, 批号: SH1094V; 纯度 98 atom% D)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 甘氨酸石胆酸(glycohithocholic acid, GLCA, 中国 J&K 科技公司, 批号: 1-TMH-13-4; 纯度 $\geq 98\%$); 乙腈为色谱纯, 醋酸铵为分析纯, 水为灭菌注射用水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Waters Xterra RP₁₈

(4.6 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μ m); 保护柱: Phenomenex Security Guard TMC₁₈ 预柱(4 mm $\times$ 3.0 mm); 流动相: 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~16 min, 70%A; 16~18 min, 70% $\rightarrow$ 10%A; 18~23 min, 10%A; 23~30 min, 70%A; 流速为 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样体积为 10 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源, 负离子检测, 扫描方式为多反应监测(MRM), 电喷雾电压: -4 200 V; 碰撞气: 4 psi; 气帘气: 30 psi; 雾化气: 50 psi; 辅助气: 50 psi; 离子源温度: 500 $^{\circ}$ C。15 种胆汁酸及内标优化后的参数见表 1。

表 1 15 种胆汁酸组分的质谱学参数

Tab. 1 Mass spectrum conditions of 15 bile acids

组分	母离子/ m/z	子离子/ m/z	去簇电压/ V	碰撞电压/ eV	保留时间/ min
CA	407.4	407.4	-177	-18	4.67
CDCA	391.4	391.4	-174	-14	13.32
UDCA	391.4	391.3	-170	-12	7.03
DCA	391.4	391.4	-180	-13	16.56
LCA	375.1	375.1	-200	-12	21.12
TCA	514.5	514.5	-220	-13	4.67
TCDCA	498.4	498.4	-270	-8.4	11.42
TUDCA	482.2	482.4	-200	-9.5	5.17
TDCA	498.5	498.5	-220	-20	13.67
TLCA	482.3	482.3	-206	-29	19.41
GCA	464.4	464.4	-145	-10	3.91
GCDCA	448.4	448.2	-150	-10	8.77
GUDCA	448.4	448.4	-150	-13	4.13
GDCA	448.5	448.5	-150	-24	10.70
GLCA	432.5	432.3	-150	-12	19.30
内标	380.4	380.4	-200	-12	21.07

2.2 空白血清的制备

血清样本中存在的内源性胆汁酸会对方法学的建立产生干扰, 因此本实验采用活性炭对这些内源性胆汁酸成分进行吸附处理, 处理方法为取肝素抗凝正常大鼠空白血清加入活性炭, 配置成活性炭浓度为 0.1 g $\cdot$ mL⁻¹ 的血清混悬液, 室温下涡旋 1 h 使其充分接触吸附, 于 13 000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上悬液过滤得到本实验所需空白血清。

2.3 溶液的配制

2.3.1 胆汁酸储备液及系列工作液 分别取 15 种胆汁酸组分对照品约 10 mg, 精密称定, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 充分混匀得到浓度为 1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的各胆汁酸储备液。随后将 15 种胆汁酸组分的标准曲线储备液用 50% 甲醇溶液稀释混合, 最终得到 15 种胆汁酸组分质量浓度分别为 10, 25, 50, 150, 500, 1 500, 5 000, 15 000, 30 000 ng $\cdot$ mL⁻¹ 的混合对照品曲线系列工作液, 冷藏保存。

2.3.2 内标储备液及系列工作液 取内标对照品约 10 mg, 精密称定, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,

充分混匀得到浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标储备液。随后将其用 50% 甲醇溶液进一步稀释得到质量浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作液, 冷藏保存。

2.4 血清样本预处理

吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 血清样本至 1.5 mL 塑料离心管中, 加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的内标工作液后再加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈沉淀蛋白, 涡旋 1 min , 于 $15\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 。取上清至 1.5 mL 塑料离心管中, 用真空浓缩仪 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 挥干溶剂, $100\text{ }\mu\text{L}$ 50% 甲醇溶液复溶, 涡旋 1 min , $15\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min , 取上清至进样瓶中, 最终进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 分析测定。

2.5 方法学考察

2.5.1 特异性 分别取大鼠空白血清样本、空白血清加胆汁酸工作液以及内标工作液样本、正常 Wistar 大鼠血清加入内标样本预处理后进样测定分析, 方法特异性色谱图见图 1。空白血清样本中各胆汁酸出峰位置无内源性干扰, 内标及各胆汁酸组分测定无相互干扰。本测定方法具有较高的特异性, 能够用于大鼠血清中 15 种胆汁酸组分的测定。

2.5.2 标准曲线与线性范围 取各浓度胆汁酸标准曲线系列工作液 $20\text{ }\mu\text{L}$, 加入 $180\text{ }\mu\text{L}$ 大鼠空白血清, 配制成各胆汁酸组分质量浓度分别为 1, 2.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1 500, 3 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线系列样本, 按“2.4”项下方法进行血清样本预处理操作后, 再按“2.1”项下色谱和质谱条件进样分析, 记录色谱峰。并以 15 种胆汁酸加入浓度 C 为横坐标(x), 以待测物 A_s 与内标 A_i 的峰面积比值 ($f=A_s/A_i$) 为纵坐标(y) 进行权重回归(权重系数为 $1/C^2$)。UDCA、LCA、TCA、TCDCa、TUDCA、TLCA 以及 GLCA 的线性范围为 $1\sim 500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其余胆汁酸组分线性范围为 $1\sim 3\text{ }000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 浓度与峰面积的比值具有良好的线性关系, 标准曲线各浓度点实测值的偏差 $[\text{RE}=(\text{实测值}-\text{加入浓度})/\text{加入浓度}\times 100\%]$ 均在 $\pm 15\%$ 以内, 相关系数(r^2) 的值在 $0.9874\sim 0.9984$ 。结果见表 2。

2.5.3 精密度和准确度试验 按“2.5.2”项下方法分别配制 2.5, 50, 400, 2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 个浓度的质控血清样本, 每个浓度平行配制 6 个。按“2.4”项下方法进行血清样本预处理操作后, 再按“2.1”项下色谱和质谱条件进样分析, 记录色谱峰。连续测定 3 个分析批, 以随行标准曲线计算最低定量限与质控样品的浓度, 将同一浓度 3 个批次共 18 个样品的实测浓度进行单因素方差分析, 计算批内、批间精密度的 RSD 和准确度 RE。

大鼠血清中 15 种胆汁酸低、中、高 3 个浓度质控样品批内和批间 RSD 均 $<10\%$, RE 均在 $\pm 15\%$ 内, 结果见表 3。

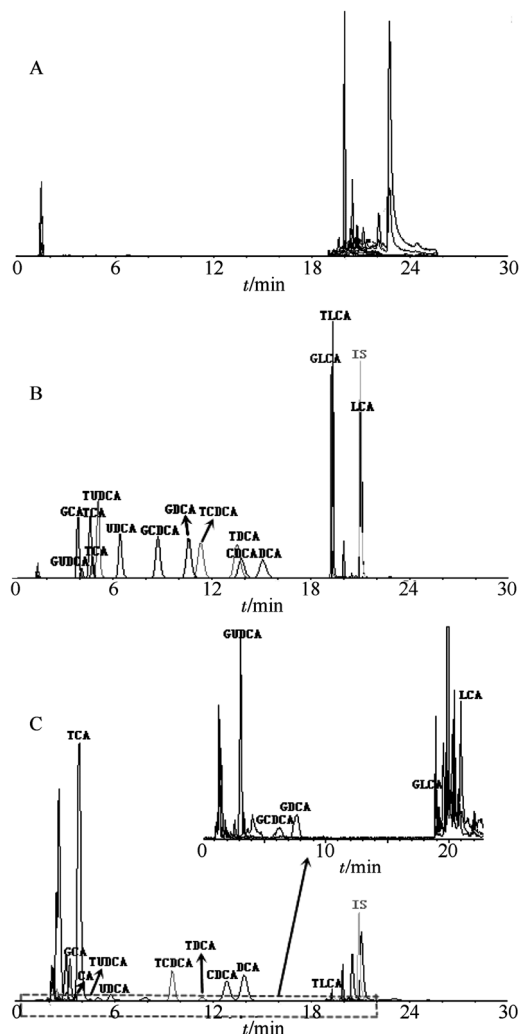


图 1 大鼠血清 15 种胆汁酸和内标色谱图

A—大鼠空白血清样本; B—空白血清加入 15 种胆汁酸混合工作液和内标工作液样本; C—正常大鼠血清加入内标样本。

Fig. 1 Chromatograms of 15 bile acids and IS in rats' serum A—a blank rats' serum sample; B—blank serum spiked with 15 bile acids and IS; C—normal rats' serum spiked with IS.

2.5.4 基质效应 按“2.4”项下方法操作处理 24 份空白血清得到空白血清基质后, 分别加入各浓度质控工作液及内标工作液, 以其进样得到的峰面积除以同种操作下以 50% 甲醇溶液代替空白血清基质的待测物面积, 计算血清中其他内源性物质对胆汁酸和内标的绝对基质效应, 再以各胆汁酸的绝对基质效应除以内标的绝对基质效应, 得到各胆汁酸的内标归一化基质效应因子。15 种胆汁酸组分内标归一化基质效应的 RSD 均 $<15\%$, 内源性基质对待测物以及内标的影响程度在生物样本分析的要求范围内。结果见表 4。

表2 线性范围、回归方程以及相关系数

Tab. 2 Linear ranges, regression equations and correlation coefficient

组分	线性范围/ng·mL ⁻¹	回归方程	相关系数
CA	1~3 000	y=0.000 296x+0.000 539	0.991 6
CDCA	1~3 000	y=0.000 589x+0.000 594	0.995 6
UDCA	1~500	y=0.000 833x+0.000 799	0.996 4
DCA	1~3 000	y=0.000 503x+0.000 483	0.998 4
LCA	1~500	y=0.001 72x+0.006 08	0.990 8
TCA	1~500	y=0.000 970x+0.000 701	0.990 6
TCDCa	1~500	y=0.000 458x+0.000 511	0.995 4
TUDCA	1~500	y=0.001 29x+0.000 686	0.990 8
TDCA	1~3 000	y=0.000 704x+0.000 574	0.992 4
TLCA	1~500	y=0.001 39x+0.000 613	0.990 0
GCA	1~3 000	y=0.000 729x+0.000 102	0.994 4
GUDCA	1~3 000	y=0.000 125x+0.000 156	0.996 0
GCDCA	1~3 000	y=0.000 972x+0.000 23	0.993 2
GDCA	1~3 000	y=0.000 607x+0.000 193	0.995 0
GLCA	1~500	y=0.001 21x+0.001 39	0.987 4

表3 精密度和准确度结果

Tab. 3 Results of precision and accuracy tests

组分	质控浓度/ ng·mL ⁻¹	批内		批间	
		RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
CA	2.5	5.02	-1.80	3.94	-3.67
	50	2.59	10.58	3.08	11.77
	2 500	3.23	11.11	2.47	9.67
CDCA	2.5	8.45	0.11	4.40	3.33
	50	7.73	9.08	2.26	12.10
	2 500	0.70	5.89	3.32	5.60
UDCA	2.5	5.21	0.36	3.42	2.73
	50	0.77	2.36	10.83	11.27
	400	5.75	2.36	9.50	7.79
DCA	2.5	7.95	2.46	5.41	-0.47
	50	2.46	8.51	2.97	7.80
	2 500	11.73	8.24	2.65	11.47
LCA	2.5	3.96	5.60	4.08	4.00
	50	5.06	9.37	1.92	9.97
	400	8.03	-2.08	1.41	1.08
TCA	2.5	3.93	-3.89	5.99	-3.07
	50	4.23	7.46	4.72	9.23
	400	5.98	4.36	3.71	4.92
TCDCa	2.5	8.79	1.87	4.02	-0.60
	50	2.41	8.22	2.38	7.43
	400	5.84	3.06	4.14	0.58
TUDCA	2.5	2.60	-7.98	3.59	-8.13
	50	1.06	8.03	3.31	7.83
	400	5.36	1.92	3.08	4.13
TDCA	2.5	5.46	2.87	2.48	4.60
	50	2.95	7.97	2.18	8.30
	2 500	1.05	3.62	4.42	3.73
TLCA	2.5	3.96	5.60	4.08	5.60
	50	5.06	9.37	1.92	4.97
	400	8.03	-2.08	1.41	3.29
GCA	2.5	6.99	1.44	4.38	4.67
	50	0.78	9.93	2.27	9.57
	2 500	5.09	9.42	2.53	9.20
GCDCA	2.5	13.34	-1.02	4.19	5.20
	50	1.40	10.36	2.80	10.13
	2 500	5.41	10.22	1.92	7.80
GUDCA	2.5	10.05	-0.42	5.97	-3.20
	50	3.87	2.16	5.62	3.97
	2 500	9.00	3.80	3.93	0.20
GDCA	2.5	8.59	0.47	5.86	3.33
	50	8.62	7.93	2.32	12.10
	2 500	8.07	9.22	1.98	5.60
GLCA	2.5	5.76	-4.13	6.33	-2.73
	50	9.18	6.39	5.03	10.73
	400	10.72	6.64	3.24	11.33

2.5.5 提取回收率 按“2.5.2”项下方法分别配制 2.5, 50, 400, 2 500 ng·mL⁻¹ 4 个浓度的质控血清样本, 每个浓度平行配制 6 个, 以其进样得到的峰面积除以“2.5.4”项下空白血清经处理后直接加入相应质控工作液和内标工作液后进样得到的峰面积, 计算血清中 15 种胆汁酸成分和内标的提取回收率。大鼠血清中 15 种胆汁酸组分的提取回收率均在 69.93%~88.83%, 内标的提取回收率为 80.41%, 见表 4。

表4 提取回收率和基质效应结果

Tab. 4 Results of recovery and matrix effect tests

组分	质控浓度/ ng·mL ⁻¹	回收率/%	基质效应/%
CA	2.5	79.77±5.52	102.78±11.00
	50	77.55±2.29	98.40±6.30
	2 500	79.29±5.66	100.29±10.33
CDCA	2.5	84.42±5.83	101.30±11.52
	50	76.11±1.04	100.88±7.79
	2 500	79.11±5.42	98.51±9.02
UDCA	2.5	81.24±4.01	103.82±8.65
	50	76.42±1.36	99.66±4.57
	400	82.28±1.95	98.18±5.56
DCA	2.5	82.11±6.04	101.88±5.72
	50	76.89±2.63	100.41±6.73
	2 500	79.04±5.75	99.12±9.28
LCA	2.5	72.95±6.71	85.65±3.74
	50	69.93±1.57	94.41±5.36
	400	80.92±2.75	94.10±3.83
TCA	2.5	87.35±2.42	85.41±8.68
	50	77.16±2.38	94.75±7.86
	400	76.14±2.76	94.12±4.66
TCDCa	2.5	79.83±6.98	102.21±12.20
	50	74.80±2.00	110.12±7.96
	400	77.60±3.42	112.69±5.82
TUDCA	2.5	81.55±2.55	93.48±11.53
	50	78.65±2.06	99.54±5.78
	400	78.62±1.85	104.15±4.57
TDCA	2.5	83.73±5.94	102.99±7.01
	50	74.70±1.46	107.69±8.71
	2 500	77.41±5.19	112.57±12.11
TLCA	2.5	79.63±3.34	107.75±11.43
	50	76.52±6.24	109.83±9.51
	400	87.19±3.76	113.57±11.24
GCA	2.5	81.33±1.73	89.38±9.57
	50	80.87±2.60	88.79±7.39
	2 500	84.09±4.30	96.67±8.28
GCDCA	2.5	82.08±5.16	91.55±11.91
	50	77.62±1.83	96.29±7.72
	2 500	80.81±4.84	103.34±9.66
GUDCA	2.5	76.12±3.83	96.32±5.74
	50	79.16±2.37	93.05±6.28
	2 500	78.94±5.99	89.71±9.20
GDCA	2.5	82.64±2.88	92.76±11.61
	50	77.36±1.38	102.51±5.23
	2 500	74.46±5.03	107.76±12.47
GLCA	2.5	88.83±10.77	102.75±12.06
	50	88.24±9.64	108.86±6.76
	400	87.63±6.55	109.06±6.81

2.5.6 稳定性试验 根据样品制备与分析过程,分别考察放置于自动进样器 72 h、室温放置 4 h 后, -30 ℃ 反复冻融 3 次及 -80 ℃ 冰箱中冷冻保存 90 d 后的稳定性,其中每个条件下低、中、高 3 个质控浓度每个浓度的样品平行制备 3 份。各胆汁酸组分稳定性样本室温放置 4 h 后实测浓度与理论浓度的 RE 在 -14.13%~3.07%,放置于自动进样器 72 h 后实测浓度与理论浓度的 RE 在 -14.17%~2.87%、-30 ℃ 反复冻融 3 次后实测浓度与理论浓度的 RE 在 -12.75%~8.13% 及 -80 ℃ 冰箱中冷冻保存 90 d 后实测浓度与理论浓度的 RE 在 -12.00%~4.53%。稳定性试验结果表明,各胆汁酸组分稳定性样本实测浓度与理论浓度的 RE 均在 ±15% 之内, RSD 均 ≤ 15%,大鼠血清中胆汁酸在本研究考察范围内稳定性良好。

3 讨论

大鼠体内胆汁酸由于成分复杂,同分异构体较多,不同胆汁酸亚型间的含量差异较大,且大部分血清中胆汁酸亚型浓度均为 ng 级,因此对其胆汁酸谱方法学的建立较为困难。目前文献中对于血中胆汁酸检测的前处理方法主要有固相萃取法^[10]和蛋白沉淀法^[11],本实验采用蛋白沉淀法,相比于固相萃取,采用乙腈沉淀蛋白的前处理方法更为简单快捷,适用于大批量样本的测定。

胆汁酸分子内既含有亲水性的羟基和羧基,又含有疏水性的烃核和甲基,这 2 类不同性质集团的存在使得胆汁酸在结构上具有亲水和疏水 2 个侧面^[12],这种两亲性结构的存在使得胆汁酸能够作为表面活性剂加速脂类的消化。同时,这也使得 pH 对各胆汁酸组分数谱行为影响较大。笔者考察了不同浓度的缓冲盐和 pH 对各胆汁酸组分数谱分离和峰形的影响,发现 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液可以使得各胆汁酸组分完全分离,并呈现良好的峰形。同时本实验采用同位素氘代内标,使得待分析组分与内标的物理性质和化学性质更为接近,最大程度上减少了前处理及分析过程中产生的误差。

综上所述,本研究建立的 LC-MS/MS 可同时

测定大鼠血清中 5 种游离型胆汁酸——CA、CDCA、UDCA、DCA 和 LCA 以及其相应的甘氨酸结合型和牛磺酸结合型胆汁酸共 15 种的浓度,经方法学考察,该方法具有前处理简单快捷、灵敏度高、专属性好的特点,能够用于大鼠血清中胆汁酸谱的研究。

REFERENCES

- [1] CHIANG J Y. Bile acids: regulation of synthesis [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(10): 1955-1966.
- [2] TRAUNER M, CLAUDEL T, FICKERT P, et al. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism [J]. *Dig Dis*, 2010, 28(1): 220-224.
- [3] ZHANG J C, NIE Q H. Metabolism of bile acid and related diseases progression [J]. *Chin J Gastroenter Hepatol(胃肠病学和肝病学杂志)*, 2008, 17(11): 953-956.
- [4] FALANY C N, JOHNSON M R, BARNES S, et al. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(30): 19375-19379.
- [5] 邓漾, 韩天权. 胆汁酸代谢途径的研究进展[J]. *国外医学*, 2000, 20(4): 228-232.
- [6] CHIANG J Y. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(4): 443-463.
- [7] ZOLLNER G, MARSCHALL H U, WAGNER M, et al. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3(3): 231-251.
- [8] STAUDINGER J L, GOODWIN B, JONES S A, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3369-3374.
- [9] PARKS D J, BLANCHARD S G, BLEDSOE R K, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor [J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1365-1368.
- [10] ALNOUTI Y, CSANAKY I L, KLAASSEN C D. Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 873(2): 209-217.
- [11] HUANG J, BATHENA S P, CSANAKY I L, et al. Simultaneous characterization of bile acids and their sulfate metabolites in mouse liver, plasma, bile, and urine using LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 1111-1119.
- [12] NIE Q H, ZHANG Y F. Metabolism of bile acid [J]. *Chin Hepatol(肝脏)*, 2004, 9(4): 247-249.

收稿日期: 2019-06-25

(本文责编: 李艳芳)