

基于 LC/MS/MS 技术快速检测干血片或血清中 17 种胆汁酸的方法

翟立斐

(上海睿质科技有限公司, 上海 200000)

【摘要】本文提出借助液相色谱-质谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术, 对干血片、血清中的 17 种胆汁酸进行检测。检测步骤包括: 获取样本后, 做好样品前处理, 在样本中添加甲醇溶液, 经超声获取提取液, 并向超滤管转移, 完成离心处理。将超滤管取出, 在孔板中放置提取液, 经 LC-MS/MS 技术处理, 得到胆汁酸成分含量。LC-MS/MS 技术应用优势显著, 能够实现对 17 种胆汁酸的同时检测, 通过合理选择流动相、液相色谱柱, 可实现同分异构体分离, 完成定量。

【关键词】干血片; 血清; 胆汁酸; LC/MS/MS 技术

引言

胆汁酸主要经肝脏生成, 胆囊对胆汁酸浓缩处理后, 能够充分在脂肪代谢中发挥重要作用。肝脏、胆囊疾病均会在一定程度上对胆汁酸代谢、转运产生影响, 进而引发尿液、血清中存在的胆汁酸出现变化。当前临床针对肝脏疾病主要借助血清胆汁酸谱进行测定, 有利于为肝脏疾病诊断提供依据。当前国内外在干血片检测方面的研究内容相对较少。主要是因为常规检测方法下, 难以满足干血片灵敏度需求, 而免疫法同样无法对多种胆汁酸亚型进行检测。后续研究发现, 经 LC-MS/MS 技术处理, 灵敏度较高, 能够对胆汁酸亚型进行检测, 并且定量精准。

一、LC-MS/MS 技术概述

液相色谱-质谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术是结合液相色谱、质谱的仪器设备^[1]。该仪器具备液相色谱仪的功能, 还具有质谱仪的功能, 在组分鉴别能力方面优势显著, 可用于对有机混合物进行分离处理。该设备能够在明确有机物待测物品的基础上, 分离相应的有机物成分, 并且经质谱检测处理, 可对分离后的有机物进行分析, 获取到相应的有机物分子量, 并得到相应的结构、浓度信息。仪器以电喷雾电离技术作为依托, 能够提高质谱处理效率, 仪器使用可提升数据处理效率, 可降低数据处理难度。

二、研究背景

胆汁酸是由胆固醇经过合成后形成的产物, 属于一种两亲性分子^[2]。人体肝脏内部能够合成胆汁酸, 并且在进餐后, 还能够形成胆汁, 促进脂类物质消化。既往研究显示, 胆汁酸进入到肠道后, 门静脉重吸收处理后进入肝脏后的胆汁酸占比 95%。而通过采取肝脏重吸收处理, 可形成肠肝循环。当

前健康人群中, 胆汁酸池在大小方面基本一致, 而受到相关生理、病理因素影响, 将会导致胆汁酸合成异常, 进一步影响胆汁酸运输, 引发肠肝循环异常, 使人体内胆汁酸含量出现变化。当前临床认为胆汁酸能够起到调控信号的作用, 并且与多种疾病发病密切相关。目前, 总胆汁酸检测属于常规检测手段, 在临床应用广泛。但是后续研究发现, 采取个别胆汁酸浓度检测处理, 具有更加显著的作用。例如, 鹅脱氧胆汁酸浓度变化与慢性主动脉周围炎密切相关。而脱氧胆汁酸的浓度含量与大肠癌患者患病情况密切相关^[3]。对比健康人群, 当患者患有大肠癌后, 脱氧胆汁酸浓度显著提升。而甘氨结合型胆汁酸检测工作能够为肝胆疾病诊断提供依据, 并且检测灵敏度较高。因此, 对胆汁酸分型检测工作具有重要意义, 能够明确人体胆汁酸代谢情况, 提高疾病诊治工作的准确性。同时, 考虑到人体内结合型胆汁酸在化学结构方面基本一致, 并且涉及到的同分异构体相对较多, 伴随极性差别大的情况。并且部分血浆中的胆汁酸还会出现低浓度情况。目前胆汁酸分型检测工作难度较高。

对既往临床文献进行研究, 有研究选取 15 种胆汁酸测定方法进行研究。有学者选择内标为氯霉素, 保留时间具体在 2.41-5.90min, 该方法能够缩短胆汁酸出峰时间, 在一定程度上缩短进样时间^[4]。但是该方法也会伴随基质效应, 进而导致测定结果受到负面影响。后续有文献提出, 可应用固相萃取法或者沉淀蛋白法进行检测。该类方法操作简单, 检测效率较高, 涉及到的样本以及溶剂内容较少, 可实现大批量检测工作。但是就目前而言, 我国医疗机构在胆汁酸分型检测技术方面尚未形成完善的体系, 虽然总胆汁酸浓度检测工作操作简单, 能够在一定程度上提升检测效率, 但是最终检测结果在

肝脏疾病诊断、治疗方面的参考价值存在局限性。对比总胆汁酸浓度检测工作,采取个别胆汁酸浓度检测工作,诊断灵敏度更高,可准确判断部分肝脏疾病进程,具有积极意义。本次研究考虑到传统胆汁酸检测工作存在的问题,提出借助LC/MS/MS技术,对于血片或血清中17种胆汁酸进行检测,有效提升检测工作准确性、灵敏度,优化检测效率,确保能够为胆汁酸分型检测工作提供技术支持,进一步提高临床肝脏疾病诊断效能。

三、干血片或血清中17种胆汁酸检测方法

本文进一步对干血片或血清中17种胆汁酸检测方法进行研究,分析LC-MS/MS技术的应用。

(一) 干血片制备

做好环境条件控制,温度要求在23℃左右,湿度控制在60%上下。取全血,滴入到滤纸片上,经自然晾干处理后,直到样本完全干燥。选取血片中心,经打孔器打孔处理,作为备用。最终血片可形成滤纸干血片,也就是本次研究需要的干血片样本。本文研究要求干血片样本应为1-5片,直径应控制在2-12mm。

(二) 样本前处理

获取血清样本或者干血片样本,添加甲醇溶液,按照规范操作,经超声提取处理,获取提取液。将提取液放置到准备好的超滤管中,完成离心处理。将超滤管取出,经离心处理后的提取液转移至96孔板中,经LC/MS/MS技术检查处理,结合标准要求,获取胆汁酸成分含量。本次研究共包括17种胆汁酸。其中超滤管规格应控制在1-3KD,0.1-1ML。离心要求转速应达到10000-20000r/min,离心时间控制在5-15min。

(三) 胆汁酸质谱参数

本次经检测处理后,针对17种胆汁酸,获取相应的质谱参数,在这一过程中,应合理控制质谱条件,应采取多反应监测,完成扫描处理。应加强仪器参数控制。其中,鞘气流量为60Arb,喷雾电压为2500V,辅助气体为15Arb,传输管温度为250℃,喷涂电压为2500V,离子源温度为350℃。

表 1 胆汁酸质谱参数

英文名称	母离子 (M/Z)	子离子 (M/Z)
UDCA	391.4	390.8
CA	407.3	407.3
CDCA	391.4	390.8
DCA	391.4	390.8
GUDCA	448.4	74.1
GCA	464.3	74.0
TUDCA	498.4	80.0
TCA	514.3	80.1
GCDCA	448.4	74.1
GDCA	448.4	74.1
TCDCa	498.4	80.0
TDCA	498.4	80.0
GLCA	432.3	74.0
LCA	375.3	375.3

英文名称	母离子 (M/Z)	子离子 (M/Z)
TLCA	482.3	80.1
THDCA	498.4	80.0
GHDCA	448.4	74.1
LCA-D4	379.5	358.217
DCA-D4	395.5	346.217
UDCA-D4	395.5	377.217
CA-D4	411.3	411.3
GLCA-D4	436.58	392.217
GUDCA-D4	452.3	74.042
GDCA-D4	452.3	74.042
GCDCA-D4	452.3	74.042
GCA-D4	468.3	74.042
TLCA-D4	486.3	79.958
TCDCa-D4	502.5	79.883
TDCA-D4	502.5	79.883
TUDCA-D4	502.5	79.883
TCA-D4	518.5	79.883

借助LC/MS/MS技术,流动相中可添加氨水、甲磺胺,完成同分异构体分离处理,实现对同分异构体亚型的定量。其中,流动相A主要指氨水(0.1%)、甲酸铵(5mM)形成的超纯水相。流动相B主要指100%纯甲醇。

流动相梯度详见表2。

表2 流动相梯度表

时间	流动相A (%)	流动相B (%)	流速 (mL/min)
0.0	50	50	0.5
0.1	50	50	0.5
9.0	20	80	0.5
10.5	20	80	0.5
10.51	50	50	0.5
12.0	50	50	0.5

按照上述3.2中样本前处理方法,制作校准曲线每个浓度点的处理。共选取7个水平校准品,借助同位素内标定量法,设置X轴为标准物浓度,Y轴为标准物与内标物峰面积,可建立出相应的校准曲线。在各项胆汁酸浓度范围内,线性方程良好,相关系数超过0.99,与临床定量要求相符。干血片样本、血清样本中可提取到3组同分异构体分离图谱,并且均属于不同胆汁酸亚型,采用上述流动相A和B,按照上述表2中液相梯度,建立在有效分离,可实现准确定量。

(四) 样本加标回收试验结果

选取10 μL样品,样品为血清、干血片,统计回收率。干血片、血清基质胆汁酸亚型回收率处于85~115%范围内,与临床要求相符。详见表3、4。

表3 干血片回收试验结果

胆汁酸组分	加标浓度 (ng/mL)	加标回收率 (%)
UDCA	500	91.6
CA	800	96.9
CDCA	400	91.8
DCA	1000	88.4
GUDCA	200	92.5
GCA	1000	95.4
TUDCA	500	92.4

胆汁酸组分	加标浓度 (ng/mL)	加标回收率 (%)
TCA	500	94.4
GCDCA	1200	90.4
GDCA	1200	93.6
TCDCa	500	90.4
TDCA	500	89.4
GLCA	200	93.0
LCA	200	89.5
TLCA	100	87.0
OTHDCa	50	94.0
GHDCA	50	90.0

表4 血清回收试验结果

胆汁酸组分	加标浓度 (ng/mL)	加标回收率 (%)
UDCA	500	93.8
CA	800	95.9
CDCA	400	93.0
DCA	1000	89.4
GUDCA	200	89.5
GCA	1000	96.5
TUDCA	500	94.2
TCA	500	96.4
GCDCA	1200	92.2
GDCA	1200	94.4
TCDCa	500	93.6
TDCA	500	91.4
GLCA	200	89.5
LCA	200	91.5
TLCA	100	92.0
THDCa	50	92.0
GHDCA	50	88.0

(五) 特异性试验结果

筛选空白血浆, 不设置内标, 按照血浆样本处理方法, 记录LC-MS/MS图, 详见图1。提取空白血浆, 将180 μ L血浆放入到胆汁酸(4000ng $\cdot$ mL⁻¹)中, 经混匀处理后, 确保最终胆汁酸浓度控制在400ng $\cdot$ mL⁻¹, 得到血浆样品, 详见图2。本次研究结果显示, 在空白血浆中, 胆汁酸在出峰位置方面未出现内源性干扰情况, 并且内标、胆汁酸测定结果也没有出现干扰情况。总体而言, 经LC-MS/MS技术检测处理, 特异性较高, 可适用于17种胆汁酸检测处理。

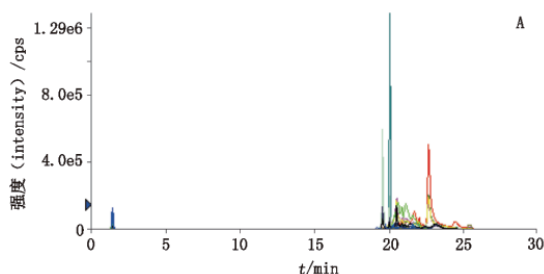


图 1 空白血浆检测图

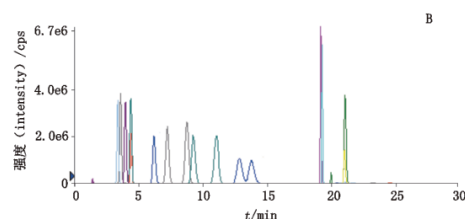


图 2 血浆样品检测图

(六) 精密度试验结果

提取空白血浆, 添加质控工作液, 经专业技术人员进行配置处理, 可获取到质控血浆样品, 共计配置6份。每天测定1批, 共计需要测定3d。测定1批次后, 可获取相应的标准曲线, 记录内标峰面积, 经检测处理后, 胆汁酸按照低、中、高三三个浓度出发, 对比批间RSD, 均在10%以内, RE可控制在15%范围内。

(七) 稳定性试验结果

获取质控血浆样品, 对质控血浆样品进行混合处理, 并完成分装, 每份样品共计200 μ L。首批浓度控制在72h, 完成进样分析处理。在第2批中, 将浓度控制为3份, 经室温放置处理, 在24h后进行分析。在第3批中, 可将浓度分为3份, 保存环境为-30 $^{\circ}$ C, 经过反复冻融处理后, 完成相应的操作。在第4批中, 按照浓度进行分装处理, 共计3份样品, 保存温度为-80 $^{\circ}$ C, 保存90d后, 完成分析处理。获取每批次的标准曲线, 对样本稳定性进行分析, 并得到实测值。最终研究结果显示, 胆汁酸稳定性实测结果与理论要求RE值控制在15%范围内, 说明胆汁酸具有良好的稳定性。

结论

本次研究中, 采用超滤技术, 样本制备省力省时且提取率高, 检测技术通过应用LC-MS/MS平台精准定量, 并通过有效调整流动相配比和梯度洗脱, 实现17种胆汁酸检测工作, 可准确获取同分异构体分离情况, 超滤技术能改变传统蛋白沉淀方法下基质效应高且回收率差的问题, 有利于提升检测结果的准确度和重现性。

参考文献:

- [1] 陈兴龙, 周堂, 白同尘, 等. LC-MS/MS结合分子网络技术快速鉴定生三七和砂烫三七的三萜皂苷类成分[J]. 分析测试学报, 2024, 43(03): 421-431.
- [2] 沈仁, 刘红艳, 许敏, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定干血片中15种胆汁酸[J]. 中国社区医师, 2020, 36(30): 122-123.
- [3] 俞黎铭, 施新颜, 陈益明, 等. 高效液相色谱串联质谱法检测妊娠期肝内胆汁淤积症7种胆汁酸及其临床意义[J]. 中华全科医学, 2020, 18(07): 1153-1156+1199.
- [4] 屈昱晨, 俞蕴莉, 王猛猛, 等. HPLC-MS/MS法测定人血中15种胆汁酸浓度及不同抗凝剂对检测结果的对比分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(07): 1185-1193.