

应用SCIEX Triple Quad™ 5500 系统检测生物样品中38种胆汁酸

Determination of 38 Bile Acids in Biological Samples on SCIEX Triple Quad™ 5500 system

查海红, 陈慧敏, 龙志敏, 郭立海

Zha Haihong, Chen Huimin, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX China

Key Words: SCIEX Triple Quad™ 5500, Bile Acids, Biological Samples

前言

胆汁酸 (Bile Acids) 是胆汁中存在的一类胆烷酸的总称, 是一组用于胆固醇代谢、肠道营养物质吸收和胆汁脂质分泌的重要生理剂。胆汁酸按结构可分为游离型胆汁酸和结合型胆汁酸, 游离型胆汁酸包括胆酸 (CA)、去氧胆酸 (DCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA) 和少量的石胆酸 (LCA); 结合型胆汁酸包括甘氨酸胆酸 (GCA)、甘氨酸鹅去氧胆酸 (GDCD)、牛磺胆酸 (TCA) 和牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA) 等。胆汁酸主要存在于肠肝循环系统并通过再循环起一定的保护作用。胆汁酸合成与代谢失调通常表明肝功能异常, 因此血清中胆汁酸水平是衡量肝胆功能的重要指标。通过对生物样品中多种胆汁酸含量的检测, 可以为更多的疾病找到可靠的标志物。

目前胆汁酸的分析方法主要包括气相色谱、气相色谱串联质谱、高效液相色谱、液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。其中LC-MS/MS具有方法简便、灵敏、特异性好的特点, 适合大流量样本的分析, 因此, 本文采用SCIEX液相色谱串联质谱系统, 检测生物样品中38种胆汁酸, 分别为: lithocholate (LCA), ursodeoxycholate (UDCA), hyodeoxycholate (HDCA), chenodeoxycholate (CDCA), deoxycholate (DCA), α -muricholate (α MCA), β -muricholate (β MCA), cholate (CA), glycolithocholate (GLCA), glyoursodeoxycholate (GUDCA), glyochenodeoxycholate (GCDCA), glycodeoxycholate (GDCA), glyocholate (GCA), tauroolithocholate (TLCA), taoursodeoxycholate (TUDCA), taurohyodeoxycholi acid (THDCA), taurochenodeoxycholate (TCDCA), taurodeoxycholate (TDCA), tauro- β -muricholate (T β MCA), taurocholate (TCA), murideoxycholate (MDCA),

23-nordeoxycholate (23-NDCA), hyocholate (HCA), glycohyocholate (GHCA), glycohyodeoxycholate (GHDC), 7-ketolithocholate (7-KLCA), 12-Ketochenodeoxycholate (12-KCDCA), 7-ketodeoxycholate (7-KDCA), 3-oxocholate (3-OA), ursocholate (UCA), dioxolithocholate (DLCA), ω -muricholate (ω MCA), λ -muricholate (λ MCA), allocholate (ACA), tauro- ω -muricholate (T ω MCA), tauro- α -muricholate (T α MCA), tauro- λ -muricholate (T λ MCA), glyco- λ -muricholate (G λ MCA).

仪器设备

SCIEX ExionLC™液相系统 + Triple Quad™ 5500质谱系统



液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μ m)

流动相: A相: 水 (0.1% 甲酸)

B相: 乙腈 (0.1% 甲酸)

流速: 0.45 ml/min

柱温：40 °C

进样量：5 μL

表1. 液相洗脱梯度。

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
1.0	90	10
2.0	75	25
12.5	60	40
14.5	2	98
16.0	2	98
16.5	90	10
18.0	90	100

质谱方法

离子源：ESI源，负离子模式

离子源参数：

IS电压：-4500 V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 55 psi

雾化气 GS2: 55 psi

碰撞气 CAD: Medium

源温度 TEM: 550 °C

实验结果

本文将该方法用于老鼠血浆样品的检测，每种胆汁酸的保留时间通过标准品以及文献^[1-3]进行确定。在血浆样品中，这38种胆汁酸都能被检测到，详细的提取离子流图见图1，说明该方法能用于复杂生物样品的检测。

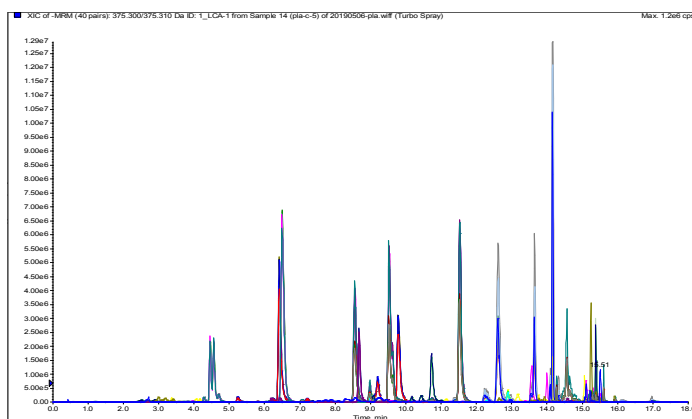


图1. 血浆样品中38种胆汁酸的提取离子流图。

表2. 38种胆汁酸的质谱参数。

Compound	Q1/Q3	DP	CE	CXP
LCA	375.3 / 375.3	-120	-23	-20
UDCA	391.4 / 391.4	-140	-30	-7
HDCA	391.3 / 391.3	-140	-30	-7
CDCA	391.3 / 391.3	-140	-27	-20
DCA	391.3 / 391.3	-140	-30	-17
α MCA	407.2 / 407.2	-150	-30	-20
β MCA	407.2 / 407.2	-150	-30	-20
CA	407.2 / 407.2	-150	-30	-20
GLCA	432.3 / 74.0	-135	-71	-19
GUDCA	448.3 / 74.1	-135	-71	-19
GCDCA	448.4 / 74.1	-140	-72	-20
GDCA	448.3 / 74.2	-140	-75	-20
GCA	464.3 / 74.1	-120	-75	-7
TLCA	482.3 / 80.0	-130	-120	-5
TUDCA	498.3 / 80.1	-120	-120	-10
THDCA	498.3 / 80.1	-120	-120	-10
TCDCA	498.3 / 80.0	-110	-120	-10
TDCA	498.2 / 80.0	-120	-120	-21
T β MCA	514.2 / 80.1	-120	-125	-20
TCA	514.2 / 80.1	-120	-125	-20
MDCA	391.3 / 391.4	-140	-30	-7
NDCA	377.3 / 377.3	-140	-20	-7
HCA	407.2 / 407.2	-150	-20	-20
GHCA	464.3 / 74.1	-120	-75	-7
GHDCA	448.3 / 74.2	-135	-71	-19
7-KLCA	389.3 / 389.3	-140	-20	-7
12-KCDCA	405.3 / 405.3	-140	-20	-7
7-KDCA	405.3 / 405.3	-140	-20	-7
3-OA	405.3 / 405.3	-140	-20	-7
UCA	407.3 / 407.3	-140	-20	-7
DLCA	403.3 / 403.3	-145	-20	-7
ω MCA	407.3 / 407.3	-140	-20	-7
λ MCA	407.3 / 407.3	-140	-20	-7
ACA	407.3 / 407.3	-140	-20	-7
T ω MCA	514.2 / 80.1	-120	-125	-20
T α MCA	514.2 / 80.1	-120	-125	-20
T λ MCA	514.2 / 80.1	-120	-125	-20
G λ MCA	464.3 / 74.1	-120	-75	-7

本文共检测了24个老鼠血浆样品用于差异性分析，其中12个为正常老鼠的血浆样品，12个为患有糖尿病的老鼠的血浆样品。我们对这批老鼠血浆样品中的38种胆汁酸成分进行了定性及半定量的分析。

首先，我们对这两组样品进行了PCA分析，从图2中我们可以看出这两组样品很明显的被区分开来，说明胆汁酸在糖尿病模型中有显著变化。

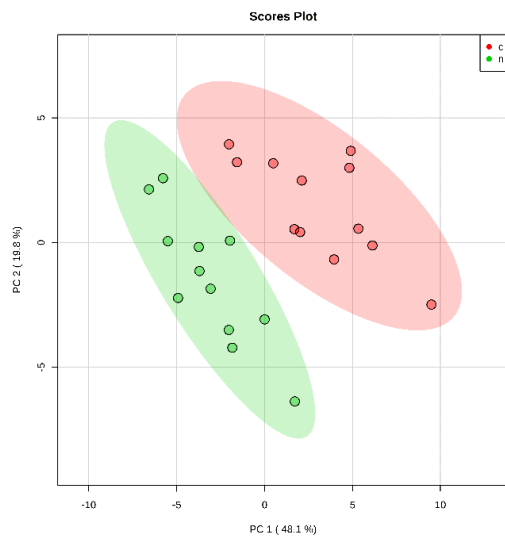


图2. 两组老鼠血浆样品的PCA图。

接着，我们将这组数据进行了热图分析，从图3中我们可以更直观地看出每种胆汁酸含量在不同组别中的变化。

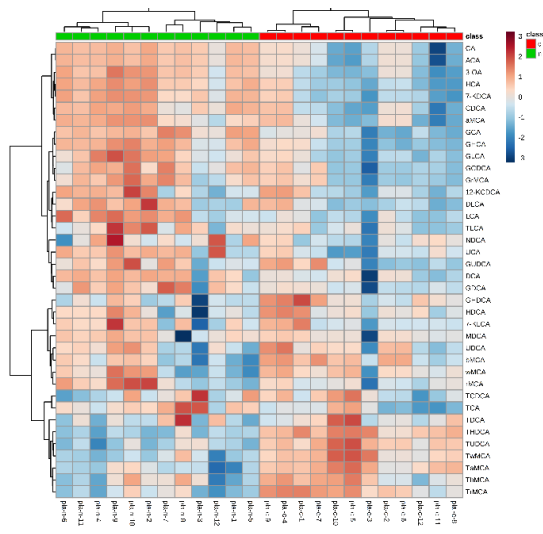


图3. 两组老鼠血浆样品的热图。

最后，为了找出变化差异明显的胆汁酸成分，我们对这38种胆汁酸进行了统计分析，得到每种胆汁酸在两组样品中的p-value和fold change (FC) 值 (图4)，通过p-value < 0.05和FC>2的筛选，共有23种胆汁酸有显著变化，其中6种结合型胆汁酸在糖尿病模型的血浆中含量下降，17种胆汁酸的含量升高，详见表3。说明，糖尿病对体内胆汁酸的含量有明显影响，且大部分有升高的趋势。

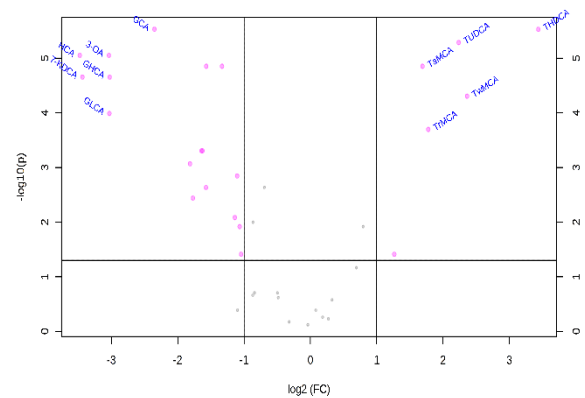


图4. 两组老鼠血浆样品中38种胆汁酸含量的火山图。

表3. 两组老鼠血浆样品中变化差异明显的23种胆汁酸。

	FC	p-value	糖尿病中的含量
THDCA	10.82	2.96E-06	down
TUDCA	4.71	5.18E-06	down
T α MCA	3.23	1.41E-05	down
T ω MCA	5.14	4.96E-05	down
T λ MCA	3.43	2.01E-04	down
GHDCAs	2.40	3.87E-02	down
GCA	5.10	2.96E-06	up
HCA	11.13	8.88E-06	up
3-OA	8.21	8.88E-06	up
ACA	2.97	1.41E-05	up
CA	2.52	1.41E-05	up
7-KDCAs	10.82	2.22E-05	up
GHCA	8.14	2.22E-05	up
GLCA	8.17	1.03E-04	up
GDCAs	3.12	4.96E-04	up
CDCA	3.09	4.96E-04	up
G λ MCA	3.52	8.58E-04	up
LCA	2.15	1.43E-03	up
α MCA	2.98	2.32E-03	up
GDCA	3.41	3.64E-03	up
DLCA	2.20	8.29E-03	up
TCA	2.09	1.21E-02	up
TLCA	2.06	3.87E-02	up

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 5500系统建立了LC-MS/MS方法测定38种胆汁酸的定性定量方法。该方法在复杂的生物样品中进行了验证，不仅能高效准确地检测出样品中的胆汁酸成分，而且能够提供有效地差异性分析，为大通量分析不同疾病中胆汁酸的差异提供了可靠的方法。

参考文献

- [1] Han J, Liu Y, Wang R, et al. Metabolic Profiling of Bile Acids in Human and Mouse Blood by LC-MS/MS in Combination with Phospholipid-Depletion Solid-Phase Extraction[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(2):1127-1136.
- [2] Wang X, Xie G, Zhao A, et al. Serum Bile Acids Are Associated with Pathological Progression of Hepatitis B-induced Cirrhosis[J]. Journal of Proteome Research, 2015:150512060716008.
- [3] Xie G, Wang Y, Wang X, et al. Profiling of Serum Bile Acids in a Healthy Chinese Population Using UPLC-MS/MS[J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(2):850-859.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.

RUO-MKT-02-10519-ZH-A

AB SCIEX™ is being used under license.

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

上海公司及中国区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897 网址：www.sciex.com.cn 微博：@SCIEX