

血清中胆汁酸的气-质联 用定量多离子检测法

胡佩丰 卢涌泉
(军事医学科学院仪器中心)

(摘要)本文介绍血清中胆汁酸的气相色谱-质谱联用测定法。血清胆汁酸经SEP-PAK C₁₈小柱固相提取、净化,用PHP LH-20柱进行分组,结合型的胆汁酸在高温高压下水解为游离型。以两个氘标记胆汁酸为内标,多离子检测法定量测定。本法适用于系统的胆汁酸分析,简便易行。

到目前为止,血清中胆汁酸分析的权威性方法仍是气相色谱-质谱联用法^[1]。HPLC, GC等的应用则局限于实验室研究^[1,2]。气-质联用法通常都以同位素标记物作内标为基础,

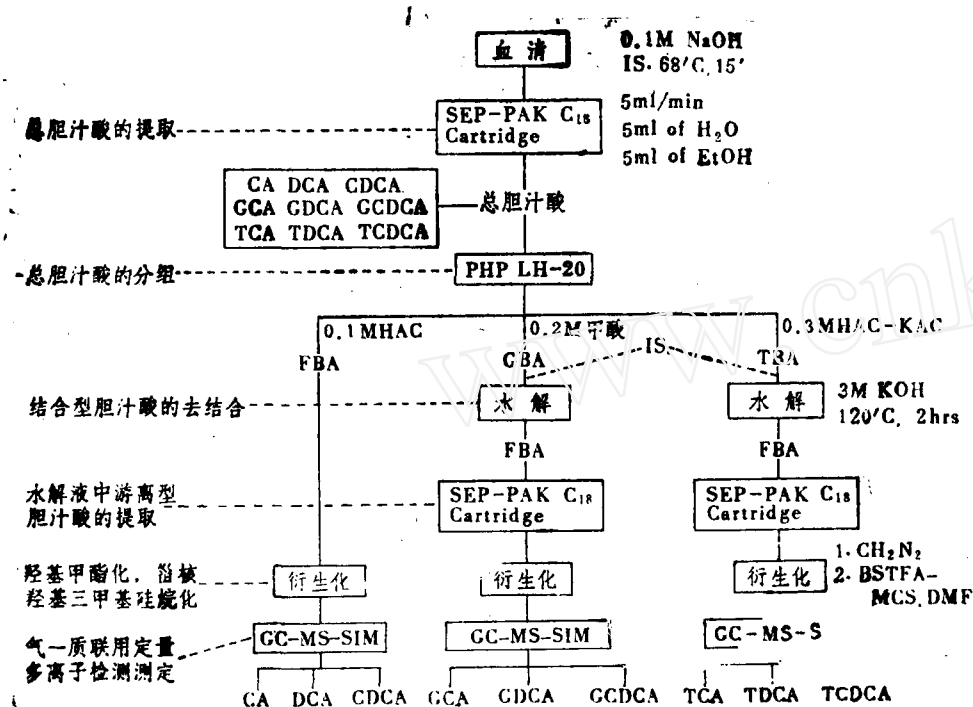


图1 实验流程图
IS: 内标 (2,2,3,4,4) 五氘代胆酸及
(2,2,3,4,4) 五氘代脱氧胆酸

1986年5月12收

方法的细致程度则取决于预处理步骤。已报道的方法中,大多数只测定部分胆汁酸^[3,4]或测总量,本法适用于系统的胆汁酸分析,较简便易行。血清胆汁酸经SEP-PAK C₁₈ Cartridge固相提取、纯化,用PHP LH-20柱进行分组,结合型的胆汁酸在高温高压下水解为游离型。游离型胆汁酸经核基三甲基硅烷化,羧基甲酯化。衍生物作气-质联用分析。实验流程见图1。

试剂及仪器

脱氧胆酸(DCA)、甘氨酸(GCA)、甘氨酸脱氧胆酸(GDCA)、牛磺胆酸(TCA)、牛磺脱氧胆酸(TDCA)和牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)为SIGMA公司的产品;胆酸(CA)为L. Light 有限公司的产品;甘氨酸鹅脱氧胆酸(GCDCA)为CALBIOCHEM BEMRING CORP的产品;鹅脱氧胆酸(CDCA)由片剂提取,经庚烷:醋酸乙酯重结晶纯化;

吡啶基、羟丙基葡聚糖(PHP LH-20)由本实验室邓振华先生提供;

SEP-PAK C₁₈ Cartridge, Waters Associates;

N, O-一二三甲基硅三氟乙酰胺(BSTFA), GC用, Macherey-Nagel公司;

三甲基氯硅烷(TMS), Merck公司。

氘标记胆汁酸内标, (2,2,3,4,4)五氘代胆酸和(2,2,3,4,4)五氘代脱氧胆酸在实验室合成,另有文章讨论^[5], (2,2,3,4,4)五氘代胆酸含5.7%三氘标记的分子, 39.6%四氘标记的分子, 54.7%五氘标记的分子, 不含双、单和未标记的分子。(2,2,3,4,4)五氘代脱氧胆酸含8.1%四氘标记的分子, 91.8%五氘标记的分子, 不含三、二、单氘标记及未标记分子。计算依Bieman法, 选用谱中脱水峰(1分子水)。

定量多离子检测在MAT44S—Varian3700联机系统上进行。

实 验

血清中总胆汁酸的提取

于1毫升血清中加2 μ g (2,2,3,4,4)五氘代胆酸及2 μ g (2,2,3,4,4)五氘代脱氧胆酸(同溶在2 μ l的90%乙醇中), 再以0.1N NaOH溶液稀释至5 ml并在68℃的水浴中保温5分钟, 快速(5ml/min)通过SEP-PAK C₁₈ Cartridge, Cartridge经5ml水洗后, 用5ml无水乙醇洗脱总胆汁酸。

总胆汁酸的阴离子交换法分组

总胆汁酸的水乙醇洗脱液直接上PHP LH-20小柱(长1.5cm, 直径0.7cm, 醋酸型, 200mg), 洗脱液通过后, 以4ml 90%乙醇液洗柱, 按分步洗脱法洗脱各组胆汁酸。5ml 0.1M醋酸溶液洗脱游离型胆汁酸(FBA), 5ml 0.2M 甲酸溶液洗脱甘氨酸结合型胆汁酸(GBA), 5ml 0.3M KAC-HAC缓冲溶液洗脱牛磺酸结合型胆汁酸(TBA)(洗脱液以90%乙醇为溶剂), 洗脱液收集在5ml离心管中, 于二结合型胆汁酸中加测定内标(2 μ g (2,2,3,4,4)五氘代胆酸和2 μ g (2,2,3,4,4)五氘代脱氧胆酸), 再分别在氮气流下蒸干。

甘氨酸结合型胆汁酸及牛磺酸结合型胆汁酸的水解

于甘氨酸及牛磺酸结合型胆汁酸的残渣上各加2ml 3M KOH溶液,装水解液的离心管敞口置于高压锅中加热3小时。离心管不和水面接触,仅利用锅内产生的过热蒸汽加热。锅内的水保持微沸,有少量蒸汽漏出。完成加热后,自然冷却至室温,水解液以3M HCl酸化并立刻用水稀释至5ml。稀释液通过SEP-PAK C₁₈ Cartridge,离心管用2.5ml水洗2次,洗涤液再通过Cartridge。Cartridge上吸附的由结合型胆汁酸转化而来的游离型胆汁酸以5ml甲醇洗脱,洗脱液在氮气流下蒸干。

衍生化

游离型胆汁酸通过和重氮甲烷的乙醚溶液作用甲酯化,蒸去过量的重氮甲烷后,于残渣上加15 μ l DMF或吡啶,再加15 μ l BSTFA:TMCS (95:5),室温下静置5分钟,取3 μ l GC进样。

GC-MS定量测定

定量测定在MAT44S-Varian3700联机系统上进行,GC配SE-30玻璃毛细管柱(25M)。进样口温度维持在275 $^{\circ}$ C,初始柱温设定在150 $^{\circ}$ C,保持2分钟,最高柱温设定为275 $^{\circ}$ C,升温梯度为10 $^{\circ}$ C/min,载气(He)的体积流速为5ml/min,离子源温度设定为250 $^{\circ}$ C,电子能量为20eV,发射电流为100mA。

定量检测过程中使用3个检测通道以检测由3个胆汁酸及二个氘标记内标产生的共5个特征离子。第一个通道依次检测m/e260(相应于五氘代脱氧胆酸衍生物的M-2XTMSOH-115(边链))和m/e258(相应于五氘代胆酸衍生物的M-3XTMSOH-115),第二通道依次检测 and 第一通道相对应的非标记脱氧胆酸,胆酸衍生物产生的两个离子m/e255和m/e253,第三通道检测m/e370(相应于鹅脱氧胆酸衍生物的M-2XTMSOH)。

实验结果

胆酸及其甘氨酸、牛磺酸结合物的测定

三甲基硅烷化的胆酸甲酯和(2,2,3,4,4)五氘代胆酸甲酯的EI谱中,高质量区以M-3XTMSOH-115裂解方式产生的峰为最强峰。从灵敏度考虑,选用以该裂解途径产生的m/e253(胆酸)和m/e258(标记胆酸)为定量测定峰。m/e253和m/e258的离子峰面积比与加入血清的胆酸及其甘氨酸、牛磺酸结合物的量成正比(图2)。用浓度为0.4 μ g/ml的血清样品重复测定,计算得到的变异系数小于

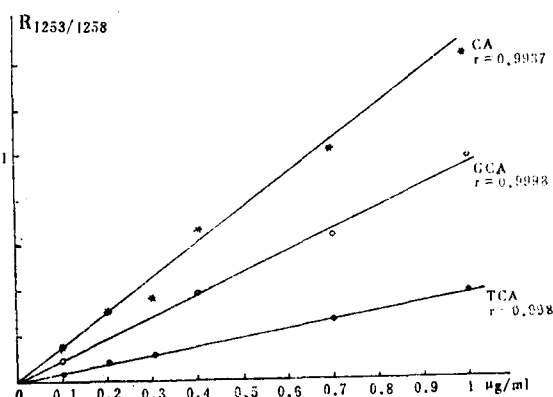


图2 胆酸、甘氨胆酸、牛磺胆酸测定的工作曲线

5%。两份胆石病人血清的胆酸浓度为0.115, 0.205($\mu\text{g/ml}$); 甘氨酸胆酸为0.155, 0.489, 牛磺胆酸为一, 0.217。

脱氧胆酸及其甘氨酸、牛磺酸结合物的测定

脱氧胆酸, (2,2,3,4,4)五氘代脱氧胆酸衍生物的EI谱中, 以M-2XTMSOH-115产生的离子m/e255(脱氧胆酸)和m/e260

(氘代脱氧胆酸)为最强峰。它们作为特征离子被检测。二者的离子峰强度积分比值在0.1—1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度范围内与加入血清的脱氧胆酸及其结合物的量成正比(图3), 以浓度为0.4 $\mu\text{g/ml}$ 的血清样品进行重复测定, 统计得出的变异系数小于4%。两份胆石病人血清的脱氧胆酸浓度为0.134, 0.112, 甘氨酸脱氧胆酸为0.156, 0.217, 牛磺脱氧胆酸为0.041, 0.027。

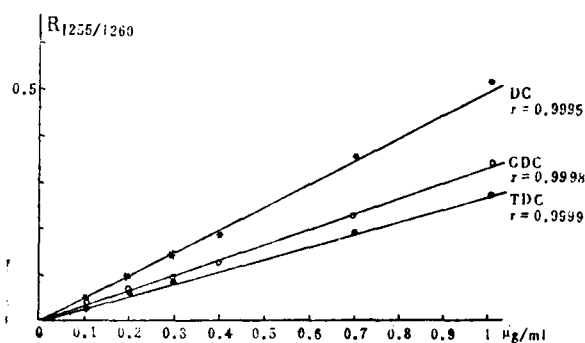


图3 脱氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺脱氧胆酸测定的工作曲线

鹅脱氧胆酸及其甘氨酸、牛磺酸结合物的测定

三甲基硅烷化的鹅脱氧胆酸甲酯的EI谱中, m/e370为高质量区的最强峰。因为没有相应的氘标记鹅脱氧胆酸作测定内标, 又考虑到脱氧胆酸和鹅脱氧胆酸为羟基的位置异构体, 二者的溶剂提取性质, 衍生化程度等近似性大, 所以选用五氘代脱氧胆酸兼作鹅脱氧胆酸的测定内标。m/e260作为基准离子。m/e370和m/e260二离子的强度积分比值对加入血清的标准鹅脱氧胆酸及其结合物的量作图得工作曲线(图4)。测定的变异系数小于15.2%。两份血清的鹅脱氧胆酸浓度测得为0.102、0.187; 甘氨酸鹅脱氧胆酸为0.406, 0.874; 牛磺鹅脱氧胆酸为一, 0.125。

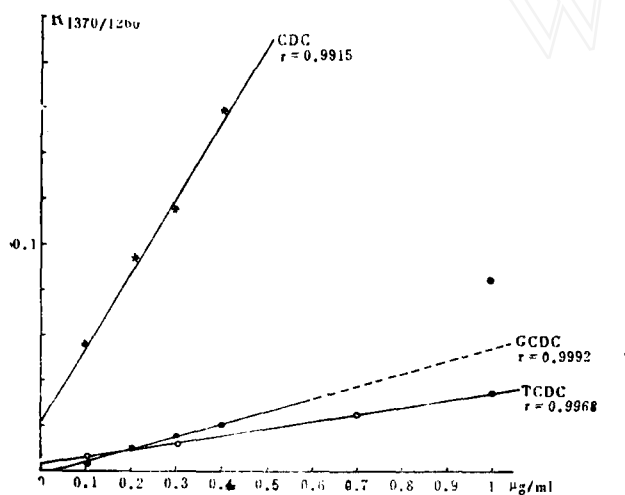


图4 鹅脱氧胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸的工作曲线

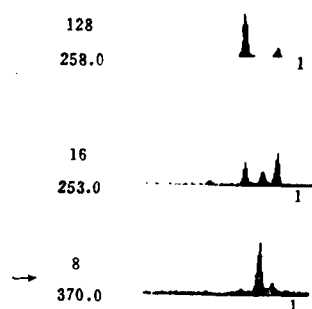


图5 典型的血清胆汁酸(游离酸部分)及其测定内标[2,2,3,4,4]五氘代胆酸和[2,2,3,4,4]五氘代脱氧胆酸衍生物的SIM记录曲线

图5为典型的血清胆汁酸及其测定内标的多离子检测记录曲线。从上往下依次为第1, 2, 3通道, 保留时间自左侧开始。

讨 论

电子能量的选择

常用电子能量下, 样品的电离效率很低, 约1%。理论上, 增加电子能量和发射电流能增加电离效率, 但实际上恰恰相反, 低电子能量下, 信噪比显著增加(图6)。图中左、右均由同一样品记录得到。电子能量左为20eV, 右为70eV, 对比十分鲜明, 20eV的电子能量产生更大的信噪比。

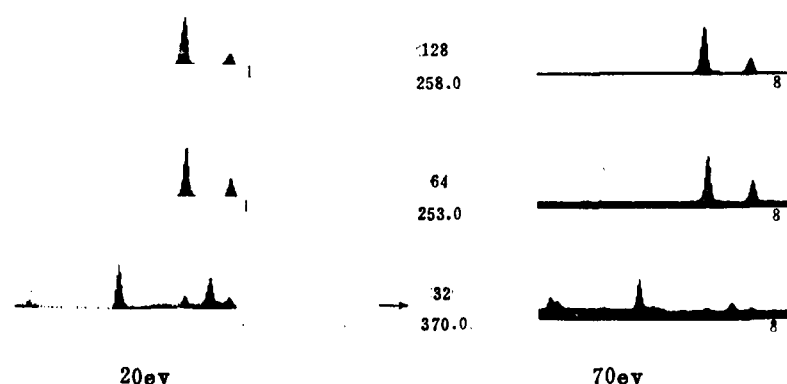


图6 胆汁酸混合物(各1 μ g)衍生物的SIM记录曲线

氘标记物作内标

质谱作为定量工具的一个最大特点是可以应用同位素标记物作内标, 纵观标记物和待测物有最大的相似性, 对样品在预处理步骤中的损失, 仪器条件的变化对测定结果的影响提供最大限度的补偿^[6]。我们合成了两个氘标记胆汁酸, (2,2,3,4,4)五氘代胆酸和(2,2,3,4,4)五氘代脱氧胆酸, 标记丰度较文献报道的为高^[7]。利用该二标记胆汁酸为内标, 相应的胆汁酸测定的精度得到改善。鹅脱氧胆酸及其结合物测定的变异系数(小于15%)比胆酸、脱氧胆酸及它们的结合物测定的变异系数(小于5%)大得多。可能的解释之一是使用的内标类型不一样。胆酸、脱氧胆酸及它们的结合物使用的是同位素标记物内标, 鹅脱氧胆酸及其结合物使用的内标属于C类^[7]。

实验GC条件下, 标记胆汁酸和相应的非标记胆汁酸在SE-30柱上能部分地分开, 它们在柱上的吸附中心可能不一样, 因此不能起载体作用。这种现象和Yanagisawa报道的结果不符^[3]。

胆汁酸甾核羟基的三甲基硅烷化

常用的胆汁酸甾核羟基的三甲基硅烷化法是由Makita于1963年报道的。胆汁酸甲酯溶于干燥吡啶(1ml/10mg), 再加0.1ml HMDS和0.03ml TMCS, 室温下静置10分钟进样。后来又改用混合试剂^[9], 方法很简便。但反应过程中有白色沉淀形成, 和空气接触产生白烟。

尤其是注射器中形成的沉淀常常堵塞注射器。GC分析之前除去吡啶和过量试剂的方法也见有报道,但往往相当麻烦。我们在工作中发展了一个替代方法,胆汁酸甲酯溶于DMF,加BS-TFA:TMCS(95:5)在室温下静置5分钟,GC进样。其特征为快速,方便,没有传统方法形成沉淀的缺点。

为了要确定反应完成所需的时间,选用了含有所测胆汁酸中的各类羟基的胆酸甲酯为模型化合物,利用气相色谱和FD-MS对不同反应时间的反应产物进行了研究,所得的GC图集于图7。

图7中,左侧峰的保留时间值为11.4分,相应于全三甲基硅烷化的胆酸甲酯(FD-MS, m/e 639),右侧峰的保留时间为14.2分,相应于3-三甲基硅胆酸甲酯(FD-MS, m/e 495,由胆酸甲酯和BSTFA:TMCS作用的产物作出(11))。从图中可以清楚地看出,5分钟反应完全,反应产物的GC图与传统方法所得完全一样。反应时间少于5分钟,GC图中出现另一个峰,属于3-三甲基硅胆酸甲酯。

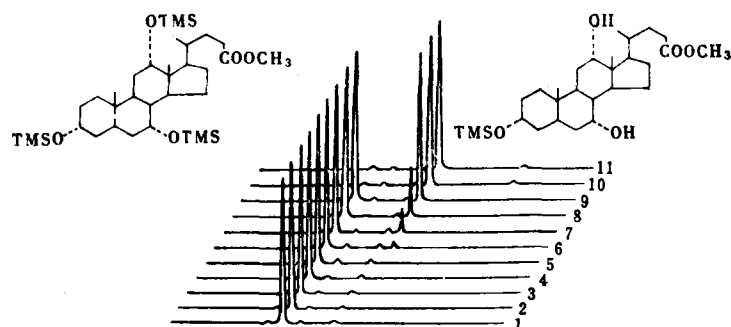


图7 胆酸甲酯和BSTFA-TMCS(95:5)以DMF为溶剂在不同反应时间的产物的GC图集。2—9分别对应于时间30, 20, 15, 10, 5, 2, 1, 0.5分, 1为传统衍生化法的产物, 10, 11分别为胆酸甲酯和BSTFA:TMCS(95:5)作用, 有或无乙醇为溶剂的反应产物

BSTFA:TMCS混合试剂和胆酸甲酯作用仅产生3-三甲基硅胆酸甲酯,胆酸甲酯分子中稍有位阻的7,12位羟基不能被衍生化。在DMF存在时,原仅能衍生化32-羟基的试剂能衍生化稍有空间位阻的7,12 α 羟基,DMF在反应中似乎不仅起溶剂作用,还起催化剂作用。

本文在完成过程中得到了汤炳生同志在仪器使用方面的帮助和陈家骏同志在合成氘标记胆汁酸工作中的帮助,在此并致谢意。

参 考 文 献

1. Jacqueline M. Street et al., J. Lipid Res., 24, 491 (1983)
2. S. Hasegawa et al., J. Liquid Chromatogr., 7, 2267(1984)
3. Jiro Yanagisawa et al., Anal. Biochem., 104, 75(1980)
4. Ingemar Björkham et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 43, 163(1983)
5. 陈家骏、胡佩丰, 稳定同位素, No.2 (1987)
6. W. A. Garland and M. L. Powell. J. of Chromatographic Science, 19, 409(1981)
7. D. L. Hachey et al., J. of Labelled Compounds, 9, 703 (1976)

8. M. Makita et al., *Anal. Biochem.*, 5, 523(1963)
9. K. D. R. Setchell et al., *Clin. Chim. Acta*, 127, 1(1963)

Determination of Bile Acids in Serum by GC/MS/SIM

Hu Peifeng and Lu Yongquan

(Instrument Centre, Academy of Military Medical Science, Beijing)

Received 12, May 1986

Abstract

In this paper a comprehensive method for the determination of bile acids in serum was described. Total serum bile acids were extracted and purified by SEP-PAK C18 Cartridge and were grouped with anion exchange resin PHP LH-20, conjugated bile acids were converted to free form by alkaline hydrolysis under high pressure and temperature. A superior method for trimethylsilylation of bile acids is also described. The assay was based upon two deuterium labeled bile acid as internal standard and selected ion monitoring.

www.cnki.net