采用超高效合相色谱 (UPC^2) 串联 ESI-MS/MS 分析胆汁酸

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Kaori Taguchi[1]、Eiichiro Flukusaki[2] 和 Takeshi Bamba[2]
[1] 沃特世公司 (美国马萨诸塞州米尔福德市)、[2] 日本吹田市，大阪大学，生物技术系

目的

利用 UltraPerformance Convergence Chromatography ™ (UPC$^{2®}$) 超高效合相色谱建立一种可快速进行胆汁酸分析和定量的新方法。

背景

胆汁酸作为一种信号分子，在调节甘油三酯、胆固醇和葡萄糖代谢中扮演着重要的角色 [1]。这些信号通路已经成为开发治疗代谢性疾病药物的靶点。此外，胆汁酸还可用作血清中揭示肝脏疾病和胆汁酸调控代谢机制的生物标志物 [2-5]。因此，建立一种可测定体内胆汁酸的分析方法具有重要意义。

由于结构类似物 (如同分异构体) 的存在，以及非结合型和结合型胆汁酸之间的极性差异使得胆汁酸的分离尤为复杂。过去，研究人员采用气相色谱 (GC) 和液相色谱 (LC) 分析这些化合物，但这些方法都存在一定的局限性。GC 法通常需要进行步骤繁琐的衍生化处理，且衍生化的每个步骤中都会损失一定量的胆汁酸。此外，采用 GC 分析法测定结合型胆汁酸的成分或浓度时，需对若干等分的样品分别进行提取。

采用超高效合相色谱串联ESI-MS/MS系统，可在13 min内同时分析25种胆汁酸。

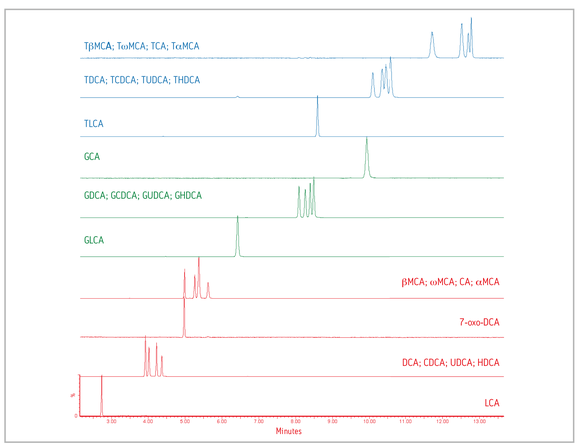

图1. 13 min内同时分析25种胆汁酸标准品混合物，包括甘氨酸和牛磺酸结合物。各MRM色谱图中的化合物名称按保留时间顺序标示。

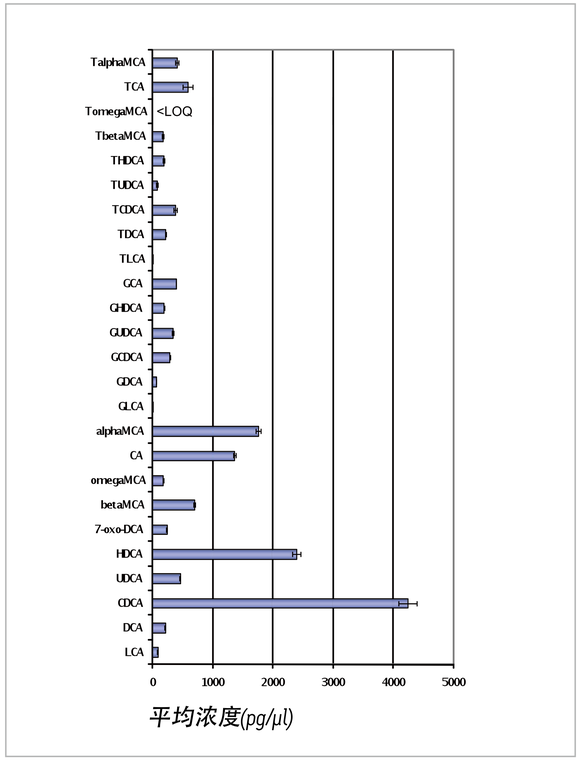

图2. 采用UPC^2/MS系统对大鼠血清中的胆汁酸进行定量测定(n=6)。

虽然 LC 分析法可同时检测结合型和非结合型胆汁酸，但单针分析时间长达 30 min。在本应用纪要中，我们将介绍一种可快速进行胆汁酸分析和定量的 UPC^2/MS 方法。

解决方案

本实验利用沃特世（Waters®）ACQUITY UPC$^{2™}$ 系统，以超临界二氧化碳 ($SCCO_2$) 为主要流动相建立了一种可同时分离 25 种不同胆汁酸 (包括其结合物在内) 的方法。以 $SCCO_2$ 为流动相可加速分析物的扩散并降低反压，从而缩短分析时间。为了提高分析的灵敏度和特异性，我们将 ACQUITY UPC^2 系统与 Xevo® TQ-S 质谱仪联用。25 种不同的胆汁酸 (包括甘氨酸和牛磺酸结合物) 的分离结果见图 1。

所有的胆汁酸在 13 min 内实现分离，与此前的分析方法相比，分析时间缩短了约 2 倍。采用不同的固定相、柱温设置、添加剂以及不同 pH 值的改性剂的组合对方法进行优化。Xevo® TQ-S 的检测模式设置为 ESI 负离子模式，无需使用尾吹气即可获得最大灵敏度。

使用这一方法对实际生物样品 (大鼠血清) 中的胆汁酸及其结合物进行定量分析。使用甲醇按甲醇：血清 3:1(w/v) 的比例对购得的大鼠血清进行去蛋白处理，再进行涡旋和离心。取上清液注入 UPC^2/MS/MS，测定血清样品中各胆汁酸及其结合物的浓度。结果如图 2 所示，表明本方法可测定生物基质中各胆汁酸及其结合物的水平，且重现性良好。

总结

采用超高效合相色谱 (UPC^2) 串联 ESI-MS/MS 系统，可同时分析生物基质中的 25 种胆汁酸与其结合物。采用亚 2 µm 填料的色谱柱，在 13 min 内实现所有分析物的分离，分离度满足要求。本应用纪要证明：这一新的分离方法非常适合评价胆汁酸对甘油三酸酯、胆固醇和葡萄糖代谢的影响，并可促进治疗代谢性疾病的新型药物靶点的开发。

参考文献

1. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. The EMBO Journal . 2006 April; 25(7): 1419-25.
2. Barnes S, Gallo GA, Trash DB, Morris JS. Diagnostic value of serum bile acid estimations in liver disease. Journal of Clinical Pathology. 1975; 506-509.
3. Qiao X, Ye M, Xiang C, Bo T, Yang W, Liu C, Miao W, Guo D. Metabolic regulatory effects of licorice: a bile acid metabonomic study by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Steroids . 2012 June; 77(7): 745-55.
4. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, Badman MK, Maratos-Flier E, Mun EC, Pihlajamaki J, Auwerx J, Goldfine AB. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. Obesity (Silver Spring, MD). 2009 September; 17(9): 1671-7.
5. Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences . 2007 December; 860(1): 10-7.

如需下载此海报，请访问*WWW.WATERS.COM/POSTERS*

©2013 Waters Corporation