

LC-MS/MS 同时测定 22 种胆汁酸在孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘中的应用

赵凡^{1,2,3}, 张伦^{2,3}, 叶露^{1,2,3}, 张佳怡^{1,2,3}, 余芸^{2,3}, 黄倩倩^{2,3}, 王建青^{1,2,3}

摘要 目的 利用高效液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)系统准确测定孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘中 22 种胆汁酸成分,建立高效检测及分析孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘胆汁酸谱 LC-MS/MS 的方法。方法 孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘样品经过处理后,以含有 0.1% 冰乙酸的 4 mmol/L 乙酸铵水溶液作流动 A 相和以纯甲醇作流动 B 相,流速为 0.4 mL/min,采用梯度洗脱程序通过 Phenomenex Gemini 3 μ m NX-C18 110A(100 mm \times 2.0 mm)色谱柱进行洗脱,质谱检测系统采用电喷雾离子源,负离子多反应监测。结果 22 种胆汁酸在定量范围内的线性关系良好,低、中、高浓度日间和日内精密度的 RSD 在 0.5% ~ 7.4%,基质效应在 88% ~ 110%,提取回收率在 84% ~ 108%。结论 该实验建立 LC-MS/MS 检测孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘中 22 种胆汁酸成分的方法灵敏度高、选择性强,同时也能稳定检测多数量样本。

关键词 胆汁酸;高效液相色谱-质谱联用系统;孕鼠;方法学

中图分类号 R-331

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)08-1287-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.007

胆汁酸由胆固醇在肝细胞中代谢而来,是胆汁的主要脂质成分,胆汁酸在生物体内能够乳化脂肪、促进脂肪和胆固醇的吸收^[1-2]。肝脏中主要合成的初级胆汁酸包括人的胆酸(cholic acid, CA)和鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)以及啮齿动物的 α -鼠胆酸(α -muricholic acid, α -MCA)和 β -鼠胆酸(β -muricholic acid, β -MCA),其中 CA 与 CDCA 进入肠道后,在肠道菌群的作用下形成去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)和石胆酸(lithocholic acid,

LCA)等次级胆汁酸^[3-4]。以上游离的胆汁酸可以与甘氨酸和牛磺酸结合形成相应的结合型胆汁酸。其中大部分胆汁酸通过肝肠循环途径在回肠末端重吸收返回肝脏,剩余少量胆汁酸进入全身循环和随粪便排除^[4]。

胆汁酸在细胞中过度积累会对细胞产生毒性,肝细胞中胆汁酸的累积最终将导致肝细胞损伤^[5]。不同胆汁酸的生理功能差异较大,有研究^[6]报道,LCA 的毒性相对较大。测定孕鼠妊娠期体内胆汁酸含量变化,了解妊娠期孕鼠体内胆汁酸的分布情况,运用于妊娠期间孕妇体内胆汁酸紊乱相关疾病的预防具有重要意义。该实验建立 LC-MS/MS 检测孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘样本中的胆汁酸谱的方法,以为后续生物样本测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 癌症研究所(institute of cancer research, ICR)小鼠(8 周龄 SPF 级,雄性 36 ~ 38 g, 20 只;雌性 27 ~ 29 g, 40 只)购自浙江维通利华实验动物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001。在适宜环境(温度 20 ~ 25 $^{\circ}$ C,湿度 50% \pm 5%)饲养 7 d。本研究所使用的动物实验均已通过安徽医科大学动物伦理委员会审查并批准(编号:20200523)。

1.1.2 仪器 AB Sciex Triple Quad 4500 型三重四级杆串联质谱仪(购自美国 AB 公司);1200 系列高效液相色谱仪(购自美国 Agilent 公司);Analyst 1.4.2 数据处理系统、1524R 高速冷冻离心机和 6K 低速离心机(购自珠海黑马医学仪器公司);电子天平(型号:XS105DU,购自上海 MettlerToledo 公司);超纯水仪(型号:Synergy,购自美国 Milli-pore 公司);涡旋振荡器(购自美国 VortexCenie 公司);Bioprep-24R 生物样品均质机(购自杭州奥盛仪器有限公司)。

1.1.3 药品与试剂 CA(纯度 \geq 98%,批号:SL-CC7722)、LCA(纯度 \geq 95%,批号:BCBW1723)、

2023-06-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82073566);安徽省高校优秀拔尖人才培养资助项目(编号:gxyq2019014)

作者单位:¹ 安徽医科大学药学院,合肥 230032

² 安徽医科大学第一附属医院药学部,合肥 230012

³ 安徽省公共卫生临床中心,合肥 230012

作者简介:赵凡,男,硕士研究生;

王建青,女,教授,主任药师,博士生导师,责任作者, E-mail: jianqingwang81@126.com

CDCA(纯度 ≥ 97% ,批号:MKBS2816V)、牛磺脱氧胆酸(taurodeoxycholate acid, TDCA, 纯度 ≥ 95% ,批号:SLBX3488)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA, 纯度 ≥ 95% ,批号:SLCM1787)、甘氨酸鹅去氧胆酸(glycine chenodeoxycholic acid, GCDCA, 纯度 ≥ 97% ,批号:SLCD4748)、甘氨酸熊去氧胆酸(glycine ursodeoxycholic acid, GUDCA, 纯度 ≥ 96% ,批号:BCBS9852V)、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA, 纯度 ≥ 99% ,批号:SLBT3485)、甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA, 纯度 ≥ 97% ,批号:SLBR1284V)、牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:13190318)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodesoxycholic acid, TCDCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:SLCJ5790)和甘氨酸去氧胆酸(glycine deoxycholic acid, GDCA, 纯度 ≥ 97% ,批号:BCCG0654),以上药品购自美国西格玛奥德里奇贸易有限公司。牛磺猪去氧胆酸(aurine hyodeoxycholic acid, THDCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:B16A10K94146)、猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HDCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:J24GB152684)、牛磺石胆酸(aurine cholic acid, TLCA, 纯度 ≥ 97% ,批号:D11GS171051)、甘氨酸猪去氧胆酸(glycine hyodeoxycholic acid, GHDCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:Y23N9K75826)、甘氨酸石胆酸(glycine cholic acid, GLCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:B29J11K119775)、DCA(纯度 ≥ 98.5% ,批号:BCCG6672)、α-MCA(纯度 ≥ 95% ,批号:J14HS178006)和去氢胆酸(dehydrocholic acid, DHCA, 纯度 ≥ 98.5% ,批号:S30J9I64022),以上药品购自上海源叶生物科技有限公司。牛磺-β-鼠胆酸(aurine-β-muricholic acid, T-β-MCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:700244P-1MG-D-010)、β-鼠胆酸(β-MCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:700233P-1MG-C-010)和牛磺-α-鼠胆酸(aurine-α-muricholic acid, T-α-MCA, 纯度 ≥ 98% ,批号:700243P-1MG-B-010),以上药品购自美国 Avanti® Polar Lipids 公司。200 目粉末状活性炭、高效液相色谱级水、乙醇、冰乙酸、甲醇和乙酸铵,均购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物处理 小鼠在适宜环境中饲养 7 d,第 8 天 21 时将该批小鼠按照 2 只雄性和 4 只雌性小鼠的比例进行合笼,次日 7 时检查阴道栓,共 20 只雌鼠检查出阴道栓。将有阴道栓的雌性小鼠定为妊娠第 0 天[(gestational day, GD)0],从中随机抽取 7

只孕鼠,饲养至 GD16 进行剖杀,收集母血、母肝、羊水和胎盘。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Gemini 3 μm NX-C18 110A (100 mm × 2.0 mm);流动相:A 相为含有 0.1% 冰乙酸的 4 mmol/L 乙酸铵溶液,B 相为甲醇;柱温为 40 °C;流速为 0.4 ml/min;进样量为 10 μl。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 样品分析的洗脱条件

时间(min)	流速(ml/min)	A 相(%)	B 相(%)
0	0.4	45	55
0.5	0.4	45	55
4	0.4	38	62
11	0.4	25	75
12	0.4	5	95
14	0.4	5	95
15	0.4	25	75
16	0.4	45	55

1.2.3 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(multiple reaction monitoring, 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 °C。22 种胆汁酸及内标质谱优化参数见表 2。

表 2 22 种胆汁酸及内标质谱优化参数

胆汁酸	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (V)	入口电压 (V)	碰撞能 (V)	出口电压 (V)
CA	6.46	407.2	343.2	-150	-10	-30	-20
DCA	9.14	391.2	345.1	-140	-10	-20	-17
CDCA	9.14	391.3	373.3	-140	-10	-27	-20
UDCA	5.27	391.3	373.5	-140	-10	-30	-7
LCA	12.02	375.3	375.3	-120	-10	-23	-20
GCA	4.81	464.3	74.1	-120	-10	-75	-7
GDCA	7.52	448.3	74.2	-140	-10	-75	-20
GCDCA	6.94	448.4	74.1	-140	-10	-72	-20
GUDCA	3.54	448.3	73.9	-140	-10	-76	-19
GLCA	9.59	432.3	74.0	-135	-10	-46	-5
TCA	4.66	514.2	80.1	-120	-10	-125	-20
TCDCA	6.77	498.3	80.0	-110	-10	-120	-10
TUDCA	3.47	498.3	80.1	-120	-10	-120	-10
TLCA	9.36	482.3	79.9	-170	-10	-120	-6
TDCA	7.33	498.2	80.0	-120	-10	-120	-21
HDCA	5.94	391.3	391.3	-145	-10	-20	-10
THDCA	3.91	498.2	80.3	-180	-10	-148	-10
GHDCA	3.99	448.3	74.2	-135	-10	-72	-10
T-α-MCA	2.21	514.2	79.9	-140	-10	-120	-5
T-β-MCA	3.84	514.3	79.9	-140	-10	-136	-8
α-MCA	2.29	407.4	371.1	-140	-10	-43	-10
β-MCA	3.64	407.3	371.0	-140	-10	-45	-14
DHCA (IS)	1.20	401.3	249.1	-146	-10	-144	-10

1.3 样品前处理

1.3.1 血清和羊水的处理 血清和羊水各吸取 50 μl , 加入 250 μl 甲醇和 200 ng/ml 的内标溶液 50 μl 后, 涡旋混匀 1 min, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中以 10 200 r/min, 将上清液转移至新的 1.5 ml 离心管中, 氮气吹干; 用 50 μl 甲醇: 水溶液 (1:1, V/V) 溶解干燥沉淀, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中以 10 200 r/min, 取上清液进行分析。

1.3.2 肝脏和胎盘的处理 取肝脏和胎盘组织各 100 mg, 加入装有 1 ml 75% 乙醇的 1.5 ml 离心管内, 随后进行组织匀浆, 先置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h 后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中以 7 900 r/min, 取上清液 50 μl 置于 1.5 ml 离心管中, 加入 200 ng/ml 的内标溶液 50 μl , 涡旋混匀 1 min, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中以 10 200 r/min, 将上清液转移至新的 1.5 ml 离心管中, 氮气吹干; 用 50 μl 甲醇: 水溶液 (1:1, V/V) 溶解干燥沉淀, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中以 10 200 r/min, 取上清液进行分析。

1.3.3 空白基质的制备 分别取孕鼠血清、羊水、肝脏和胎盘的匀浆液, 配制成活性炭浓度 0.1 g/ml 匀浆混悬液, 震荡涡旋 1 h, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中以 11 600 r/min, 取上清液备用。

1.3.4 胆汁酸储备液和内标溶液及系列工作液的配制 分别取 22 种胆汁酸组分标准品约 10 mg, 精密称定, 在 10 ml 容量瓶中用 50% 甲醇水溶液定容至 10 ml, 得到 1 mg/ml 的各胆汁酸溶液。随后将 22 种胆汁酸组分混匀后定容至 10 ml, 得到各胆汁酸浓度为 10 000 ng/ml 的胆汁酸储备液, 最终将胆汁酸储备液用空白基质稀释成 2.5、5、10、25、50、100、250、500、1 000、2 500、5 000 ng/ml 的混合对照品曲线系列工作液, 冷藏保存。

取内标对照品约 10 mg, 精密称定, 用 50% 甲醇水溶液定容至 10 ml, 充分混匀得到浓度为 1 mg/ml 的内标混合液, 随后用 50% 甲醇水溶液稀释成 200 ng/ml 的内标工作液, 冷藏备用。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析。先进行方差齐性检验; 对满足正态分布的两组数据, 正态性检验, 线性相关性分析采用 Pearson 相关分析, 否则采用 spearman 相关分析。计量资料实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料实验数据用百分比 (%) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性 孕鼠空白基质、孕鼠空白基质加入胆汁酸标准品和内标对照品工作液的色谱图分别见图 1。

2.1.2 标准曲线与线性范围 以胆汁酸混合储备液中各胆汁酸成分浓度为横坐标 (X), 胆汁酸混合储备液中各胆汁酸成分峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标 (\hat{Y}), 进行加权最小二乘法权重 ($1/X^2$) 回归运算的标准曲线, 见表 3。22 种胆汁酸在仪器检测范围内呈良好的线性关系。

表 3 22 种胆汁酸线性范围、回归方程以及相关系数

胆汁酸	回归方程	r	线性范围 (ng/ml)
CA	$\hat{Y} = 3.80027 \times 10^{-4}X + 3.14639 \times 10^{-4}$	0.99760	10~2500
DCA	$\hat{Y} = 0.00365X + 0.00260$	0.99544	10~1000
CDCA	$\hat{Y} = 1.94658 \times 10^{-4}X + 5.04515 \times 10^{-4}$	0.99540	10~1000
UDCA	$\hat{Y} = 0.00916X - 2.62149 \times 10^{-4}$	0.99575	10~5000
LCA	$\hat{Y} = 0.00723X - 0.01592$	0.99551	2.5~500
GCA	$\hat{Y} = 0.00381X - 3.00933 \times 10^{-4}$	0.99747	10~5000
GDCA	$\hat{Y} = 7.57613 \times 10^{-4}X + 1.84549 \times 10^{-4}$	0.99714	10~5000
GCDC	$\hat{Y} = 9.28488 \times 10^{-4}X - 0.00216$	0.99725	2.5~5000
GUDCA	$\hat{Y} = 4.65622 \times 10^{-4}X - 0.00104$	0.99675	2.5~5000
GLCA	$\hat{Y} = 9.33477 \times 10^{-4}X - 0.00208$	0.99773	2.5~1000
TCA	$\hat{Y} = 0.00191X - 0.00401$	0.99852	2.5~5000
TCDC	$\hat{Y} = 0.00372X - 0.00663$	0.99755	2.5~5000
TUDCA	$\hat{Y} = 0.00324X - 0.00679$	0.99753	2.5~5000
TLCA	$\hat{Y} = 0.00855X - 0.01871$	0.99811	2.5~2500
TDCA	$\hat{Y} = 0.00490X - 0.00621$	0.99707	10~5000
HDCA	$\hat{Y} = 0.02017X - 0.04207$	0.99555	2.5~1000
THDCA	$\hat{Y} = 7.14349 \times 10^{-4}X - 0.00166$	0.99863	2.5~5000
GHDCA	$\hat{Y} = 0.00256X - 0.00588$	0.99720	2.5~5000
T- α -MCA	$\hat{Y} = 0.00574X - 0.01281$	0.99727	2.5~5000
β -MCA	$\hat{Y} = 7.32280 \times 10^{-4}X - 0.00153$	0.99458	2.5~1000
T- β -MCA	$\hat{Y} = 0.00559X - 0.01136$	0.99774	2.5~5000
α -MCA	$\hat{Y} = 8.28990 \times 10^{-4}X + 4.23700 \times 10^{-4}$	0.99496	2.5~2500

2.1.3 准确度与精密度 取胆汁酸混合储备液制备 10、50、500 ng/ml 3 种浓度的质控样品, 每种浓度平行 5 份, 连续进样 3 d, 计算准确度和精密度, 结果见表 4。血清样本中各胆汁酸的准确度在 89% ~ 106%, 日间和日内精密度 RSD 在 0.5% ~ 7.4%, 结果符合要求。

2.1.4 基质效应与提取回收率 配制 3 种标准样品 (A1、A2、A3), 每种样品配制 3 个浓度 (10、50、500 ng/ml)。A1 是使用 50% 甲醇配制不含基质的混合对照品溶液; A2 是使用空白基质氮吹干燥后, 使用 50% 甲醇复溶配制的混合对照品溶液; A3 是按照 1.2.2 项下处理的空白基质配制混合对照品溶液。分别进样, 记录各胆汁酸和内标峰面积。A2/A1 为质控浓度的基质效应, A3/A2 为质控浓度的提

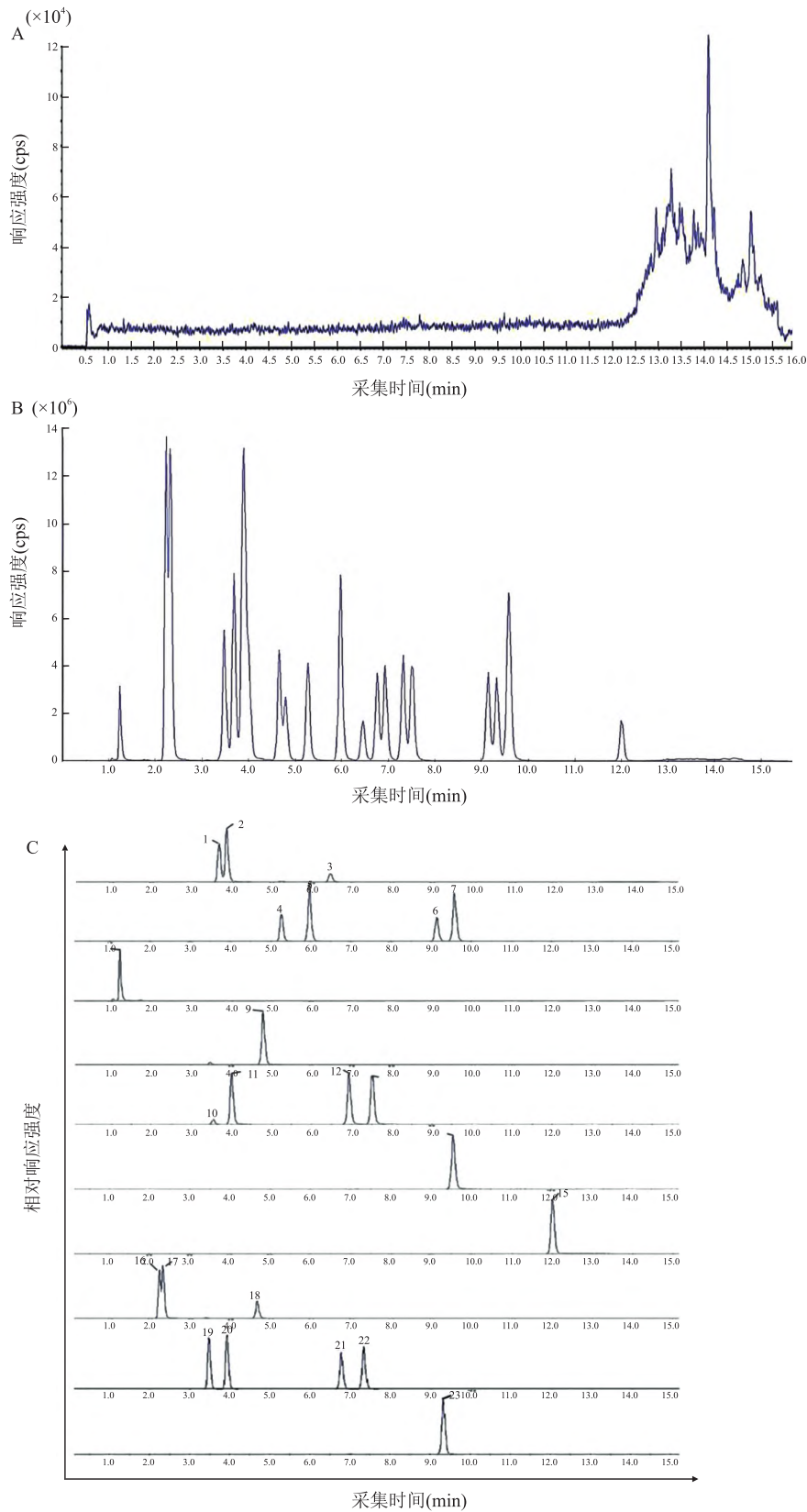


图1 22种胆汁酸和内标 LC-MS/MS 色谱图

A: 空白基质; B: 空白基质加胆汁酸混标及内标品; C: 胆汁酸混标色谱图; 1: α -MCA; 2: β -MCA; 3: CA; 4: UDCA; 5: THDCA; 6: CDCA; 7: DCA; 8: DHCA; 9: GCA; 10: GUDCA; 11: GHDCA; 12: GCDC; 13: GDCA; 14: GLCA; 15: LCA; 16: T- α -MCA; 17: T- β -MCA; 18: TCA; 19: TUDCA; 20: HDCA; 21: TCDCA; 22: TDCA; 23: TLCA

取回收率,基质效应准确度在 88% ~ 110%, RSD 在 0.5% ~ 15%,提取回收率在 84% ~ 108%, RSD 在 1% ~ 15%,均符合要求,结果见表 4。

2.1.5 稳定性 配制样品基质低、中、高 3 种质控浓度样品,每个质控浓度样品平行制备 5 份,考察放置于自动进样器 24 h、室温放置 6 h 后, -80 °C 反复冻融 3 次及 -80 °C 冰箱中冷冻保存 90 d 后的稳定性,结果均稳定。

2.2 孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘的胆汁酸含量测定 通过建立的 LC-MS/MS 方法测定 7 只孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘的胆汁酸成分。见表 5,在母鼠血清胆汁酸成分含量较高的是 CA、TCA 和 β -MCA;肝脏中胆汁酸成分含量较高的是 TCA、T- β -MCA;羊水胆汁酸成分含量较高的是 TCA;胎盘中

胆汁酸成分含量较高的是 TCA。由于不同部位胆汁酸成分含量不同,部分胆汁酸低于仪器检测限而未能检测出来。

3 讨论

胆汁酸是人体内一种重要的内源性物质,而且其理化性质差异较大,存在多种同分异构体^[7]。为了使各胆汁酸成分能够在短时间内有效分离,本研究经过多次重复性实验,发现流动相 A 相中以含有 0.1% 冰乙酸的 4 mmol/L 乙酸铵水溶液分离效果最理想。国内关于孕鼠体内生物样本中胆汁酸成分的测定方法学未见报道。本实验主要使用蛋白沉淀法作为孕鼠血清和羊水的前处理方法,该方法简单快捷^[8],对于孕鼠肝脏和胎盘,使用恒温水浴孵育

表 4 血浆质控样品中各胆汁酸的准确度、精密密度、基质效应以及提取回收率

胆汁酸	浓度 (ng/ml)	准确度		精密密度		RSD(%)		基质效应(%)		提取回收率(%)	
		(%)	日内	日间	日内	日间	均值	RSD	均值	RSD	
CA	10	103.72	6.19	4.41	109.95	12.78	104.08	9.85			
	50	91.30	2.16	3.51	95.59	5.15	99.34	3.86			
	500	89.81	3.97	1.71	97.07	6.83	102.51	5.83			
DCA	10	96.75	7.29	2.03	105.31	4.65	106.71	6.98			
	50	95.52	6.46	4.63	100.53	1.36	101.47	1.68			
	500	93.56	3.91	1.59	99.83	1.44	99.93	1.37			
CDCA	10	95.58	3.47	2.94	93.78	14.60	96.12	13.33			
	50	99.05	4.38	3.51	99.11	4.20	100.46	3.99			
	500	96.28	2.22	1.54	100.01	1.31	99.52	1.68			
UDCA	10	98.50	3.87	2.52	88.66	8.50	91.72	5.38			
	50	95.26	1.14	0.71	98.19	3.41	98.65	2.16			
	500	93.66	1.65	1.26	100.39	1.75	96.26	5.88			
LCA	10	101.16	4.46	3.78	94.32	6.26	94.18	7.84			
	50	95.27	1.71	1.56	98.88	1.83	99.49	2.54			
	500	99.63	1.09	1.52	99.43	1.59	98.81	0.84			
GCA	10	105.20	2.31	2.14	96.25	5.20	101.40	6.21			
	50	103.33	1.72	3.41	96.37	3.88	98.86	1.98			
	500	103.90	2.23	1.51	99.69	2.56	96.60	5.36			
GDCA	10	95.85	3.78	3.46	93.01	10.77	96.55	11.32			
	50	97.32	1.62	3.96	100.71	2.03	99.06	0.73			
	500	97.59	1.70	1.08	98.05	0.78	99.14	1.11			
GCDCA	10	97.57	3.95	2.45	94.95	5.21	98.99	13.11			
	50	94.30	2.53	3.97	96.71	2.34	95.67	5.66			
	500	92.93	2.06	0.94	99.43	1.15	97.64	3.93			
GUDCA	10	100.80	2.26	4.08	105.09	6.55	101.03	10.70			
	50	101.56	1.27	2.00	98.47	5.75	98.44	3.00			
	500	99.78	0.89	0.57	97.18	2.04	95.48	4.62			
GLCA	10	105.72	5.49	4.83	88.94	3.51	84.92	13.21			
	50	101.13	0.71	1.71	99.38	2.47	96.14	6.94			
	500	99.74	1.78	1.32	99.11	1.24	96.28	4.07			
TCA	10	103.11	3.41	3.95	91.36	3.79	95.54	4.71			
	50	99.36	2.59	2.42	99.29	2.09	98.21	4.93			
	500	104.07	2.48	1.33	100.99	1.52	100.71	2.01			
TCDCA	10	96.49	4.89	4.79	95.95	12.48	96.12	5.51			
	50	98.72	3.24	2.40	97.25	3.69	98.79	3.38			
	500	100.36	2.07	2.82	97.99	2.71	98.45	3.43			
TUDCA	10	104.99	6.39	4.02	94.47	6.98	96.53	6.62			
	50	101.25	1.70	4.78	98.45	2.93	95.82	2.12			
	500	102.70	2.90	2.54	99.28	1.61	94.73	4.74			
TLCA	10	92.64	3.25	2.92	102.49	1.98	96.97	9.80			
	50	92.63	2.33	3.67	96.62	2.85	96.94	4.35			
	500	95.55	5.24	4.68	98.48	1.58	99.90	4.55			
TDCA	10	94.34	2.51	2.41	100.93	5.46	94.39	12.26			
	50	99.18	1.94	4.10	98.21	2.64	96.17	2.32			
	500	103.19	2.14	1.40	98.41	1.82	99.44	2.82			
HDCA	10	98.03	3.38	2.22	103.53	8.09	100.88	9.56			
	50	96.74	4.12	3.37	97.24	2.47	99.81	4.10			
	500	94.69	2.19	1.73	98.31	1.59	98.19	2.32			
THDCA	10	97.82	5.42	1.87	97.61	4.22	98.25	8.39			
	50	99.06	3.59	3.81	99.57	2.09	93.91	1.95			
	500	102.33	3.16	0.62	98.83	1.68	94.31	5.39			
GHDCA	10	104.68	2.62	3.30	89.30	10.92	94.53	8.87			
	50	99.24	2.12	3.11	98.77	3.90	99.45	4.58			
	500	98.33	1.92	1.55	98.64	2.42	98.99	2.88			
T- α -MCA	10	104.16	3.15	1.33	101.41	9.59	96.98	7.26			
	50	102.52	1.54	3.88	96.64	2.95	96.94	3.24			
	500	102.98	1.80	0.54	97.75	2.12	97.69	2.35			
T- β -MCA	10	102.20	2.99	2.77	99.51	7.50	97.62	7.76			
	50	101.84	1.48	3.56	97.06	4.15	97.35	3.05			
	500	104.20	3.46	1.34	99.30	1.66	96.84	3.63			
α -MCA	10	97.50	3.67	5.68	99.02	14.54	107.92	15.23			
	50	94.84	1.83	3.65	97.05	3.32	98.82	4.32			
	500	92.32	1.89	1.37	98.45	2.63	95.99	4.44			
β -MCA	10	96.25	3.03	2.65	100.40	5.53	95.10	11.25			
	50	92.60	1.65	2.93	96.70	3.00	97.86	4.34			
	500	95.22	2.71	1.63	96.84	4.01	94.98	4.85			

表5 孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘胆汁酸成分含量(n=7)

胆汁酸	胆汁酸浓度				胆汁酸占比(%)			
	母血	肝脏	羊水	胎盘	母血	肝脏	羊水	胎盘
CA	95.84	1.23	2.85	0.09	29.43	2.11	4.47	6.97
DCA	16.71	0.04	0.49	0.02	5.13	0.07	0.76	1.63
CDCA	11.68	-	0.81	-	3.59	-	1.26	-
UDCA	12.13	0.05	0.21	-	3.72	0.08	0.34	-
LCA	0.35	-	0.32	-	0.11	-	0.50	-
HDCA	1.83	-	-	-	0.56	-	-	-
GHDCA	0.82	-	-	-	0.25	-	-	-
GCA	0.33	0.05	0.08	-	0.10	0.09	0.13	-
GDCA	-	0.04	0.28	-	-	0.07	0.44	-
GCDCA	-	0.02	-	-	-	0.04	-	-
GUDCA	0.05	0.05	0.42	-	0.02	0.08	0.65	-
GLCA	-	0.02	-	-	-	0.03	-	-
GHDCA	-	0.04	-	-	-	0.07	-	-
TCA	65.64	32.99	39.90	0.80	20.16	56.65	62.51	58.65
TCDC	1.77	0.29	-	0.07	0.54	0.49	-	4.98
TUDCA	1.60	0.68	1.12	0.01	0.49	1.17	1.75	0.91
TDCA	4.89	0.86	1.83	0.04	1.50	1.48	2.87	2.96
THDCA	1.26	0.02	0.38	0.02	0.39	0.04	0.59	1.79
α-MCA	7.62	0.41	1.08	0.03	2.34	0.70	1.69	1.93
β-MCA	65.81	1.32	0.78	0.03	20.21	2.26	1.22	1.92
T-α-MCA	10.51	4.15	6.40	0.13	3.23	7.12	10.03	9.26
T-β-MCA	26.81	15.98	6.29	0.12	8.23	27.44	9.85	9.00

的方法提取胆汁酸进行前处理^[9]。对取得处理好的上清液,进行氮吹干燥后复溶上机检测,能够得到很好的检测效果。

本研究测定了孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘的22种胆汁酸成分,包含游离型和结合型在内的初级和次级胆汁酸。检测的结果表明,在孕鼠血清中,游离型胆汁酸含量最高的是CA,占比为29.43%,结合型胆汁酸含量最高为TCA,占比为20.16%。而在孕鼠肝脏、羊水、胎盘中含量最高的均为TCA,且占比均超过50%,并且发现胎盘中可检测的胆汁酸成分最少。在人体中,含量最高的初级胆汁酸有CA和CDCA,以及次级胆汁酸DCA、LCA和UDCA^[10-11]。

临床上对于妊娠期肝病多以血清总胆汁酸水平含量作为诊断指标^[12]。血清总胆汁酸对于妊娠期肝病的诊断特异性较差,这可能会给临床明确诊断妊娠期肝病带来一定难度,无法早期准确识别妊娠期肝病且易产生混淆和误诊,甚至会导致不良的围产期结局,包括不必要的医源性早产、剖宫产和意外的宫内胎儿死亡^[13]。因此,依靠总胆汁酸对妊娠期

肝病进行诊断和鉴别诊断具有明显的局限性,该研究使用孕鼠作为实验对象,模拟孕妇妊娠期,建立LC-MS/MS检测胆汁酸谱的方法学有利于妊娠期肝病诊断和治疗,具有重要的临床应用价值。

参考文献

[1] Michael T, Thierry C, Peter F, et al. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism[J]. Dig Dis,2010,28(1):220-4.

[2] Russell D W. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism[J]. J Lipid Res, 2009, 50 Suppl(Suppl):S120-5.

[3] Boyer J L. Bile formation and secretion[J]. Compr Physiol,2013,3(3):1035-78.

[4] 张久聪, 聂青和. 胆汁酸代谢及相关进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2008(11):953-6.

[5] Nuño-Lúbarri N, Domínguez-Pérez M, Baulies-Domenech A, et al. Liver cholesterol overload aggravates obstructive cholestasis by inducing oxidative stress and premature death in mice[J]. Oxid Med Cell Longev,2016,2016:9895176.

[6] 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 U S A,2001,98(6):3369-74.

[7] Chiang J Y. Bile acid metabolism and signaling[J]. Compr Physiol,2013,3(3):1191-212.

[8] Bathena S P, Thakare R, Gautam N, et al. Urinary bile acids as biomarkers for liver diseases I. Stability of the baseline profile in healthy subjects[J]. Toxicol Sci,2015,143(2):296-307.

[9] Dawson P A, Karpen S J. Intestinal transport and metabolism of bile acids[J]. J Lipid Res,2015,56(6):1085-99.

[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):209-17.

[11] Zhang C, Gan Y, Lv J, et al. The protective effect of obeticholic acid on lipopolysaccharide-induced disorder of maternal bile acid metabolism in pregnant mice[J]. Int Immunopharmacol,2020,83:106442.

[12] Manzotti C, Casazza G, Stimac T, et al. Total serum bile acids or serum bile acid profile, or both, for the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 7(7):CD012546.

[13] Catherine W, Victoria G. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Obstet Gynecol,2014,124(1):120-33.

(下转第1299页)

diabetic model was established by intraperitoneal injection of 1% STZ. After one month, celecoxib (50 mg/kg) was given intragastric administration (1/day) in the DR + C group. Two months later, serum total cholesterol (TC) and insulin were detected. The histopathological changes of the retina were observed. The expression of junctional adhesion molecule-like protein (JAML), VEGF and their signal pathway proteins and the distributions of interleukin-10 (IL-10), vascular cell adhesion molecules-1 (VCAM-1) were detected by Western blot. HUVEC cells were divided into normal glucose group (NG), high glucose group (HG) and high glucose plus celecoxib group (HG + C) to detect the expression of the above proteins. **Results** Compared with DR, retina in DR + C group was thinner. The retina in the DR + C group was thicker than that in the NC group. The levels of retinal JAML, phosphatidylinositol kinase3 (PI3K), phosphorylphosphatidylinositol kinase3 (P-PI3K), hypoxia-inducible factor1- α (HIF1- α), and VEGF in DR + C group were lower than those in DR group, while higher than those in NC group. The expression of retinal IL-10 and VCAM-1 decreased. The content of TC in DR + C and DR group was higher than those in NC group ($P < 0.01$), while the content of insulin in DR + C and DR group was lower than those in NC group ($P < 0.001$). Compared with HG group, the expressions of JAML, PI3K, P-PI3K, HIF1- α , VEGF in HG + C group decreased, but was higher than those in NG group. There was no significant difference in PI3K among the three groups. **Conclusion** Celecoxib can decrease the expression of VEGF, IL-10, VCAM-1 in retina of DR rats, which may be related to the PI3K/HIF1- α signaling pathway mediated by JAML.

Key words celecoxib; JAML; diabetes retinopathy; phosphatidylinositol

(上接第 1292 页)

LC-MS/MS simultaneous determination of 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice

Zhao Fan^{1,2,3}, Zhang Lun^{2,3}, Ye Lu^{1,2,3}, Zhang Jiayi^{1,2,3}, Yu Yun^{2,3}, Huang Qianqian^{2,3}, Wang Jianqing^{1,2,3}
(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012; ³Anhui Public Health Clinical Center, Hefei 230012)

Abstract Objective High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) system was used to accurately determine 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice, and a LC-MS/MS method was established for efficient detection and analysis of bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of mice. **Methods** Pregnant mice serum, liver, amniotic fluid and placenta samples were processed, with 0.1% glacial acetic acid in 4 mmol/L ammonium acetate aqueous solution as mobile phase A and pure methanol as mobile phase B, the flow rate was 0.4 ml/min, a gradient elution program was used to elute with Phenomenex Gemini 3 μ m NX-C18 110A (100 mm \times 2.0 mm) chromatographic column elution, and mass spectrometry detection system used an electrospray ion source for negative ion multiple reaction monitoring. **Results** The linear relationship of 22 bile acids in the quantitative range was good. The RSD of inter-day and intra-day precision at low, medium and high concentrations was 0.5% - 7.4%, the matrix effect was 88% - 110%, and the extraction recovery was 84% - 108%. **Conclusion** In this experiment, LC-MS/MS was established to detect 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice. The method not only has high sensitivity and selectivity, but also can stably detect a large number of samples.

Key words bile acids; high performance liquid chromatography-mass spectrometry system; pregnant mice; methodology