技术方法 文章编号:0253-3626(2009)01-0059-04

# 高效液相色谱法同时测定胆汁中 9 种结合型胆汁酸

王文娟[1],邓文平[1],王 猛[1],陈 耿[2],丁 敏[1]
(1. 重庆医科大学检验学临床检验诊断学 教育部重点实验室,重庆 400016;
2. 第三军医大学西南医院肝胆外科,重庆 400038)

【摘 要】目的:建立测定人胆汁中结合型胆汁酸的 HPLC- 紫外检测法。方法:胆汁样品经固相萃取,采用 Waters Nova C18 色谱柱,柱温为 25℃,流动相为甲醇:磷酸盐缓冲液(60 mmol/L,pH3.3)(66:34,v/v),流速 0.8 ml/min,检测波长 197 nm。结果:9 种结合型胆汁酸在 20 min 内分离完全,各胆汁酸在浓度为 8~1000 μmol/L 范围内线性良好,r 为 0.999 1~0.999 9;最低检测限为 1.25~3.13 μmol/L;该方法日内变异在 3.77%~8.20%之间,日间变异在 6.73%~17.11%之间,各胆汁酸的回收率在 88.23%~109.75%之间。结论:本方法准确、灵敏、快速,适用于胆汁中结合型胆汁酸水平的实验室研究和临床常规检测。

【关键词】胆汁;胆汁酸;色谱法
【中国图书分类法分类号】R446.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-23

# Simultaneous determination of nine types of conjugated bile acids in bile by high performance liquid chromatography

*WANG Wen-juan, et al.*
(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop a HPLC method with ultraviolet detection to determine nine types of conjugated bile acids in human bile. *Methods*: Bile acids in bile juice were extracted using Sep-Pak C18 cartridges. The analytes were eluted using methanol/phosphate buffer(60 μmol/L, pH3.3) (66:34, v/v) as mobile phase on a Waters Nova C18 column. The flow rate was 0.8 ml/min. The column was kept at 25℃. The eluate was monitored by a ultraviolet detection at 197nm. *Results*: The nine types of conjugated bile acids were completely analyzed in twenty minitus by this method. The assay was linear in the range 8~100 0 μmol/L, with the correlation coeffients for linear regression from 0.9991 to 0.999 9.The detection limits ranged from 1.25 to 3.12 μmol/L. The within-day precision was below 8.20%, and the between-day precision was below 17.11%. The recoveries were 88.23%~109.75%.*Conclusion*: This method is accurate, sensitive, rapid and suitable for the rountine clinical practice and research practice.

【Key words】 Bile; Bile acids; Chromatography

胆汁酸有初级胆汁酸包括胆酸(Cholic acid, CA)、鹅脱氧胆酸(Chenodeoxycholic acid, CDCA)和次级胆汁酸包括脱氧胆酸(Deoxycholic acid, DCA)、石胆酸(Lithocholic acid, LCA),它们又有甘氨、牛磺结合形式。胆汁酸的代谢与肝胆疾病密切相关,其质和量的变化对肝胆疾病的诊断、鉴别诊断及发病机理研究具有重要价值[1,2]。因此建立简便有效地检测生物体液中各类胆汁酸的分析方法十分必要。胆汁酸的测定多采用 HPLC-荧光检测[3,4],虽然方法灵敏但需衍生化、且牛磺结合型胆汁酸还需水解成游离胆汁酸后才能衍生,操作复杂、耗时长不适用于临床标本分析。由于人胆汁中的胆汁酸以结合型为主,且含量较高,采用紫外检测法(Ultraviolet, UV)测定各结合型胆汁酸便可反映胆汁中胆汁酸的代谢情况。胆汁样本的处理采用固相萃取(Solid phase extract, SPE)有利于去除内源性物质干扰[5]。本文建立了 SPE-HPLC-UV 法同时测定人胆汁中 9 种结合型胆汁酸的方法,并成功用于胆管癌与胆结石患者的胆汁测定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Shimadzu 2010LC-AHT 高效液相色谱仪,附紫外检测器

作者介绍:王文娟(1983- ),女,硕士,
研究方向:临床检验诊断学。
通讯作者:丁 敏,女,教授,E-mail:dingmin63@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(20475069)。

（日本 Shimadzu 公司）；Aglient 固相萃取装置（美国 Aglient 公司）；Millipore 纯水装置（美国 Millipore 公司）；Chromabond C18 固相萃取小柱（德国 Maeherey-Nagel 公司）；牛磺熊脱氧胆酸（Tauroursodeoxycholic acid，TUDCA）、牛磺胆酸（Taurocholic acid，TCA）、甘氨胆酸（Glycocholic acid，GCA）、甘氨石胆酸 Glycolithocholic acid，GLCA）、甘氨脱氧胆酸（Glycodeoxycholic acid，GDCA）、牛磺脱氧胆酸（Taurodeoxycholic acid，TDCA）、甘氨鹅脱氧胆酸（Glycochenodeoxycholic acid，GCDCA）、牛磺鹅脱氧胆酸（Taurochenodeoxycholic acid，TCDCA）、牛磺石胆酸（Taurolithocholic acid，TLCA）标准品均购自美国 sigma 公司；甲醇、乙腈（色谱纯，美国 Tedia 公司），其余试剂均为分析纯。

1.2　*方法*

12.1　色谱条件　色谱柱为 Waters Nova C18 柱（3.9 mm × 150 mm，5 μm），流动相为甲醇 -60 mmol/L 磷酸盐缓冲液（66∶34，v/v），pH 3.3，等度洗脱，柱温 25℃，流速：0.8 ml/min；检测波长：197 nm，进样量为 10 μl。

1.2.2　样品预处理方法　方法 1：取胆汁样品 25 μl，加入乙腈 2.5 ml，旋涡震荡混匀，超声 20 min，10 000 g/min 离心 10 min，取上清液 2 ml，60℃氮气下吹干。将预处理吹干后的胆汁样品溶于 2 ml 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0），加至已活化的固相萃取 C18 小柱上（预先用 2 ml 甲醇和 5 ml 蒸馏水依次活化 C18 小柱），再用 10 ml 蒸馏水淋洗小柱，最后用 3 ml 甲醇洗脱胆汁酸。洗脱液在 60℃氮气下吹干后溶于 200 μl 流动相，超声 30 s，10 μl 进样。

方法 2：取胆汁样品 20 μl，加入 1 ml 0.05%甲酸溶液，旋涡震荡混匀后加至已活化的固相萃取 C18 小柱上（预先用 1 ml 甲醇和 1 ml 0.05%甲酸溶液依次活化 C18 小柱），用 2 ml 0.05%甲酸，1 ml 甲醇溶液（45∶55）依次淋洗小柱，最后用 3 ml 甲醇洗脱胆汁酸，洗脱液在 60℃氮气下吹干后溶于 200 μl 流动相，超声 30 s，10 μl 进样。

1.2.3　统计学分析　采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析，资料以中位数 ± 四分位数间距表示（M ± Q），组间比较采用 Mann-Whitney U 检验，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

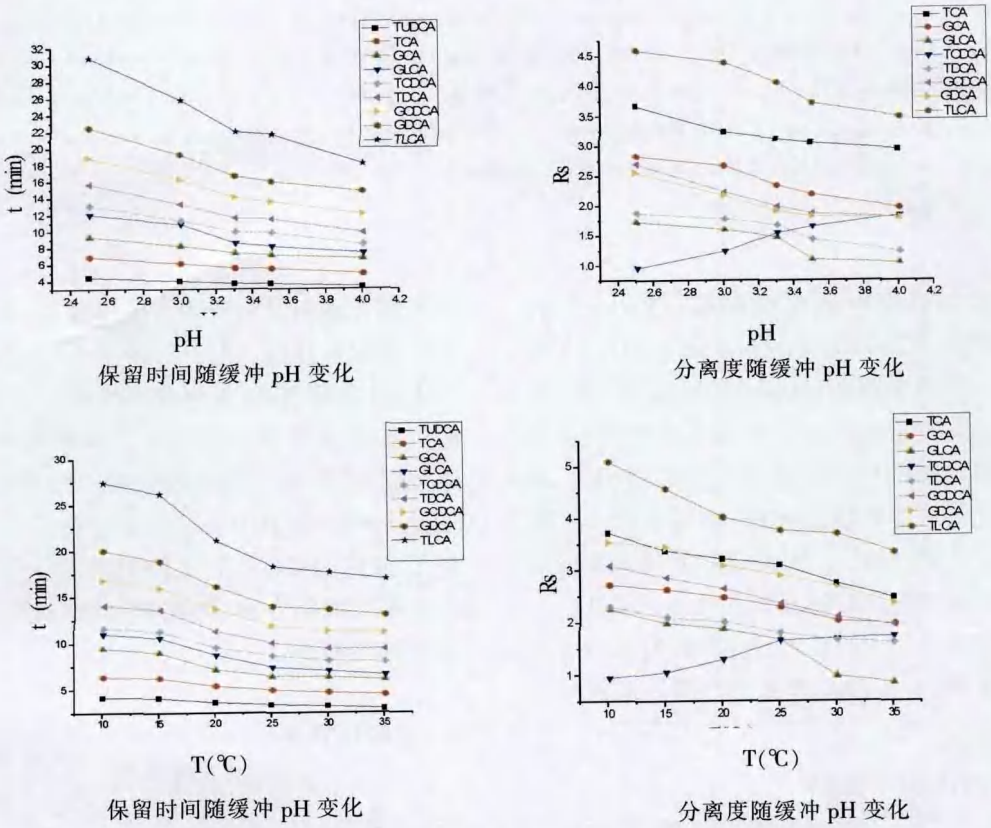
## 2　结　果

### 2.1　色谱条件的确定

固定其它色谱条件不变，分别改变流动相的 pH 值、柱温，考察 9 种结合胆汁酸的保留时间与分离度随缓冲盐的 pH 值与温度变化，结果如图 1 所示，保留时间随 pH 值、温度增高而缩短；分离度除 TCDCA 外随 pH 值、温度增高而变小。

### 2.2　样品预处理条件的确定

考察了两种 SPE 方法处理胆汁样品，高、中、低浓度的回收率及变异系数见表 2，方法 1 的回收率比方法 2 低，而变异系数却比方法 2 大。本研究采用方法 2 处理胆汁样品。




保留时间随缓冲 pH 变化　　分离度随缓冲 pH 变化

保留时间随缓冲 pH 变化　　分离度随缓冲 pH 变化

**图 1　保留时间、分离度随缓冲盐 pH 值及温度的变化**

### 2.3 标准曲线的线性范围及检出限

配制一系列不同浓度的胆汁酸标准溶液，10 μl 进样，重复测定 3 次，以各胆汁酸标准品的浓度与对应的峰面积绘制标准曲线，线性范围为 8~1 000 μmol/L。以 3 倍信噪比(S/N=3)时样品浓度为最低检测限，见表 2。

### 2.4 精密度与回收率

取胆汁样品，按“1.2.2”中方法 2 操作。日内重复测定 5 次，连续测定 5 d，日内变异高(930 μmol/L)、低(23 μmol/L)浓度分别在 5.39%~8.20%，3.77%~5.14%之间；日间变异分别在 6.73%~11.03%，9.28%~17.11%之间。结果表明本方法具有较好的精密度。对高、中、低不同浓度的胆汁样品进行加标回收试验，结果见表 1。

### 2.5 患者胆汁中胆汁酸测定

采用所建立的方法对胆管癌和胆结石患者胆汁样品进行了分析，各结合型胆汁酸在 20 min 分离完全，结果如图 2，表 3 所示。胆管癌组中 TDCA 浓度低于结石组($P<0.05$)，而 TCA 浓度高于结石组($P<0.05$)。

## 3 讨 论

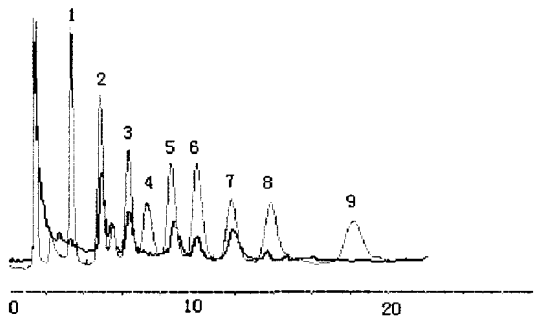
结合胆汁酸的色谱保留行为受流动相中磷酸缓冲液的 pH 影响，如图 1 所示，pH 在 2.5~4.0 之间变化时，各组分的分离度和保留时间变化明显，pH 越高，保留时间越短，除 TCDCA 外分离度均降低。pH 在 2.5~3.0 时 GLCA 与 TCDCA 不能实现基线分离，pH 为 3.3 时 9 种胆汁酸的分离效果最好。研究

**表 1 两种样品预处理方法的回收率**

| 胆汁酸 | 加入值 | 方法 1 | | | 方法 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (μ mol/L) | 测定值 | 回收率(%) | CV(%) | 测定值 | 回收率(%) | CV(%) |
| TUDCA | 80 | 68.12 ± 8.04 | 91.44 | 11.81 | 74.49 ± 3.48 | 93.11 | 4.67 |
| | 400 | 366.17 ± 26.35 | 91.54 | 7.20 | 377.63 ± 9.52 | 94.41 | 2.52 |
| | 800 | 724.52 ± 29.69 | 90.57 | 4.10 | 731.21 ± 12.11 | 91.40 | 1.66 |
| TCA | 80 | 72.93 ± 11.44 | 91.16 | 15.67 | 71.52 ± 3.81 | 89.41 | 5.32 |
| | 400 | 379.53 ± 31.36 | 94.88 | 8.26 | 385.54 ± 8.26 | 96.39 | 2.14 |
| | 800 | 709.88 ± 57.33 | 88.74 | 8.08 | 759.13 ± 12.21 | 94.89 | 1.61 |
| GCA | 80 | 77.11 ± 9.84 | 96.39 | 12.76 | 74.03 ± 3.01 | 92.54 | 4.07 |
| | 400 | 367.16 ± 20.13 | 91.79 | 5.48 | 366.44 ± 10.73 | 91.61 | 2.93 |
| | 800 | 821.96 ± 44.18 | 102.74 | 5.38 | 803.55 ± 8.10 | 100.44 | 1.01 |
| GLCA | 80 | 66.92 ± 7.66 | 83.65 | 11.44 | 74.53 ± 2.33 | 93.16 | 3.13 |
| | 400 | 358.89 ± 33.05 | 89.72 | 9.21 | 352.92 ± 9.59 | 88.23 | 2.72 |
| | 800 | 643.17 ± 39.30 | 80.39 | 6.11 | 767.91 ± 11.36 | 95.90 | 1.47 |
| TCDCA | 80 | 67.88 ± 8.30 | 84.85 | 12.22 | 74.27 ± 1.75 | 92.84 | 2.36 |
| | 400 | 364.02 ± 27.95 | 91.01 | 7.68 | 354.13 ± 6.03 | 88.53 | 1.70 |
| | 800 | 718.43 ± 29.92 | 89.80 | 4.16 | 816.06 ± 9.46 | 102.01 | 1.16 |
| TDCA | 80 | 73.02 ± 11.69 | 91.28 | 16.01 | 73.11 ± 4.03 | 91.38 | 5.51 |
| | 400 | 326.29 ± 17.08 | 81.57 | 5.23 | 383.81 ± 10.94 | 95.95 | 2.85 |
| | 800 | 738.46 ± 36.19 | 92.31 | 4.90 | 811.34 ± 18.84 | 101.42 | 1.46 |
| GCDCA | 80 | 72.08 ± 7.86 | 90.10 | 10.90 | 77.49 ± 2.46 | 96.86 | 3.17 |
| | 400 | 361.17 ± 33.79 | 90.29 | 9.36 | 422.37 ± 11.22 | 105.60 | 2.66 |
| | 800 | 754.12 ± 44.26 | 94.26 | 5.87 | 774.19 ± 10.98 | 96.77 | 1.42 |
| GDCA | 80 | 71.48 ± 9.69 | 89.36 | 13.55 | 72.84 ± 3.95 | 91.04 | 5.42 |
| | 400 | 364.31 ± 19.29 | 91.08 | 5.30 | 367.16 ± 15.83 | 91.79 | 4.31 |
| | 800 | 739.07 ± 24.36 | 92.38 | 3.30 | 804.17 ± 10.59 | 100.52 | 1.32 |
| TLCA | 80 | 76.21 ± 12.30 | 95.26 | 16.16 | 87.80 ± 4.17 | 109.75 | 4.75 |
| | 400 | 367.73 ± 32.14 | 91.93 | 8.74 | 415.60 ± 19.26 | 103.90 | 4.63 |
| | 800 | 677.48 ± 36.42 | 84.68 | 5.38 | 822.09 ± 31.94 | 107.76 | 3.89 |

表 2 线性方程、相关系数和检出限($n$=5)

| 胆汁酸 | 线性方程 | 相关系数 | 检出限(μmol/L) |
|---|---|---|---|
| TUDCA | Y=2387.4X-9449.2 | 0.999 5 | 1.56 |
| TCA | Y=2268.3X-21364 | 0.999 7 | 1.56 |
| GCA | Y=2268.3X-21364 | 0.999 9 | 2.50 |
| GLCA | Y=1277.8X-22781 | 0.999 1 | 3.13 |
| TCDCA | Y=2058.2X-21537 | 0.999 4 | 2.50 |
| TDCA | Y=2337.9X-24940 | 0.999 1 | 2.50 |
| GCDCA | Y=1573.3X-14202 | 0.999 1 | 2.50 |
| GDCA | Y=1872.2X-19802 | 0.999 2 | 2.50 |
| TLCA | Y=1885.7X-10891 | 0.999 3 | 3.13 |




1.TUDCA; 2.TCA; 3.GCA; 4.GLCA; 5.TCDCA; 6.TDCA; 7.GCDCA ;8.GDCA; 9.TLCA

图 2 胆汁酸的色谱图(蓝色:混合标准品;黑色:胆结石患者胆汁样品)

表 3 胆结石与胆管癌组中各结合型胆汁酸浓度(μmol/L, M±Q)

| 胆汁酸 | 胆结石($n$=8) | 胆管癌($n$=5) |
|---|---|---|
| TUDCA | 288.86 ± 413.05 | 551.65 ± 1076.21 |
| TCA | 363.87 ± 217.40 | 925.63 ± 945.44* |
| GCA | 1 770.57 ± 1 721.75 | 2 054.77 ± 2 713.39 |
| GLCA | 34.19 ± 11.91 | 48.42 ± 15.96 |
| TCDCA | 598.05 ± 255.39 | 632.90 ± 392.68 |
| TDCA | 245.73 ± 138.86 | 116.03 ± 73.40* |
| GCDCA | 703.74 ± 731.16 | 1 132.84 ± 920.18 |
| GDCA | 163.42 ± 36.21 | 123.17 ± 47.22 |
| TLCA | 59.77 ± 30.38 | 58.35 ± 8.18 |

*$P$<0.05 vs 胆结石组

发现随着柱温升高,保留时间缩短,柱温为 30~35℃时 GCA 与 GLCA 不能基线分离,柱温为 20℃时GLCA 与 TCDCA 不能基线分离, 柱温为 10~15℃时GCA、GLCA、TCDCA 不能有效分离,本研究确定柱温为 25℃。另外考察发现流动相中甲醇的比例越高出峰越快,但分离度降低。当甲醇比例大于 70%时 GCA 与 GLCA 不能分离,分子量相同的 TCDCA 和TDCA,GCDCA 和 GDCA 几乎同时被洗脱。选择甲醇的比例为 66%,9 种结合胆汁酸在 20 min 内分离完全,且 Rs 均>1.5。

对于胆汁标本的处理有直接蛋白沉淀法和 C18 柱固相萃取法。本研究比较了两种胆汁样品的固相萃取方法,方法 1 沉淀蛋白后再固相萃取,操作较烦琐且胆汁酸的测定值普遍偏低,可能是由于乙腈沉淀蛋白时,胆汁酸被包裹于沉淀中,发生共沉淀现象造成了胆汁酸的损耗。方法 2 进行固相萃取时,增加了用(45:55)甲醇溶液淋洗这一关键步骤,有利于去除一些弱极性的内源性物质,减少对胆汁酸分离的干扰。采用方法 2 处理胆汁样品操作更简便,效果更好。

本研究建立的 RP-HPLC-UV 法同时测定人胆汁中 9 种结合型胆汁酸方法,为临床胆汁标本的分析提供了一种简单、经济、确实可行的方法。

## 参 考 文 献

[1] 周 新,涂植光.临床生物化学及生物化学检验[M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2004.238-239.

[2] Jeong Y P,Byung K P,Jun S K,et al. Bile Acid Analysis in Biliary Tract Cancer [J]. Yonsei medical Journal,2006,47(6):817-825.

[3] 丁 敏,刘春芳,何 俊.高效液相色谱法同时测定血清中 9 种胆汁酸[J]. 分析科学学报,2004,5(20):492-494.

[4] 王 猛,张晓清,丁 敏.反相高效液相色谱法测定鼠胆汁中游离与结合型胆汁酸[J]. 分析测试技术与仪器,2007,13(1):1-4.

[5] Lian Y,Suya L,Meng W,et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Journal of Chromatography B,2007,860:10-17.

(责任编辑:冉明会)