

# Application News

## No. M283

GC/MS

### GC-MSによる胆汁酸の分析

腸内細菌叢研究の隆盛に伴い、腸内細菌叢が産生する成分の分析に注目が集まっており、その一つに胆汁酸があります。

胆汁酸はステロイド誘導体であるコラン酸骨格を持つ化合物の総称で、一般的に分析にはLC-MS/MSがよく使われます。しかし、個々の化合物同士で分子構造が近いものも多く、より確実な分離のためにGC-MSも使用されることが多いです。GC-MSで胆汁酸を分析する場合、揮発性の確保のために、カルボキシル基やヒドロキシ基など親水性の側鎖を誘導体化する必要があります。

本稿では、胆汁酸のカルボキシル基をメチル化、ヒドロキシ基をトリメチルシリル(TMS)化することで、定量分析を行った例をご紹介します。この例では対象とした22胆汁酸化合物全てにおいて、ダイナミックレンジが100倍以上、 $R^2 > 0.995$ 以上の直線性を確認しました。

T. Sakai

#### ■胆汁酸の構造と誘導体化

胆汁酸化合物は、分子量が比較的大きく、かつ親水性の残基を持つため難揮発性で、そのままの状態ではGC-MS分析ができません。GC-MSで分析するためには、親水性の残基を誘導体化する必要があります。胆汁酸において重要な残基はヒドロキシ基およびカルボキシル基で、少なくともこれらに関して別の残基に置き換える誘導体化が必要となります。

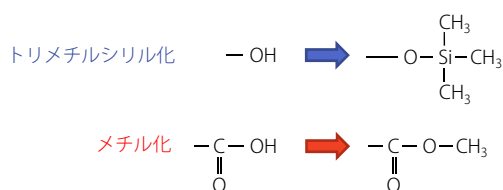
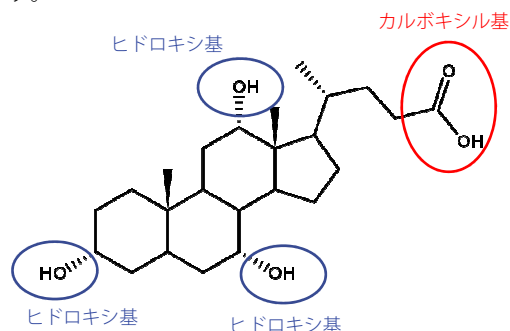


図2 誘導体化の模式図

ヒドロキシ基をトリメチルシリル化、カルボキシル基をメチル化する

トリメチルシリル化は一般的にヒドロキシ基、カルボキシル基の両方の親水性残基に対して誘導体化が可能ですが、胆汁酸においては誘導体化化合物が不安定であったため、本稿では、カルボキシル基をメチル化したのち、ヒドロキシ基をトリメチルシリル化する誘導体化手法を採用しました。前処理の詳細を図3に示します。

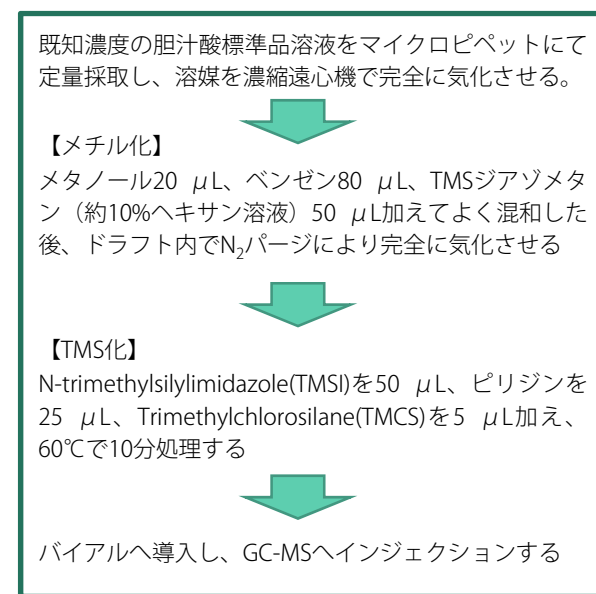


図3 胆汁酸の誘導体化プロトコル

#### ■誘導体化した胆汁酸の測定

上記の内容で誘導体化した胆汁酸をGC-MSで分析しました。分析条件を以下に示します。

表1 測定条件

GC-MS	: GCMS-QP™2020 NX
分析カラム	: DB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 $\mu$ m)
<b>- GC -</b>	
注入モード	: Splitless
気化室温度	: 310 °C
カラムオープン温度	: 230 °C (2 min) → (8 °C /min) → 310 °C (5 min)
制御モード	: 線速度 (45.3 cm/sec)
パージ流量	: 3.0 mL/min
<b>- MS -</b>	
測定モード	: スキャンまたはSIM (スキャンレンジ: $m/z$ 35 - 700)
イオン源温度	: 200 °C
インターフェース温度	: 280 °C
イベント時間	: 0.3 sec

## ■ 定量精度の確認

胆汁酸22種類の標準品各8 μgに先述の前処理を行い、スクリーンモードにてGC-MS分析を行いました。図4にCholic acidのピークを示します。

各胆汁酸の保持時間とマススペクトルを確認した後、胆汁酸22種類の標準品混合物0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500 ngに関して上述と同様に処理してSIM分析を行い、Cholic acid-d5を内部標準として、内部標準法による検量線を作成しました。検量線を図5に示します。各胆汁酸のダイナミックレンジおよび直線性は表2の通りでした。一つの標準品から複数のピークが検出された化合物に関しては、各ピークをカッコ付きの数字で示しました。またダイナミックレンジ内の最小濃度での、n = 3における再現性も表2に示しました。

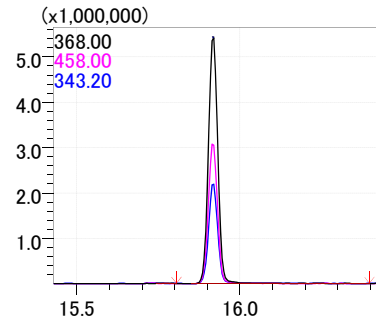


図4 Cholic acid 8 μgのマスキクロマトグラム

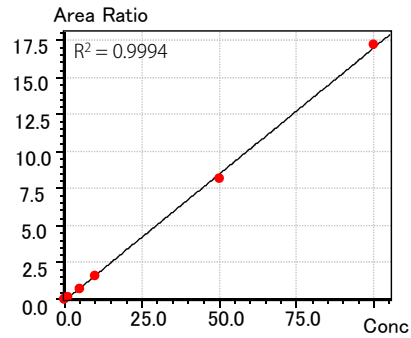


図5 Cholic acid の検量線

## ■ サンプルの安定性の検証

胆汁酸22種類の標準品各8 μgに先述の前処理を行い、最初の分析を行ってから20時間後に再度分析を行いました。その時のピークの相対強度（最初の分析時のピーク強度との比）を表2の「20時間後のピーク面積の相対値」列に示しました。全ての胆汁酸ピークで、70% - 120%の良好な再現性を示しました。また、38時間後にも同様に分析を行ったところ、いくつかの胆汁酸ではピーク面積値が減少傾向を示しましたが、それ以外の多くの胆汁酸では安定的に測定が可能でした。

表2 22胆汁酸の測定結果

胆汁酸名	CAS No.	定量 m/z	確認 m/z	ダイナミック レンジ (ng)	直線性 (R <sup>2</sup> )	n = 3の 再現性 (%RSD)	20時間後の ピーク 面積の相 対値	38時間後の ピーク 面積の相 対値
Cholic acid	81-25-4	368.0	458.0	0.1 - 100	0.999	6.65	0.984	1.011
Chenodeoxycholic acid	474-25-9	370.0	355.0	0.5 - 100	0.999	4.71	0.949	0.920
Ursodeoxycholic acid	128-13-2	460.0	370.0	0.5 - 500	0.999	2.24	1.206	0.924
Deoxycholic acid	302-95-4	255.0	370.0	0.5 - 100	0.999	6.11	0.980	0.714
Lithocholic acid	434-13-9	372.0	357.0	1 - 500	0.999	7.66	0.991	0.750
Hyocholic acid	547-75-1	458.0	369.0	0.1 - 100	0.999	5.51	1.036	1.035
3-oxocholic acid_(1)	2304-89-4	546.0	341.0	1 - 500	0.999	7.95	0.848	0.575
3-oxocholic acid_(2)	2304-89-4	269.0	384.0	0.5 - 500	0.999	2.36	0.914	0.714
7-oxodeoxycholic acid	911-40-0	341.0	359.0	1 - 500	0.999	5.51	1.029	1.053
7-oxolithocholic acid	4651-67-6	293.2	353.25	5 - 500	0.998	8.89	0.817	0.920
Ursolic acid	2955-27-3	253.0	343.0	0.5 - 100	0.999	5.52	1.019	0.840
3-oxodeoxycholic acid_(1)	4185-01-7	548.0	343.0	5 - 500	0.999	4.27	0.959	0.645
3-oxodeoxycholic acid_(2)	4185-01-7	548.0	343.0	10 - 500	0.999	12.39	0.930	0.633
3-oxodeoxycholic acid_(3)	4185-01-7	271.0	253.0	5 - 500	0.999	8.20	1.043	0.867
3-oxolithocholic acid_(1)	1553-56-6	460.0	431.0	5 - 500	0.999	5.43	0.959	0.924
3-oxolithocholic acid_(2)	1553-56-6	460.0	431.0	10 - 500	0.997	7.97	0.720	0.481
3-oxolithocholic acid_(3)	1553-56-6	273.0	318.0	5 - 500	0.999	3.08	0.885	0.809
Hyodeoxycholic acid	83-49-8	370.0	255.0	0.5 - 500	0.999	6.44	1.139	0.860
3β-hydroxy-5-cholenoic acid	5255-17-4	331.0	370.0	5 - 500	0.999	3.95	0.993	0.927
α-muricholic acid	2393-58-0	458.0	443.0	5 - 500	0.999	5.09	1.027	0.834
β-muricholic acid	2393-59-1	285.0	458.0	0.5 - 500	0.998	7.21	0.866	1.033
ω-muricholic acid	6830-03-1	285.0	369.0	0.5 - 500	0.999	4.49	0.842	0.882
Phoenodeoxycholic acid	566-17-6	255.0	370.0	0.5 - 500	0.999	5.48	0.977	0.962
Isolithocholic acid	1534-35-6	372.0	215.0	1 - 500	0.999	2.38	1.051	0.920
Alloisolithocholic acid	2276-93-9	372.0	447.0	5 - 500	0.999	4.35	1.080	1.033
12-oxolithocholic acid	5130-29-0	476.0	386.0	5 - 500	0.998	8.51	0.769	0.937
isodeoxycholic acid	570-63-8	255.0	345.0	0.5 - 500	0.999	0.68	0.952	0.623

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。GCMS-QPIは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。