

Application News

No. C232

LC/MS

トリプル四重極質量分析計による ヒト血漿中の胆汁酸プロファイリング

胆汁酸はコレステロールの異化作用により肝臓で生成され、タウリンやグリシンと抱合することによって一次胆汁酸へと合成されます。また、腸内細菌の影響により一部の一次胆汁酸から二次胆汁酸が生成されます。

これらの胆汁酸は界面活性剤として脂質の吸収を促進することや、代謝経路を制限する役割を担っています。

肝疾患の早期診断や機能評価のために、血中の酵素活性検査（ALT、AST など）や総胆汁酸量検査が広く行われています。しかし、総胆汁酸量の評価で肝機能の低下を確認することは可能ですが、疾患の特定には他の検査が必要です。したがって、胆汁酸代謝異常をはじめとする各疾患の特定を合わせて行うために、総胆汁酸量のみならず、一次胆汁酸を中心に各種胆汁酸の一斉分析が求められています。

胆汁酸は化合物の構造上、トリプル四重極質量分析計でフラグメントイオンを生成することが難しいものが多く、また正確な定性・定量を行うためには最適な LC 条件を用いて完全に分離する必要があります。したがって、正確な同定と定量には良好なクロマトグラフィー分離が必要です。

ここでは、28 種類の胆汁酸と 10 種類の内部標準に対して、液体クロマトグラフィーとトリプル四重極質量分析の条件を最適化した「LC/MS/MS メソッドパッケージ 胆汁酸」を用いてヒト血漿を分析した事例をご紹介します。

M. Levi, A. Kunisawa

■ 前処理

ヒト血漿試料は匿名の健常者のものを用いました。50 μ L の血漿を 10 μ L の内部標準液（メタノール中 10 μ mol/L）と混合しました。次に、30 μ L の塩酸水溶液（1 mol/L）、次いで 1000 μ L のアセトニトリルを添加しました。約 1 分間ボルテックスミキサーで撹拌後、試料を 14000 G で 15 分間遠心分離しました。その後、上清 850 μ L を別のマイクロチューブに移し、真空濃縮器で蒸発乾固しました。最後に、100 μ L のメタノールで再溶解させた溶液を 10 分間超音波処理し、14000 G で 15 分間遠心分離した後、ガラスインサート有するバイアルに移して分析に供しました。



図 1 LC/MS/MS メソッドパッケージ 胆汁酸
および LCMS™-8060 システム

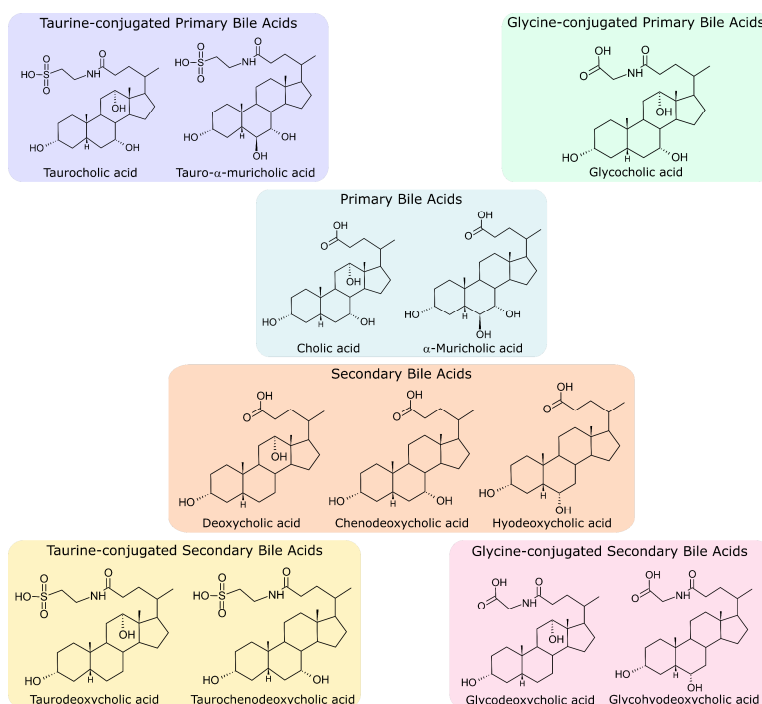


図 2 代表的な胆汁酸の構造

■ 分析条件

処理済みの血漿を表 1 に示す条件で分析しました。本分析には、「LC/MS/MS メソッドパッケージ 胆汁酸*1」および LCMS-8060 を用いました。定量には安定同位体希釈法を用いました。

本手法では、主要な一次胆汁酸、二次胆汁酸およびそれらの抱合体 28 成分をわずか 17 分で分析できます。また、最適化済みの胆汁酸およびその抱合体の MS/MS 条件を採用しており、最大 3 個の MRM トランジションを設定しています。さらに、MS/MS 条件が最適化された安定同位体 10 成分を内部標準物質として登録しており、高い定量精度が得られます。

表 1 分析条件

UHPLC (Nexera™ X2 system)	
Column	: Shim-pack™ G-BA C18*2
Mobile phase	: A) Acetic acid in water B) Acetonitrile/Methanol
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.3 mL/min
Column temp.	: 40 °C
MS (LCMS™-8060)	
Ionization	: ESI (negative mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

*1 : P/N S225-38610-91

*2 : P/N 227-30815-01

■ 分析結果

表 2 に示すとおり、ヒト血漿からは合計で 15 種類の胆汁酸が検出されました。その内、一次胆汁酸は 1 成分、二次胆汁酸は 3 成分、抱合胆汁酸であるタウリン共役二次胆汁酸は 6 成分、グリシン共役二次胆汁酸は 5 成分でした。また、胆汁酸分析により得られたクロマトグラムを図 3 に、各成分の定量結果から算出した胆汁酸濃度を図 4 に示します。

表 2 ヒト血漿中の胆汁酸分析結果から検出された成分

成分名	略称	濃度 (pmol/mL)
Tauro-β-muricholic acid	TβMCA	4.28
Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA	3.86
Taurocholic acid	TCA	18.8
Taurochenodeoxycholic acid	TCDCa	82.6
Taurodeoxycholic acid	TDCA	41.1
Taurolithocholic acid	TLCA	8.58
Glycocholic acid	GCA	116
Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA	241
Glycochenodeoxycholic acid	GCDCA	792
Cholic acid	CA	131
Glycodeoxycholic acid	GDCA	135
Ursodeoxycholic acid	UDCA	58.7
Chenodeoxycholic acid	CDCA	334
Deoxycholic acid	DCA	599
Glycolithocholic acid	GLCA	119

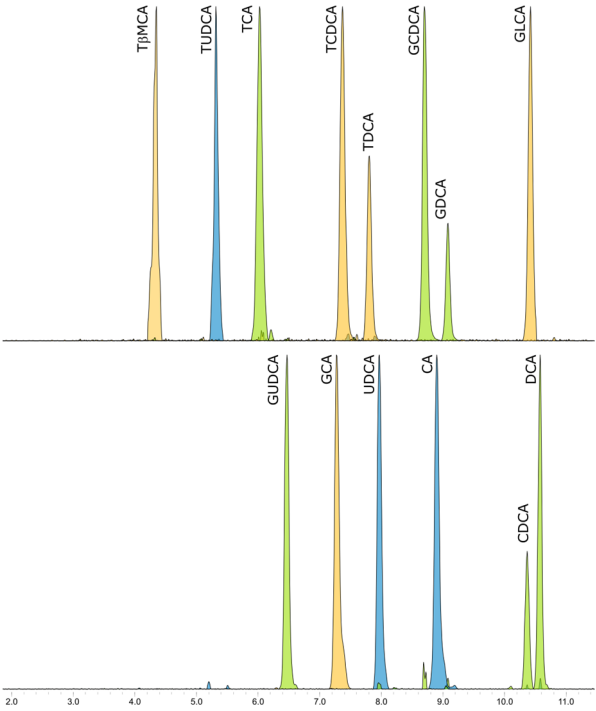


図 3 ヒト血漿の胆汁酸分析で得られたマスキロマトグラム

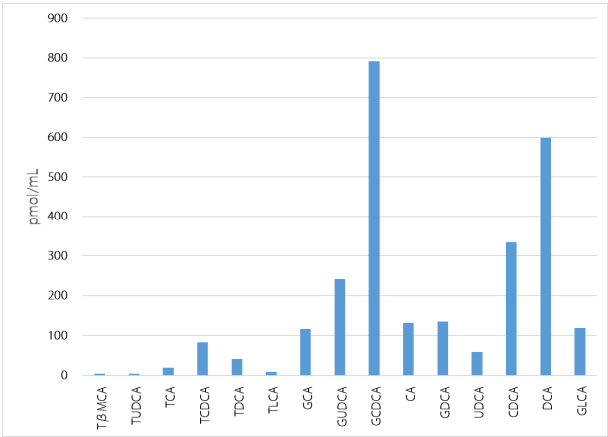


図 4 ヒト血漿中の胆汁酸分析結果から算出した濃度 (グラフ)

■ まとめ

このように、高感度かつ網羅的分析が可能な LC-MS/MS および「LC/MS/MS メソッドパッケージ 胆汁酸」を用いることで、ヒト血漿試料中の胆汁酸を迅速に検出、定量できることが示唆されました。

したがって本手法は今後、腸内細菌分野や、臨床研究段階における病理学分野などへの展開が期待されます。

<謝辞>

本稿の作成には、九州大学生体防御医学研究所トランスオミクス医学研究センター 馬場健史教授、和泉自泰准教授より多大なご協力を賜りました。

LCMS、LabSolutions、Nexera、および Shim-pack 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：2020 年 9 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。