

自動抽出装置を使った血漿、尿、糞便サンプルの胆汁酸39種類の迅速プロファイリング

Jaffuel Aurore、國澤 研大、堀江 征司、渡辺 淳

ユーザーベネフィット

- ◆ 胆汁酸の種類之多さと迅速性を両立した定量メソッドです。
- ◆ 血漿、尿および糞便の全自動前処理と組み合わせ、簡便に多検体の高感度測定が可能です。

■はじめに

胆汁酸は小腸における脂肪の吸収に重要な役割を果たすほか、コレステロールから胆汁酸への変換を介して、コレステロール代謝の調節に関与していると言われています。一次胆汁酸は肝臓でコレステロールの異化作用により産生され、その多くはタウリンまたはグリシンと結合し抱合胆汁酸になります。一部の一次胆汁酸は腸内細菌によってさらに修飾され、二次胆汁酸が産生されます。

ヒト末梢血中の総胆汁酸濃度は、肝機能障害のマーカーとして知られており、血液酵素活性（ALT、AST等）とあわせて幅広く実施されています。一方、複数の胆汁酸を個別に測定した方が多彩な肝障害を鑑別できる可能性があるため、多種類の胆汁酸の一斉分析が注目を集めています。

しかし、胆汁酸の基本骨格であるコラン酸構造はMS/MSで壊れにくく、構造の違いに特異的なフラグメントイオンを測定することが困難です。化学的に類似した多様な胆汁酸を、LC/MS/MSによる一斉分析で正確に定量するためには、異性体をHPLCで十分に分離しなければならないという課題があります。

本稿では、生体試料（ヒト血漿、ヒト尿およびマウス糞便）中の39種の胆汁酸を、10種の内部標準物質を用いて定量分析しました。分析にはLC/MS/MSメソッドパッケージ胆汁酸Ver.2を用いました。本パッケージには、LC/MS/MSでの分析のための最適化された条件、ならびに自動化試料調製プロトコルが含まれています。HPLC条件を厳密に最適化したことにより、従来困難であった胆汁酸の分離とスループット・高感度を両立することができました。

■前処理

前処理は、メソッドパッケージに含まれるサンプル調製プロトコルに従いました（図1）。この前処理法ではBiotage® Extraheraを使用し、96の生体試料を合計45分（1サンプル当たり0.5分）で同時に処理することができます。手動で同じサンプル数を前処理すると、約3時間必要であるため、この方法では4倍の高速化が可能です。また、少ないマンパワーで再現性が高く、低コストであるという利点もあります。

マウスの糞便試料の場合には、腸管内で生成される胆汁酸の硫酸エステルおよびグルクロン酸抱合体から、胆汁酸を遊離させるため、最初に加水分解を行います。糞便5~10mgに水酸化カリウムを加え、80℃で20分間インキュベートし、リン酸カリウム緩衝液を用いてpHを下げて自動抽出用サンプルとしました。血漿、尿および加水分解糞便いずれのサンプルについても、250µLを抽出に使用しました。抽出用プレートにはEvolute Express ABN 30 mg 96ウェルプレート（Biotage®）を、抽出溶媒にはギ酸を添加した水とメタノールを使用しました。

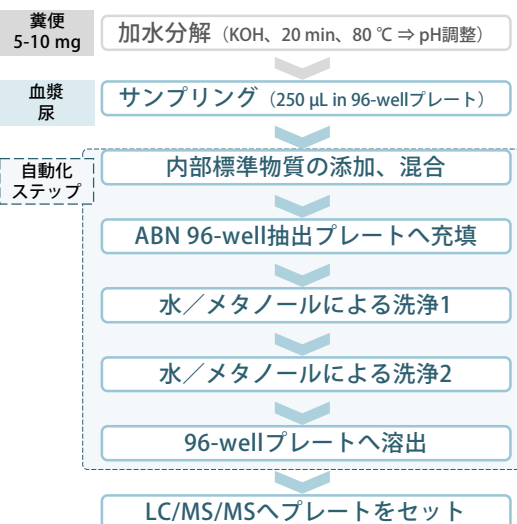
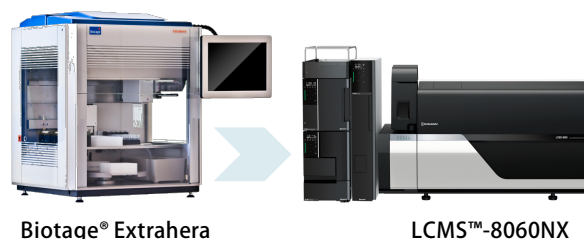


図1 前処理プロトコル（血漿、尿、糞便）

■分析条件

前処理した試料を、LC/MS/MSメソッドパッケージ胆汁酸Ver.2収録のメソッドファイルを使用し、Nexera™ X2 UHPLC、LCMS-8060NXのシステムで分析しました。分析条件の詳細を表1に、登録化合物を表2に示します。標準物質として39種の一次、二次および抱合胆汁酸と、高い定量精度を達成するために10種の内部標準物質（安定同位体標識化合物；Alsachim、一次、二次胆汁酸、タウリン抱合体およびグリシン抱合体を含む）を用意しました。分析コストをさげるために、内部標準物質は10種に減らしています。異性体間の分離を良好に維持しながら高速分析化を行い、質量分析の測定時間は10分としました。図2に、胆汁酸異性体ごとのMRMクロマトグラムの例を示します。

検量線

0.5~50 ng/mLの範囲に標準溶液を6濃度用意し、測定結果より回帰式を求めました。ピーク面積は、LabSolutions Insightソフトウェアを用いて自動計算により決定しました（手動による再計算は行っていません）。検量線の例を図3に示します。すべての標準溶液において正確さは80~120%を示しました（図4）。

表1 分析条件

UHPLC (Nexera X2 system)	
Column	ACE Excel C18 Amide (ADVANCED CHROMATOGRAPHY TECHNOLOGIES LTD)
Mobile phase	Aqueous : Formic acid in Water Organic : Acetonitrile / Methanol
LC run time (MS time)	10.95 min (10 min)
Flow rate	0.65 mL/min
Column temperature	45 °C
MS TQ (LCMS-8060NX)	
Ionization	Ion Focus ESI (Negative)
Mode	MRM
Nebulizing gas flow	3.0 L/min
Drying gas flow	5.0 L/min
Heating gas flow	15.0 L/min
DL temperature	250 °C
Heat Block temperature	500 °C
Interface temperature	400 °C

表2 メソッドパッケージで測定可能な39種の胆汁酸

化合物名	略称
Tauro- ω -muricholic acid	ToMCA
Tauro- α -muricholic acid	TaMCA
Tauro- β -muricholic acid	TbMCA
7,12-Diketolithocholic acid	7,12-DiketoLCA
Dehydrocholic acid	DHCA
Taurohyocholic acid	THCA
Ursocholic acid	UCA
Glycohyocholic acid	GHCA
Glycocholic acid	GCA
7-Ketodeoxycholic acid	7-KetoDCA
Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA
Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA
ω -Muricholic acid	oMCA
Norcholic acid	NorCA
Taurohyodeoxycholic acid	THDCA
Taurocholic acid	TCA
Glycohyodeoxycholic acid	GHDC
α -Muricholic acid	aMCA
Norursodeoxycholic acid	NorUDCA
β -Muricholic acid	bMCA
3-Ketocholic acid	3-KetoCA
Cholic acid	CA
Glycochenodeoxycholic acid	GCDCA
Ursodeoxycholic acid	UDCA
Glycodeoxycholic acid	GDCA
Taurochenodeoxycholic acid	TCDC
Hyodeoxycholic acid	HDCA
7-Ketolithocholic acid	7-KetoLCA
Taurodeoxycholic acid	TDCA
12-Ketodeoxycholic acid	12-KetoLCA
Allochenodeoxycholic acid	AlloCDCA
Apochoic acid	ApoCA
Chenodeoxycholic acid	CDCA
Deoxycholic acid	DCA
Glycolithocholic acid	GLCA
Taurolithocholic acid	TLCA
Dehydrolithocholic acid	DHLCA
Lithocholic acid	LCA
Allolithocholic acid	AlloLCA

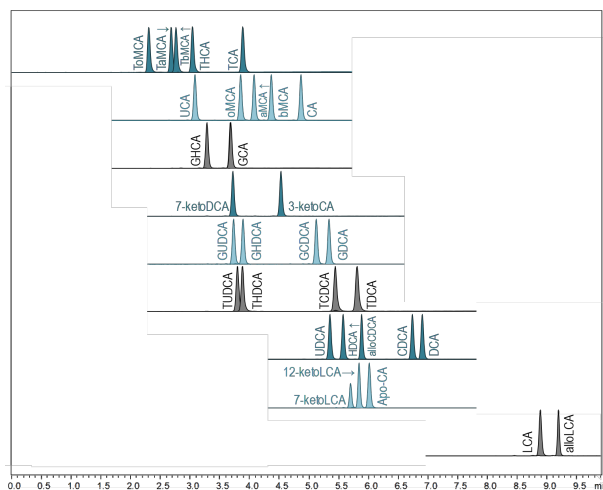


図2 胆汁酸異性体 (標準溶液10 ng/mL) の MRMクロマトグラムの例

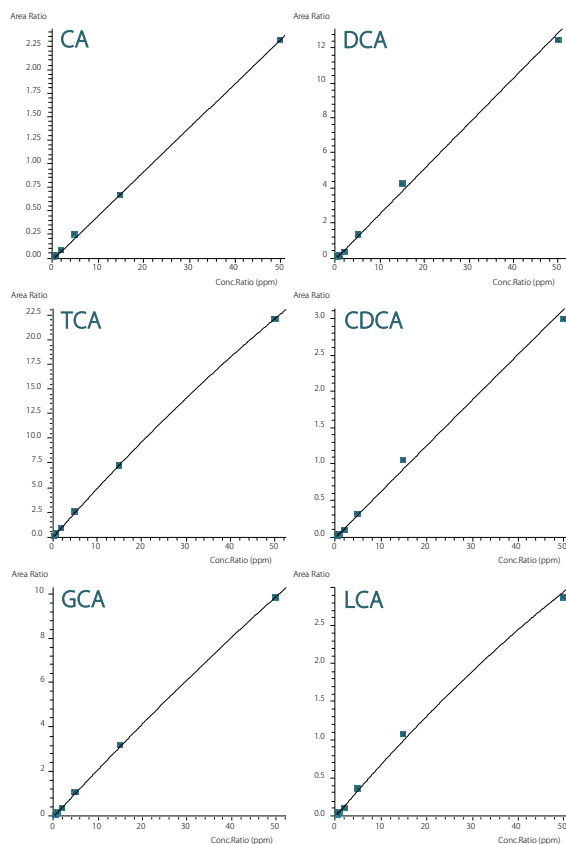


図3 検量線 (0.5-50 ng/mL) の例

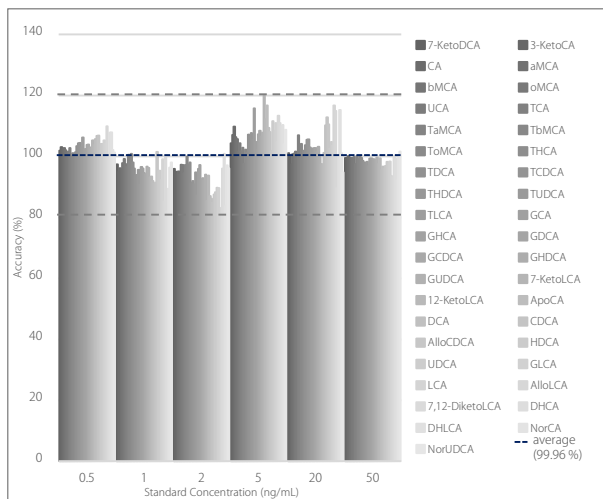


図4 標準溶液の正確さ

■ 分析結果

生体試料に標準物質を添加して分析を行うことで、本分析手法の評価を行いました。試料には、血漿（ヒト）、尿（ヒト）、糞便（マウス）を用いました。血漿および尿には10 ng/mL、糞便には2.3 ng/mgの標準物質を添加しました（検出濃度は内因性濃度に添加濃度が加算される形になります）。非添加試料（ブランク）についても分析しました。分析の精度は、添加ありの血漿試料の保持時間および面積を用いて確認しました。近接するピークとの分離をチェックし、すべての胆汁酸について1.1以上の分離度であることを確認しました（データの記載なし）。最後に、各サンプルの胆汁酸濃度を測定しました。

再現性

同じ血漿試料（標準物質10 ng/mL添加）を用いて、同日内に同一の条件で5回の前処理によりサンプルを調製しLC/MSで測定する実験を、3日間で4回行いました。この結果より、実験内での再現性（併行精度）と実験間での再現性（室内精度）を、分散分析法を用いて評価しました。保持時間の併行精度はRSD<0.4 %、室内精度はRSD<0.5 %と良好でした。面積の併行精度はRSD<12 %、室内精度はRSD<20 %となり、いずれも良好な結果が得られました（表3）。

表3 併行精度 (n=5) と室内精度 (n=4) の評価

	各実験ごとの全胆汁酸に対する再現性					
	再現性実験1			再現性実験2		
	RSD (n=5, %)			RSD (n=5, %)		
	Min.	Max.	Av.	Min.	Max.	Av.
Ret. Time	0.02 %	0.33 %	0.07 %	0.05 %	0.49 %	0.18 %
Peak Area	1.23 %	13.3 %	6.4 %	1.1 %	13.5 %	6.2 %

	再現性実験3			再現性実験4		
	RSD (n=5, %)			RSD (n=5, %)		
	Min.	Max.	Av.	Min.	Max.	Av.
Ret. Time	0.04 %	0.29 %	0.15 %	0.02 %	0.34 %	0.11 %
Peak Area	1.3 %	13.1 %	7.3 %	1.7 %	13.1 %	6.4 %

分散分析による併行精度と室内精度の評価結果

併行精度	室内精度
RT RSD < 0.4 %	RT RSD < 0.5 %
Area RSD < 12 %	Area RSD < 20 %

※胆汁酸ごとに分散分析を実施

定量分析

血漿、尿および糞便中の胆汁酸を定量しました。標準添加法を定量分析の参照法として用い、(i) 内部キャリブレーション法（10 ng/mL水溶液中での内部標準物質との比を用いた一点検量）と(ii) 直接同位体希釈法（内部標準物質との比率による直接定量）の2つの定量方法を評価しました。

10種の内部標準物質（安定同位体）が39種の胆汁酸の定量に使用されるため、すべての胆汁酸が化学的に同等な同位体標識化合物によって補正されるわけではありません。対象化合物と内部標準物質の抽出回収率が異なる場合は補正のための係数を適用する必要があるため、内部標準物質回収率と標的化合物回収率の比率を感度係数として算出しています。感度係数の値はマトリックスに依存します。代表的な感度係数はLC/MS/MSメソッドパッケージ胆汁酸 Ver. 2の取扱説明書に記載されています。これらの係数を以下の計算に用いました。

内部キャリブレーション法による定量を、ブランク試料（内因性胆汁酸が検出された場合）と添加試料の両方に適用しました。血漿サンプル（添加なし）のクロマトグラムの例を図5に、すべてのブランクマトリックス中で計算された各種胆汁酸濃度の比較を図6に示します。さらに、標準添加法を基準とした正確さを表4に詳述します。

すべての胆汁酸化合物について、添加なしおよび添加試料の両方で優れた定量結果が得られました。正確さは、糞便では80~120 %（図7）、尿では82~119 %（図8）、血漿では82~119 %（図9）となりました。この定量法は本法に含まれる39種の胆汁酸の定量に適していることが確認できました。

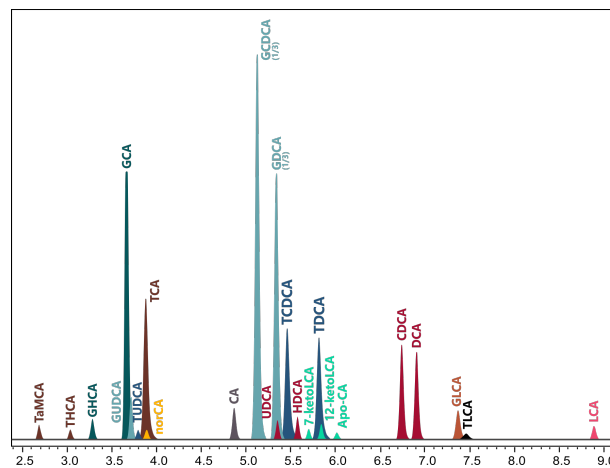


図5 ヒト血漿サンプル（未添加）のクロマトグラム例
定量結果は表3に詳しく記載しました。

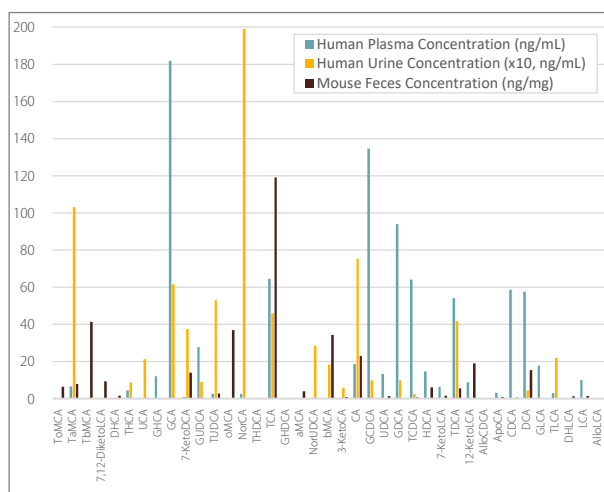


図6 各種胆汁酸の定量結果（血漿、尿、糞便）
未添加サンプルより内部キャリブレーション法にて算出しました。

直接同位体希釈法による定量を、ブランク試料（内因性胆汁酸が検出された場合）と添加試料の両方に適用しました。このアプローチの主な利点は、較正が不要であることです。濃度は、試料に添加された内部標準と標的化合物との間の面積比により計算されます。内部標準物質が化学的に同一な同位体標識化合物ではない場合、同じ濃度でのMSでの応答に差が生じるため、感度係数を用いてその補正を行いました（感度係数に関する情報は島津製作所より提供可能です）。

すべての胆汁酸について、添加なしと添加試料の両方で優れた定量性が得られました。正確さは、糞便では90~113 %（図10）、尿では84~118 %（図11）、血漿では81~120 %（図12）となりました。この定量法も本法に含まれる39種の胆汁酸の定量に適していることが確認できました。

表4 各種胆汁酸の定量結果と正確さ
未添加サンプル（血漿、尿、糞便）を内部キャリブレーション法で定量し、標準添加法の定量結果を元に正確さを算出しました。

Compound Abbreviation	Plasma Unspiked Conc. (ng/mL)	Unspiked Accuracy (%)	Urine Unspiked Conc. (ng/mL)	Unspiked Accuracy (%)	Feces Unspiked Conc. (ng/mg)	Unspiked Accuracy (%)
ToMCA	ND	N/A	ND	N/A	6.5	84%
TaMCA	6.6	84%	10.3	84%	8.1	80%
TbMCA	ND	N/A	ND	N/A	41.4	N/A*
7,12-DiketoLCA	ND	N/A	ND	N/A	9.4	95%
DHCA	ND	N/A	ND	N/A	1.7	88%
THCA	4.6	89%	0.9	98%	ND	N/A
UCA	ND	N/A	2.1	101%	ND	N/A
GHCA	12.2	97%	ND	N/A	ND	N/A
GCA	181.8	N/A*	6.2	105%	0.2	99%
7-KetoDCA	1.0	104%	3.7	93%	14.0	81%
GUdCA	27.8	116%	0.9	101%	0.0	100%
TUDCA	2.6	106%	5.3	97%	2.8	100%
oMCA	ND	N/A	ND	N/A	36.9	N/A*
NorCA	2.7	99%	19.9	101%	0.1	98%
THDCA	ND	N/A	ND	N/A	0.3	101%
TCA	64.5	82%	4.6	87%	119.0	N/A*
GHdCA	ND	N/A	ND	N/A	ND	N/A
aMCA	ND	N/A	ND	N/A	4.0	83%
NorUDCA	ND	N/A	2.9	97%	ND	N/A
bMCA	ND	N/A	1.8	82%	34.4	N/A*
3-KetoCA	0.2	104%	0.6	105%	0.9	96%
CA	18.7	101%	7.5	110%	23.0	N/A*
GCdCA	673.5	N/A*	1.0	102%	ND	N/A
UDCA	13.4	104%	ND	N/A	1.4	100%
GDCA	470.2	N/A*	1.0	118%	0.1	116%
TCdCA	64.2	99%	0.3	115%	0.8	98%
HDCA	14.7	102%	ND	N/A	6.1	108%
7-KetoLCA	6.4	111%	ND	N/A	1.6	98%
TDCA	54.2	97%	4.2	100%	5.6	95%
12-KetoLCA	8.9	107%	ND	N/A	19.0	103%
AlloCDCA	ND	N/A	ND	N/A	ND	N/A
ApoCA	3.2	106%	ND	N/A	0.9	95%
CDCA	58.6	108%	ND	N/A	0.7	118%
DCA	57.6	116%	0.4	117%	15.5	120%
GLCA	17.9	119%	ND	N/A	ND	N/A
TLCA	3.0	114%	2.2	119%	0.3	120%
DHLCA	ND	N/A	ND	N/A	1.2	97%
LCA	10.0	116%	ND	N/A	1.4	104%
AlloLCA	ND	N/A	ND	N/A	ND	N/A

* 内因性の濃度に対して添加濃度が低すぎる（1/10以下）ため、標準添加法による定量結果の信頼性が乏しく、正確さの計算を実施できませんでした。

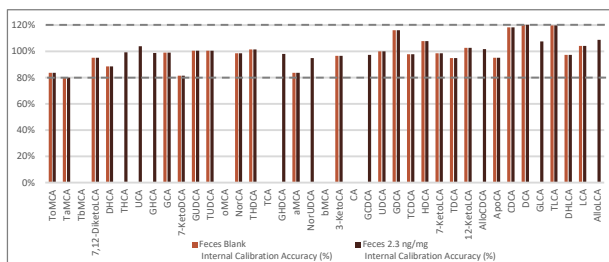


図7 糞便の内部キャリブレーション法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出しました。

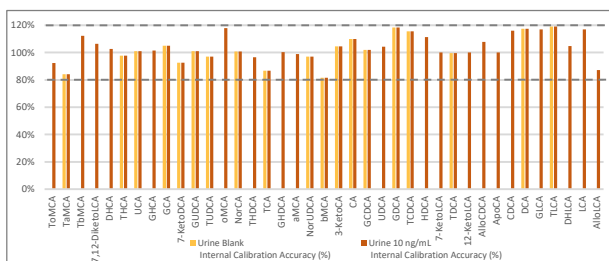


図8 尿の内部キャリブレーション法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出しました。

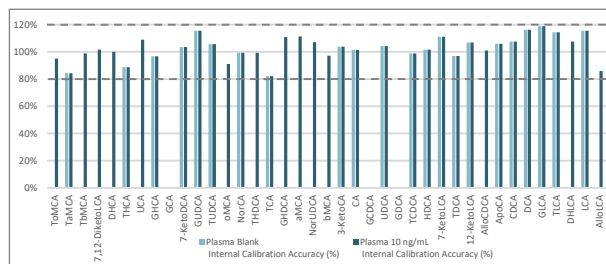


図9 血漿の内部キャリブレーション法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出しました。

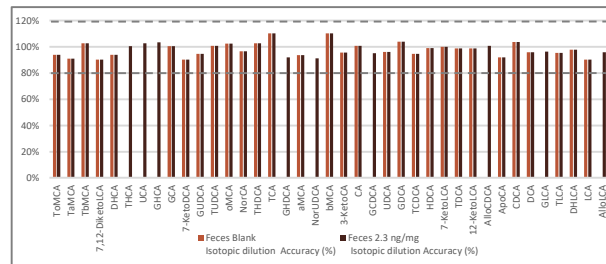


図10 糞便の直接同位体希釈法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出しました。

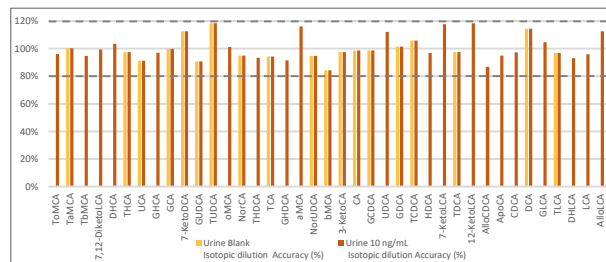


図11 尿の直接同位体希釈法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出しました。

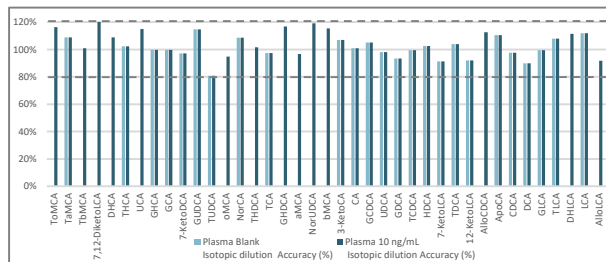


図12 血漿の直接同位体希釈法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出しました。

内部キャリブレーション法と直接同位体希釈法の二つの定量手法は、標準添加法との相関も非常に良好であり（図13）、どちらも本法に含まれる39種の胆汁酸の定量に適していることが示されました。

前述したように、直接同位体希釈法では、較正を必要としないという主な利点がありますが、この手法を用いる場合には、優れた定量の正確さを保証するために、内部標準と標的化合物の応答性が同程度であることが重要となります。しかしながらこの実験ではその許容範囲はかなり広く、内部標準物質のMS応答性が標的化合物の応答性の1/3から80倍の間に広がっているものの、優れた正確さを示しました。

結論として、適切に設計された内部標準物質の混合物を用いれば、直接同位体希釈法は、生体試料を用いた胆汁酸のLC/MS/MSによる定量におけるゴールドスタンダード法になると考えられます。

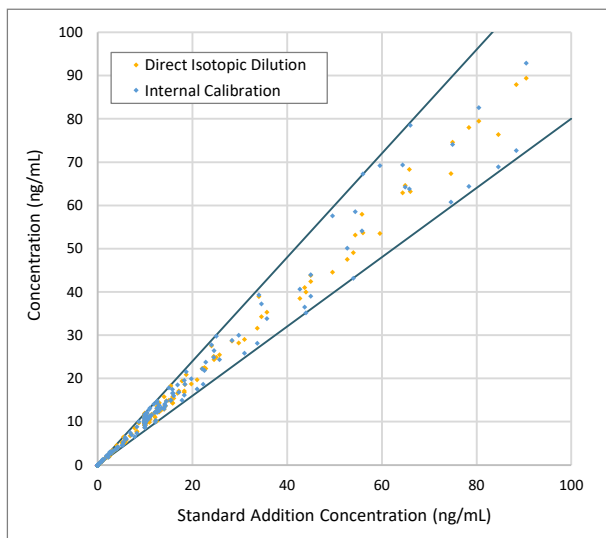


図 13 内部キャリブレーション法および直接同位体希釈法と標準添加法との相関図

X軸：標準添加法による算出濃度

Y軸：内部キャリブレーション法および直接同位体希釈法による算出濃度

■まとめ

本稿では、LC/MS/MSメソッドパッケージ胆汁酸Ver. 2が血漿、尿及び糞便のような生体試料中の一次、二次および抱合体を含む39種の胆汁酸の分析に適していることが示されました。また、自動抽出装置により、一度に96サンプルを処理することができ、10分という短い分析時間で異性体を分離して検出することができました。このように、本メソッドパッケージは高速LC/MS/MS法と自動試料抽出の組み合わせにより、高いスループットと低コストで頑健な胆汁酸のルーチン分析を提供いたします。

LCMSおよびNexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社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

01-00196-JP 初版発行：2021年 8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文中に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。
最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021