

全自動LCMS前処理装置 CLAM™-2030  
高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMSTM-8060

## 全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによるヒト血漿中コリンおよび代謝物の測定

井本 英志、川上 大輔

### ユーザーベネフィット

- ◆ 生体試料中のコリン、TMAおよびTMAOの定量分析を行うことができます。
- ◆ 煩雑な試料前処理を自動で行い、スループットを向上することができます。
- ◆ 前処理作業の属人性を排除し、手技による定量結果のバラツキを低減することができます。

### はじめに

食事で体内に摂取したコリンの一部は、腸内細菌によりトリメチルアミン (TMA) に代謝され、さらに肝臓内の酵素によりトリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) に代謝することが知られています。このTMAOは動脈硬化などの心血管疾患に関係していることや、心不全の予後予測に有用であること<sup>2)</sup>が報告されており、新たなバイオマーカーとして注目されています。

ここでは、生体試料の除タンパクや内部標準物質の添加を自動で行う全自動前処理装置付きLC/MS/MS (図1) を用いた、ヒト血漿中コリンおよびその代謝物の一斉分析系を紹介いたします。



図1 全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステム (CLAM™-2030+LCMSTM-8060)

### 血漿中コリンおよび代謝物の全自動前処理

CLAM-2030は採血管を直接システムにセットするだけで除タンパクなどの前処理を全自動で行います。図2にCLAM-2030を用いた前処理の工程を示します。LC/MS/MSによる分析と次の試料の前処理を並行して実行するため、1試料当たりの所要時間を大幅に短縮する事が可能です。本分析では血漿の前処理からLC/MS/MSによるコリンおよび代謝物の一斉分析まで1試料あたり約5分のサイクルタイムで行いました。

### 試料調製

水で段階希釈したコリン (1~1000 nmol/L)、TMA (10~1000 nmol/L)、TMAO (10~10000 nmol/L) の各標準試料を用いて、検量線を作成しました。水を用いてCholine-d13、TMA-d9、TMAO-d9をそれぞれ2 μmol/Lに調製し、ISTDとして用いました。市販のヒト血漿を用いて血漿中のコリン、TMA、TMAOの定量分析を行いました。これらの試料をCLAM-2030で前処理し、自動でLCMS-8060により分析し、検量線の作成およびヒト血漿の測定を行いました。

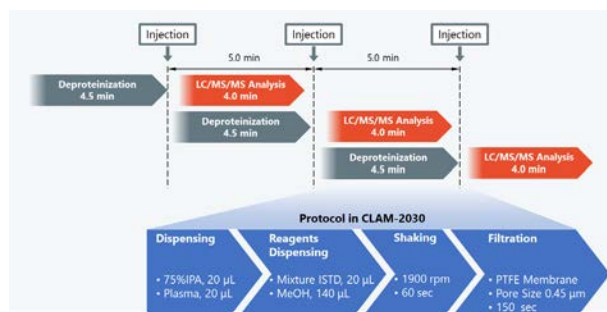


図2 CLAM-2030を用いたヒト血漿の前処理フロー

### 分析条件

HPLCとMSの分析条件を表1に示します。また各化合物のMRMトランジションを表2に示します。

表1 HPLCおよびMSの分析条件

Liquid chromatograph	
System	: Nexera™ X2
Column	: Shim-pack Velox HILIC P/N* 227-32025-02
Temperature	: 40 ° C
Injection volume	: 3 μL
Mobile phase A	: 50 mM ammonium formate +0.1% formic acid—Water
Mobile phase B	: Acetonitrile
Flow rate	: 0.4 mL/min
Gradient Program (B conc%)	: 70% (0.0 min) → 30% (2.40 min) → 5% (2.41 – 3.00 min) → 70% (3.41 – 4.00 min)
Mass spectrometer	
System	: LCMS-8060
Ionization	: ESI (Positive)
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp	: 250 ° C
Heat block temp	: 400 ° C
Interface temp	: OFF

\*島津ジーエルシー製品番号

表2 コリンおよび代謝物のMRMトランジション

化合物名	イオン	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
Choline	定量イオン	104.10	60.10
	確認イオン	104.10	45.10
TMA	定量イオン	60.20	44.15
	確認イオン	60.20	45.05
TMAO	定量イオン	76.00	58.20
	確認イオン	76.00	59.10
Choline-d13	定量イオン	117.25	66.05
TMA-d9	定量イオン	68.90	49.15
	確認イオン	68.90	51.15
TMAO-d9	定量イオン	85.20	66.00
	確認イオン	85.20	68.25

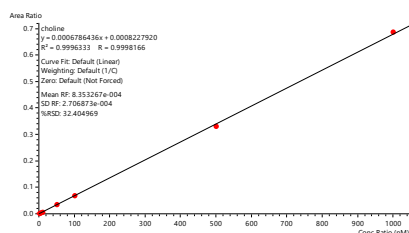
### ■ 検量線の直線性確認および再現性

検量線用標準試料を3回繰り返し測定し、直線性を確認しました。各化合物の検量線範囲、寄与率 (R<sup>2</sup>)、検量点最低濃度の再現性 (濃度%RSD) および正確さを表3に示します。また、図3に各化合物の検量線を、図4に標準試料における各化合物のマスクロマトグラムを示します。

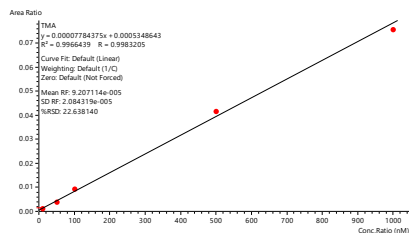
表3 標準試料の分析結果 (n=3)

化合物名	検量線範囲 (nmol/L)	寄与率 R <sup>2</sup>	濃度 %RSD	正確さ%
Choline	1-1000	0.999	14%	86%
TMA	10-1000	0.997	12%	95%
TMAO	10-10000	0.999	2%	96%

Choline



TMA



TMAO

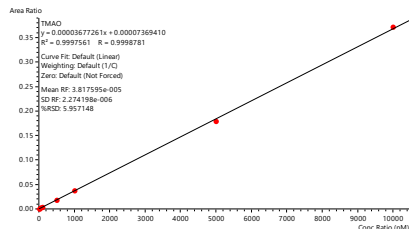


図3 各化合物の検量線、上段: コリン 1-1000 nmol/L、中段: TMA 10-1000 nmol/L、下段: TMAO 10-10000 nmol/L

Choline TMA TMAO

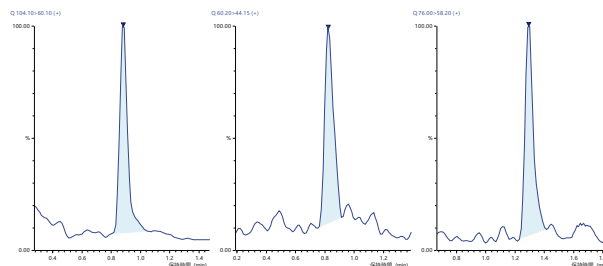


図4 標準試料における各化合物のマスクロマトグラム  
左: コリン (1 nmol/L)、中: TMA (10 nmol/L)、右: TMAO (10 nmol/L)

### ■ ヒト血漿中コリン、TMA、TMAOの測定

CLAM-2030で前処理したヒト血漿より得られたコリン、TMA、TMAOの測定濃度 (n=3) を表4に、各成分のマスクロマトグラムを図5に示します。ヒト血漿において良好な再現性を得ました。

表4 ヒト血漿の定量結果 (n=3)

化合物名	測定濃度 (nmol/L)	濃度 %RSD
Choline	938	2.8%
TMA	685	1.1%
TMAO	655	4.4%

Choline TMA TMAO

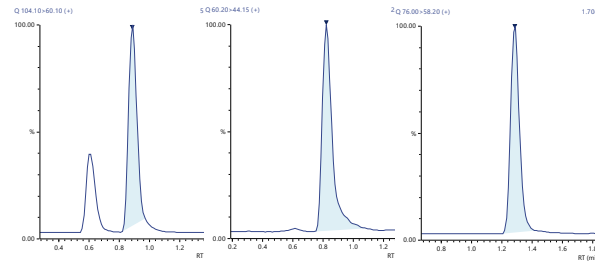


図5 ヒト血漿におけるコリン、TMA、TMAOのマスクロマトグラム

### ■ まとめ

生体試料の除タンパクや内部標準物質の添加を自動で行うCLAM-2030を用いて前処理し、LCMS-8060によるヒト血漿中コリン、TMA、TMAOの定量分析を行いました。各化合物において検量線は良好な直線性を示し、ヒト血漿において再現性に問題がないことから、本分析系の高い有用性が示されました。

#### <参考文献>

- 1) Wang Z, Stanley L Hazen et al., "Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease", *Nature* 472 (2011) 57-63.
- 2) Yazaki Y, Aizawa K et al., "Ethnic difference in association of outcomes with trimethylamine N-oxide in acute heart failure patients", *ESC Heart Fail* 7(5) (2020) 2373-2378.

#### <謝辞>

本資料における検討には自治医科大学付属病院 臨床薬理センター 相澤 健一先生より多大なご協力を頂きました。

LCMS、CLAM、Nexera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。