

トリプル四重極質量分析計を用いた
ヒト血漿中胆汁酸の測定

井本 英志、川上 大輔

ユーザーベネフィット

- ◆ 血漿に含まれる胆汁酸を網羅的に測定することができます。
- ◆ 装置のチューニングなどを実施せずに、長期間にわたって安定した分析が可能です。

■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¹⁾。肝臓でコレステロールの異化により、一次胆汁酸が産生され、多くはタウリンまたはグリシンと結合し、抱合胆汁酸が合成されます。一部の一次胆汁酸は、後に腸内細菌により修飾され、二次胆汁酸が産生されます。

ヒト抹消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) や総胆汁酸測定 (TBA) が広く実施されています。一方、複数の胆汁酸を個別にモニタリングすれば、多様な肝障害を識別できる可能性があるため、胆汁酸の一斉分析は注目を集めています。本稿では、ヒト血漿中22種の胆汁酸を9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」を用いました。本パッケージには、LC/MS/MSのために最適化されたLCやMSの各種設定条件が含まれています。装置は高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-8060 (図1) を用いました。



図1 高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMSTM-8060

■ヒト血漿中胆汁酸の前処理および測定条件

LC/MS/MSによる分析のための前処理プロトコルを図2に示します。定量分析は内部標準法で実施し、前処理に用いた内部標準物質を含むメタノール抽出液の構成を表2に示します。LC条件、MS条件およびMRM transitionの各パラメータ設定は「LC/MS/MS メソッドパッケージ 胆汁酸」(表1) に準じました。メタノールを用いて0.5, 1, 10, 100, 200, 500 nmol/Lに調製した試料を検量点サンプルとし、各胆汁酸の検量線を作成しました。

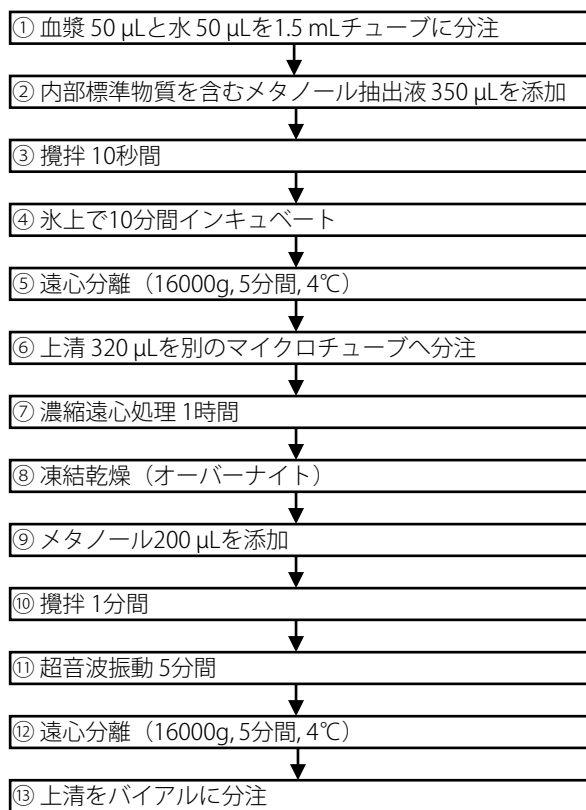


図2 ヒト血漿の前処理フロー

表1 LCおよびMSの分析条件

Liquid chromatograph	
System	: Nexera™ X2
Column	: Reversed-phase column
Mode	: Gradient elution
Injection volume	: 2 µL
Mobile phase A	: 0.05% acetic acid in Water
Mobile phase B	: Acetonitrile : Methanol=50 : 50
Flow rate	: 0.3 mL/min
Mass spectrometer	
System	: LCMSTM-8060
Ionization	: ESI (Negative)
Nebulizing gas	: 2 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp	: 250 °C
Heat block temp	: 400 °C
Interface temp	: 300 °C

表2 内部標準物質として用いた胆汁酸（9成分）

#	化合物名	略称	抽出液中濃度 (nmol/L)
1	D5_Taurocholic acid	D5_TCA	10
2	D4_Taurochenodeoxycholic acid	D4_TCDCA	10
3	D5_Taurolithocholic acid	D5_TLCA	1
4	D4_Glycocholic acid	D4_GCA	100
5	D4_Cholic acid	D4_CA	10
6	D4_Glycodeoxycholic acid	D4_GDCA	100
7	D4_Chenodeoxycholic acid	D4_CDCA	100
8	D4_Deoxycholic acid	D4_DCA	50
9	D4_Lithocholic acid	D4_LCA	10

■ 臨床検体およびQC検体の連続分析

本分析では、市販ヒト血漿をQC検体とし、QC検体を測定した後、臨床検体8本を測定する分析を繰り返し、1日の最後にもQC検体を分析しました。19日間の測定で、QC検体は34本、臨床検体は272本測定しました。表3にQC検体より検出した胆汁酸の一覧を示します。「LC/MS/MS メソッドパッケージ 胆汁酸」に含まれる22成分を検出しました。

QC検体を34本測定した際の各胆汁酸の濃度および濃度%RSDを表4に示します。GHDCAはピーク面積値が小さく、濃度%RSD 49.9%でしたが、その他の21成分については、濃度%RSD 2.8-12.4%と非常に安定した結果が得られました。また、ヒト血漿を測定した際のD4_TCDCA、D4_GCA、D4_CA、D5_TCAの面積値推移を図3に示します。測定を実施した19日間（計272検体）において、装置のチューニングや分析カラムの変更は実施していません。この連続測定において、各内部標準物質の面積値%RSDは4.9-6.0%を達成しました。これらの結果から、QC検体だけでなく、臨床検体においても安定した連続分析を実現する事が示されました。

表3 QC検体より検出した胆汁酸（22成分）

#	化合物名	略称
1	Tauro- ω -muricholic acid	TaMCA
2	Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA
3	Taurocholic acid	TCA
4	Taurochenodeoxycholic acid	TCDC
5	Taurodeoxycholic acid	TDCA
6	Taurolithocholic acid	TLCA
7	Glycocholic acid	GCA
8	Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA
9	Glycohyodeoxycholic acid	GHDCA
10	α -Muricholic acid	aMCA
11	7-Ketodeoxycholic acid	7keto_DCA
12	Glycochenodeoxycholic acid	GCDCA
13	Cholic acid	CA
14	Glycodeoxycholic acid	GDCA
15	Ursodeoxycholic acid	UDCA
16	Hyodeoxycholic acid	HDCA
17	7-Ketolithocholic acid	7keto_LCA
18	12-Ketolithocholic acid	12keto_LCA
19	Chenodeoxycholic acid	CDCA
20	Deoxycholic acid	DCA
21	Glycolithocholic acid	GLCA
22	Lithocholic acid	LCA

表4 QC検体に含まれる各胆汁酸の濃度 (nmol/L) と34回測定した際の各胆汁酸の濃度%RSD

化合物名 (略称)	濃度 (nmol/L)	濃度%RSD (n=34)
TaMCA	5.0	5.4
TUDCA	7.7	4.0
TCA	69.3	3.4
TCDC	161.1	2.8
TDCA	51.9	3.2
TLCA	2.3	8.5
GCA	507.7	4.0
GUDCA	203.7	3.7
GHDCA	3.7	49.9
aMCA	31.4	7.9
7keto_DCA	3.4	12.4
GCDCA	1890.2	3.5
CA	67.4	3.9
GDCA	497.1	3.2
UDCA	179.4	4.6
HDCA	53.5	5.0
7keto_LCA	18.7	6.3
12keto_LCA	14.3	8.1
CDCA	571.4	9.5
DCA	362.0	4.3
GLCA	29.5	3.8
LCA	23.0	9.5

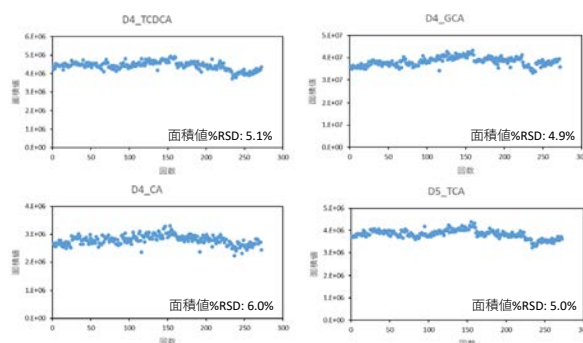


図3 19日間のヒト血漿繰り返し測定（272検体）における安定同位体4成分の面積値推移

■ まとめ

高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-8060を用いてヒト血漿中胆汁酸の一斉分析を行いました。QC検体を34本測定し、21成分の濃度%RSDは2.8-12.4%と非常に安定した結果が得られました。また、臨床検体を19日間（計272検体）測定し、D4_TCDCA、D4_GCA、D4_CA、D5_TCAの面積値%RSDは4.9-6.0%を達成しました。

■ 謝辞

本資料における検討には、兵庫医科大学 疾患オミクス解析学講座 特任講師 西海 信先生より多大なご協力をいただきました。

■ 参考文献

1) Takashi Nakanishi et.al., "Effect of a High-Fat Diet on the Small-Intestinal Environment and Mucosal Integrity in the Gut-Liver Axis", *Cells*. 2021, 10(11), 3168.

LCMSおよび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。

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

01-00263-JP 初版発行：2022年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書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。本文書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」、「®」を明記していません。

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, 2022