



# Agilent 6470トリプル四重極 LC/MS による胆汁酸 13 種の一斉分析



## <要旨>

代謝物および医薬品研究で注目を集めている胆汁酸の一斉分析を行いました。0.1~100 ng/mL の範囲で決定係数 0.999 以上の直線性を示す検量線を取得できました。実サンプルとしてヒト血清を用いて測定したところ、血清中の胆汁酸が検出できることが示されました。また、添加回収試験結果も良好（回収率 70-120 %）でした。

**Key Words:** 胆汁酸、Poroshell HPH、定量分析 LC/MS/MS

\*\*\*\*\*

## 1. はじめに

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、消化と脂肪の可溶化に重要な役割を担っています。最近の研究では、トリグリセリド、コレステロールおよびグルコース代謝を制御するシグナル伝達分子として機能する事もわかってきました。胆汁酸で制御されたシグナル伝達経路は、代謝疾患のための薬物標的としても利用されています。そのため、体内の胆汁酸プロファイルを設定する分析法が注目を集めています。

胆汁酸は、ステロイド骨格に水酸基の数と配向を変化させた構造をもっています。また、グリセロールとタウリンが結合した抱合体（抱合胆汁酸）も存在します。そのため、構造異性体が複数存在する複雑な化合物かつ、幅広い極性を有することがわかります。

本アプリケーションノートでは、13 種の代表的な胆汁酸の定量メソッドを開発しましたのでご報告いたします。検出は Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を使用しました。クロマトグラフィ分離は Agilent 1260 Infinity II LC システムを用いました。

## 2. 実験条件

LC および MS の分析条件は表 1 に示しました。すべての胆汁酸標準物質は 1 mg/mL の濃度となるようエタノールに溶解し調製しました。溶解後は -20 °C で保存し、使用時に 50 %メタノール水溶液で濃度調製し測定に用いました。

サンプルは標準ヒト血清 (ImmunoBioScience Corp. IHR-8140) を用いました。血清 100 μL とアセトニトリル 200 μL をフィルターカップ（ミリポア、ウルトラフリーMC）に入れよく攪拌したのち、5000 rpm で 5 分間遠心にかけて、そのまま分析に用いました。

表 1. LC/MS/MS 分析条件

| LC システム |  |
|---------|--|
| 移動相 A   | : 10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液   |
| 移動相 B   | : メタノール  |
| グラジェント  | : 50 %B (0 min) -> 100 %B (10 min)                               |
| 流速      | : 0.5 mL/min   |
| カラム     | : Agilent Poroshell HPH C18 2.7 μm (3.0 mm *100 mm) [695975-502] |
| カラム温度   | : 10 °C  |
| 注入量     | : 2 μL   |
| MS 検出器  |  |
| イオン化法   | : Agilent Jet Stream (ESI, negative)                             |
| ネブライザ圧力 | : 25 psi   |
| ドライガス   | : 12 L/min at 350 °C   |
| シースガス   | : 12 L/min at 350 °C   |
| キャピラリ電圧 | : 3500 V   |
| ノズル電圧   | : 0 V  |
| 測定モード   | : dynamic MRM  |

| Compound Name              | Abbr.  | MRM transition | Ret Time | Fragmentor | CE  |
|----------------------------|--------|----------------|----------|------------|-----|
| Cholic acid                | CA     | 407.3 > 343.3  | 6.690    | 215        | 37  |
| Deoxycholic acid           | DCA    | 391.3 > 345.3  | 7.970    | 190        | 37  |
| Dihydroxycholic acid       | DHCA   | 401.2 > 331.2  | 1.825    | 180        | 29  |
| Glycochenodeoxycholic acid | G-CDCA | 448.3 > 74.0   | 7.540    | 180        | 37  |
| Glycocholic acid           | GCA    | 464.3 > 74.0   | 6.520    | 185        | 45  |
| Lithocholic acid           | LCA    | 375.3 > 375.3  | 8.760    | 180        | 0   |
| Taurochenodeoxycholic acid | T-CDCA | 498.3 > 80.0   | 7.459    | 220        | 77  |
| Taurocholic acid           | T-CA   | 514.3 > 80.0   | 6.440    | 220        | 100 |
| Tauroolithocholic acid     | T-LCA  | 482.3 > 79.9   | 8.470    | 220        | 100 |
| Tauroursodeoxycholic acid  | T-UDCA | 498.3 > 80.0   | 5.490    | 215        | 73  |
| Ursodeoxycholic acid       | UDCA   | 391.3 > 391.3  | 5.714    | 210        | 0   |
| Hyodeoxycholic acid        | HDCA   | 391.3 > 391.3  | 6.056    | 210        | 0   |
| Chenodeoxycholic acid      | CDCA   | 391.3 > 391.3  | 7.736    | 210        | 0   |

※CE=Collision energy



### 3. 結果および考察

#### クロマトグラム

今回測定した胆汁酸のうち CDCA, GCA, HDCA, LCA および UDCA はプリカーサイオンとプロダクトイオンに同じ *m/z* を選択しました。他の胆汁酸はプリカーサイオンとプロダクトイオンで異なる *m/z* を選択した方が S/N 値の良いデータが取得できました。図 1 には 13 種胆汁酸の MRM クロマトグラムを示しました。構造異性体である DCA と CDCA および HDCA と UDCA が完全に分離できていることが示されています。また、分析時間もわずか 10 分ででした。

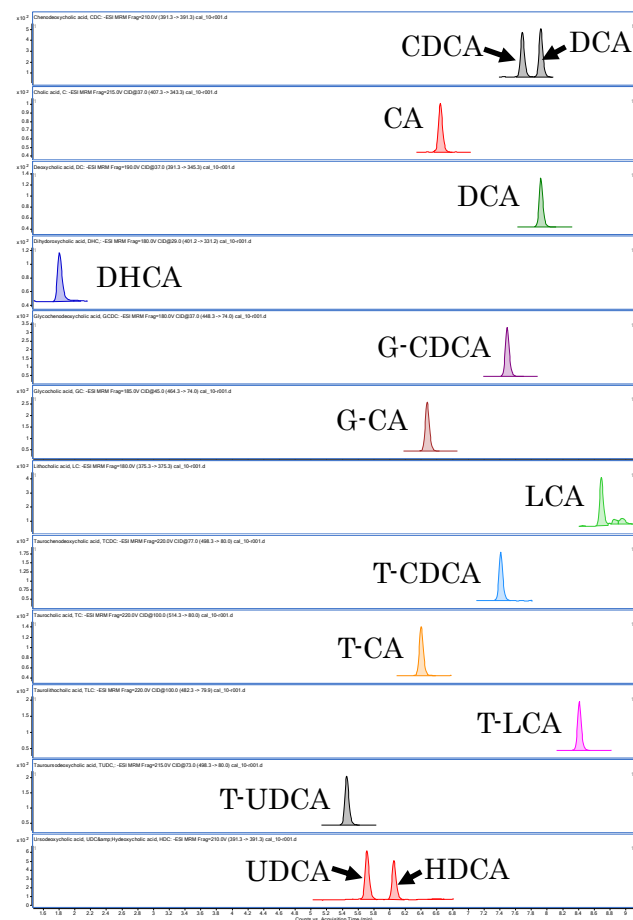


図 1. 13 種胆汁酸の MRM クロマトグラム。濃度は 10 ng/mL

#### 検量線と LOD

検量線データを図 2 に示しました。測定濃度は、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 および 100 ng/mL の 10 点で行いました。13 種すべての胆汁酸は 0.1~100 ng/mL の濃度範囲において決定係数 0.999 以上の直線性を示しました。また 0.1 ng/mL 濃度の S/N から LOD (S/N = 3) を算出しました。決定係数および LOD は表 2 にまとめました。

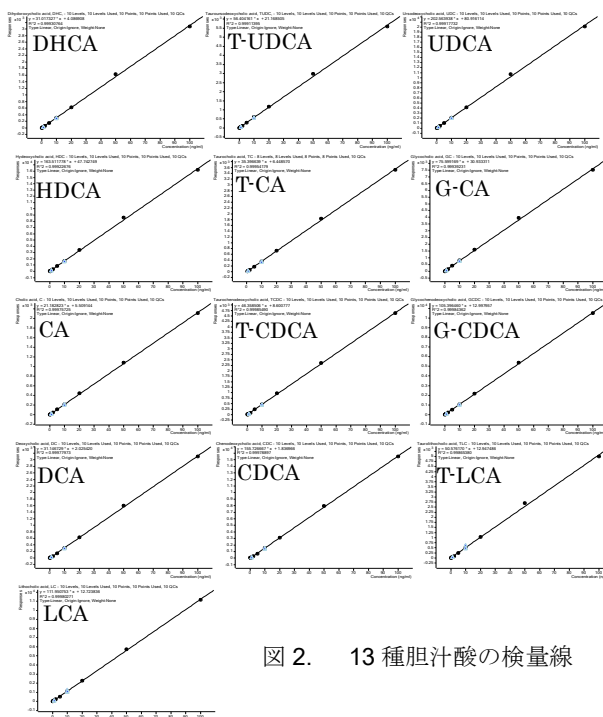


図 2. 13 種胆汁酸の検量線

| 胆汁酸    | 検量線(式)                           | R <sup>2</sup> | LOD(ng/mL) |
|--------|----------------------------------|----------------|------------|
| DHCA   | $y = 31.017327 * x + 4.086908$   | 0.9993         | 0.62       |
| T-UDCA | $y = 56.404161 * x + 21.168505$  | 0.9991         | 0.42       |
| UDCA   | $y = 202.563938 * x + 80.916114$ | 0.9992         | 0.57       |
| HDCA   | $y = 163.511778 * x + 47.742749$ | 0.9992         | 0.57       |
| T-CA   | $y = 35.396639 * x + 6.448570$   | 0.9995         | 1.43       |
| G-CA   | $y = 75.599169 * x + 30.933311$  | 0.9994         | 0.18       |
| CA     | $y = 21.182823 * x + 5.509144$   | 0.9998         | 0.54       |
| T-CDCA | $y = 46.358506 * x + 8.600777$   | 0.9999         | 0.93       |
| G-CDCA | $y = 105.396460 * x + 12.997957$ | 0.9998         | 0.06       |
| DCA    | $y = 31.146729 * x + 2.025420$   | 0.9998         | 0.39       |
| CDCA   | $y = 155.726667 * x + 1.836966$  | 0.9998         | 0.66       |
| T-LCA  | $y = 50.576170 * x + 12.947486$  | 0.9996         | 0.60       |
| LCA    | $y = 111.950753 * x + 12.723836$ | 0.9998         | 0.40       |

表 2. 検量線および LOD(まとめ)

#### 添加回収試験

実試料としてヒト血清を分析し、検出された MRM クロマトグラムを図 3 に示しました。検出された胆汁酸は T-UDCA, UDCA, HDCA, T-CA, G-CA, CA, T-CDCA, G-CDCA, DCA および T-LCA の 11 種でした。G-CDCA が最も高濃度(約 650 ng/mL)で検出されました。

次にアセトニトリルによる除タンパク処理前に、最終濃度 10 ng/mL となるように胆汁酸標準物質を添加し、添加回収試験を行いました。ヒト血清から検出された胆汁酸および回収率を表 3 にまとめました。G-CDCA は検出された濃度と添加した濃度(10 ng/mL)の差が大きく、回収率を求めることはできませんでした。G-CDCA 以外の胆汁酸の添加回収率は 70~120 % の範囲に収まっていることが示されました。

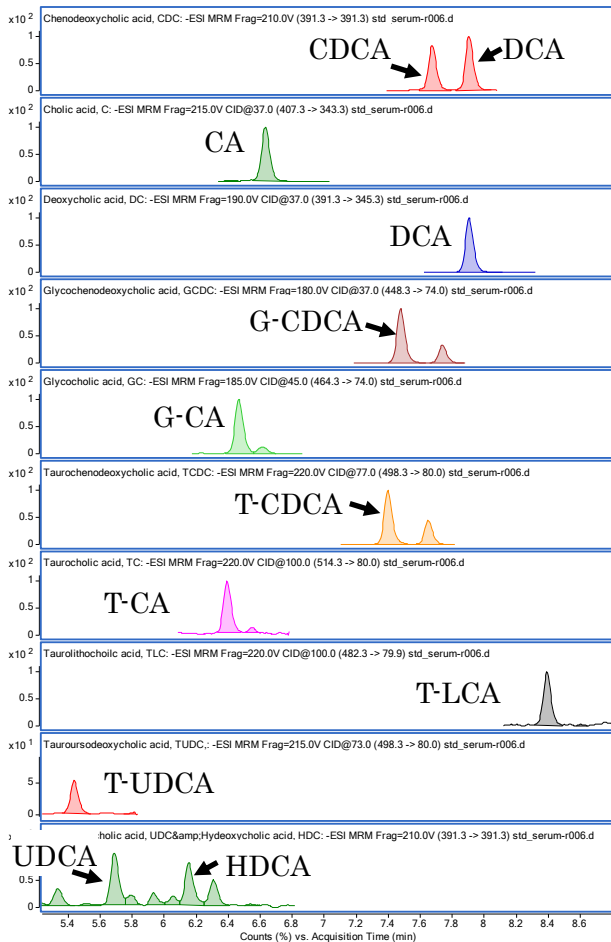


図 3. 血清から検出された胆汁酸の MRM クロマトグラム

表 4. 血清から検出された胆汁酸濃度と添加回収試験結果

|               | DHCA   | T-UDCA | UDCA  | HDCA  | T-CA  | G-CA  | CA    |
|---------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| serum (ng/mL) | N/D    | 2.7    | 22.6  | 3.9   | 5.1   | 32.2  | 21.9  |
| Recovery (%)  | 107.6  | 115.4  | 114.1 | 73.3  | 108.5 | 74.0  | 117.2 |
|               | T-CDCA | G-CDCA | DCA   | CDCA  | T-LCA | LC-A  |       |
| serum (ng/mL) | 87.3   | 646.9  | 113.5 | 111.5 | 1.2   | N/D   |       |
| Recovery (%)  | 91.8   | N/D    | 112.4 | 118.5 | 107.2 | 115.7 |       |

#### 4. まとめ

グリシンおよびタウリン抱合体を含む胆汁酸 13 種の一斉分析を行いました。10 分の分析時間で CDCA と DC および HDCA と UDCA の異性体分離が可能でした。また除タンパク処理を行うだけで、ヒト血清中の胆汁酸が検出可能であることもわかり、代謝物および医薬品研究に応用可能であることも示されました。

#### 【LC-MS-201710YD-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1  
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies