

Agilent 1290 UHPLC-Agilent 6460 TQ による胆汁酸類の一斉分析



Authors

須賀隆浩¹、山口浩明^{1,2}、佐藤紀宏²、前川正充²、後藤順一²、眞野成康^{1,2}

¹東北大学大学院薬学研究科

²東北大学病院薬剤部

要旨

Agilent 1290 UHPLC と Agilent 6460 TQ を用い、胆汁酸類の一斉分析系を構築しました。胆汁酸類の一斉定量分析は、その重要性にもかかわらず、生体内酵素による反応生成物の多様性と低い濃度から技術的に困難なものでした。このアプリケーションノートでは、分離と選択性に優れた Ultra-High Performance Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-Triple Quad Mass Spectrometer を用い、15 種類の内因性胆汁酸類と 6 種類の安定同位体標識内部標準の分析法について示します。

Key word：胆汁酸、一斉分析

はじめに

胆汁酸はコレステロールから生合成され、ステロイド骨格を持つ両親媒性の代謝物です。Cholic acid (CA) と chenodeoxycholic acid (CDCA) は一次胆汁酸として知られており、deoxycholic acid (DCA) と lithocholic acid (LCA) は二次胆汁酸として知られています。胆汁酸が決定的な生理機能を有する現象として、コレステロールの排出、バクテリアの過剰増殖に対する防御、腸管腔における脂質と脂溶性栄養素の消化と吸収があげられます¹⁾。

胆汁酸の生体内での代謝では腸肝循環が起こることが知られています。肝臓でコレステロールから生合成された胆汁酸は胆管を經由して腸管腔に排出され、回腸で再吸収された後に再び肝臓へと輸送されます²⁻⁴⁾。この腸肝循環の中でも特に、最終過程である肝臓での取り込みは、胆汁酸の機能を制御する重要なものとなります。これまでの報告から、CA, taurocholic acid (TCA), glycochenodeoxycholic acid (GUDCA), taurochenodeoxycholic acid (TUDCA) の取り込みは肝臓特異的なトランスポーターが担っていることが示されています⁵⁻¹¹⁾。しかしながら、これらの胆汁酸の網羅的な解析はなされていませんでした。本アプリケーションノートでは、CA, CDCA, DCA, ursodeoxycholic acid (UDCA), LCA の 5 種類の胆汁酸と、それらのグリシン、タウリン抱合体の一斉分析法を示します。

試料と方法

試薬

CA, CDCA, taurochenodeoxycholic acid (TLCA) は Sigma-Aldrich から購入しました。DCA と LCA は和光純薬から購入しました。TCA, ursodeoxycholic acid (UDCA), GUDCA, TUDCA はナカライテスクから購入しました。Glycocholic acid (GCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), glycolithocholic acid (GLCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), taurodeoxycholic acid (TDCA) は当研究室で調製しました¹²⁾。同様に、内部標準として用いる安定同位体標識体として、3, 7, 12-¹⁸O]CA, 3, 7-¹⁸O, ²H]GCA, 3, 7-¹⁸O, ²H]GCDCA, 3, 12-¹⁸O, ²H]TDCA, 3-¹⁸O, ²H]GLCA, 3-¹⁸O, ²H]TLCA を調製しました。

移動相に用いた水は PURELAB ultra apparatus (Organo 社)、有機溶媒は HPLC または LC/MS グレードとしました。

LC/MS/MS

Agilent 1290 UHPLC システムを用い、胆汁酸類を分離しました。オートサンプラを用いて 10 μ L のサンプル溶液を注入し、Inertsil ODS-3 (1.5 \times 10 mm, 5 μ m) をガードカラムとし、Inertsil ODS-3 (2.1 \times 150 mm, 5 μ m) を分離カラムとしました。移動相は 20 mM 酢酸アンモニウムを含む 75% メタノール (pH 6.8) を用いました。流速は 0.3 mL/min としました。カラム恒温層は 40°C としました。

Agilent 6460 TQ を用い、胆汁酸類を分析しました。イオン化はネガティブモードで、表 1 のパラメーターを用いました。

表 1. イオン化パラメーター	
Gas temperature	350°C
Gas flow	12 L/min
Nebulizer	60 psi
Sheath gas temperature	400°C
Sheath gas flow	12 L/min
Capillary voltage	5000 V
Nozzle voltage	500 V

Selected reaction monitoring (SRM) のパラメーターを表 2 に示します。データ採取と解析は、Agilent MassHunter Workstation software を用いました。(なお、SRMは Agilent MassHunter Workstation software 上では、MRM : Multi Reaction Monitoringという表記としています。)

結果と考察

アイソマーの分離

SRM クロマトグラムを図 1 に示します。胆汁酸類の中には SRM のトランジションがオーバーラップしているアイソマーが含まれているため、クロマトグラフィーによる分離を試みました。CDCA, DCA, UDCA の溶出時間はそれぞれ 6.7, 7.5, 3.3 min となりました。グリシン抱合体である GCDCA, GDCA, GUDCA の溶出時間はそれぞれ 5.3, 6.1, 2.8 min となりました。また、タウリン抱合体である TCDCA, TDCA, TUDCA の溶出時間はそれぞれ 5.0, 5.7, 2.7 min となりました。

内因性胆汁酸類を正確に定量するために、表 2 に示すとおり、安定同位体標識体を代表的な内部標準として用いました。

HEK293 細胞株を用いた輸送活性の評価

今回構築した分析法を用い、ヒト organic anion-transporting polypeptide (OATP) の機能を解析しました。肝臓特異的なサブファミリーで、Na⁺-independent な輸送機構に含まれている OATP1B1 と OATP1B3 を HEK293 細胞で過剰発現させました。胆汁酸類を添加して取り込みを解析した結果、どちらの OATP においても GCDCA, TCDCA, GDCA, TDCA, GLCA, TLCA は新規の輸送基質であり、抱合体はより親和性の高い基質であることが明らかになりました (図 2)。このことから、これまで知られている Na⁺-dependent な輸送機構だけでなく、OATP1B1 および OATP1B3 などの Na⁺-independent な OATP が、

肝臓での取り込みにおいて重要な機能を有している可能性が示されました¹³⁾。

表 2. SRM パラメーター

Analytes	Retention time (min)	SRM transition	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (V)	Internal standard
LCA	12.2	375/375	190	5	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
CDCA	6.7	391/391	210	0	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
DCA	7.5	391/391	200	0	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
UDCA	3.3	391/391	230	0	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
CA	4.2	407/407	230	0	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
3, 7, 12-[¹⁸ O]CA	4.2	413/413	230	0	
GLCA	9.4	432/74	190	40	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
3-[¹⁸ O, ² H]GLCA	9.3	435/74	190	40	
GCDCA	5.3	448/74	200	40	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GDCA	6.1	448/74	200	40	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GUDCA	2.8	448/74	200	40	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCA
3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA	5.3	454/74	200	40	
GCA	3.6	464/74	210	45	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCA
3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCA	3.6	470/74	210	45	
TLCA	8.8	482/80	280	75	3-[¹⁸ O, ² H]TLCA
3-[¹⁸ O, ² H]TLCA	8.8	485/80	280	75	
TCDCA	5	498/80	290	90	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TDCA	5.7	498/80	290	75	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TUDCA	2.7	498/80	290	75	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCA
3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA	5.7	504/80	290	75	
TCA	3.4	514/80	300	95	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCA

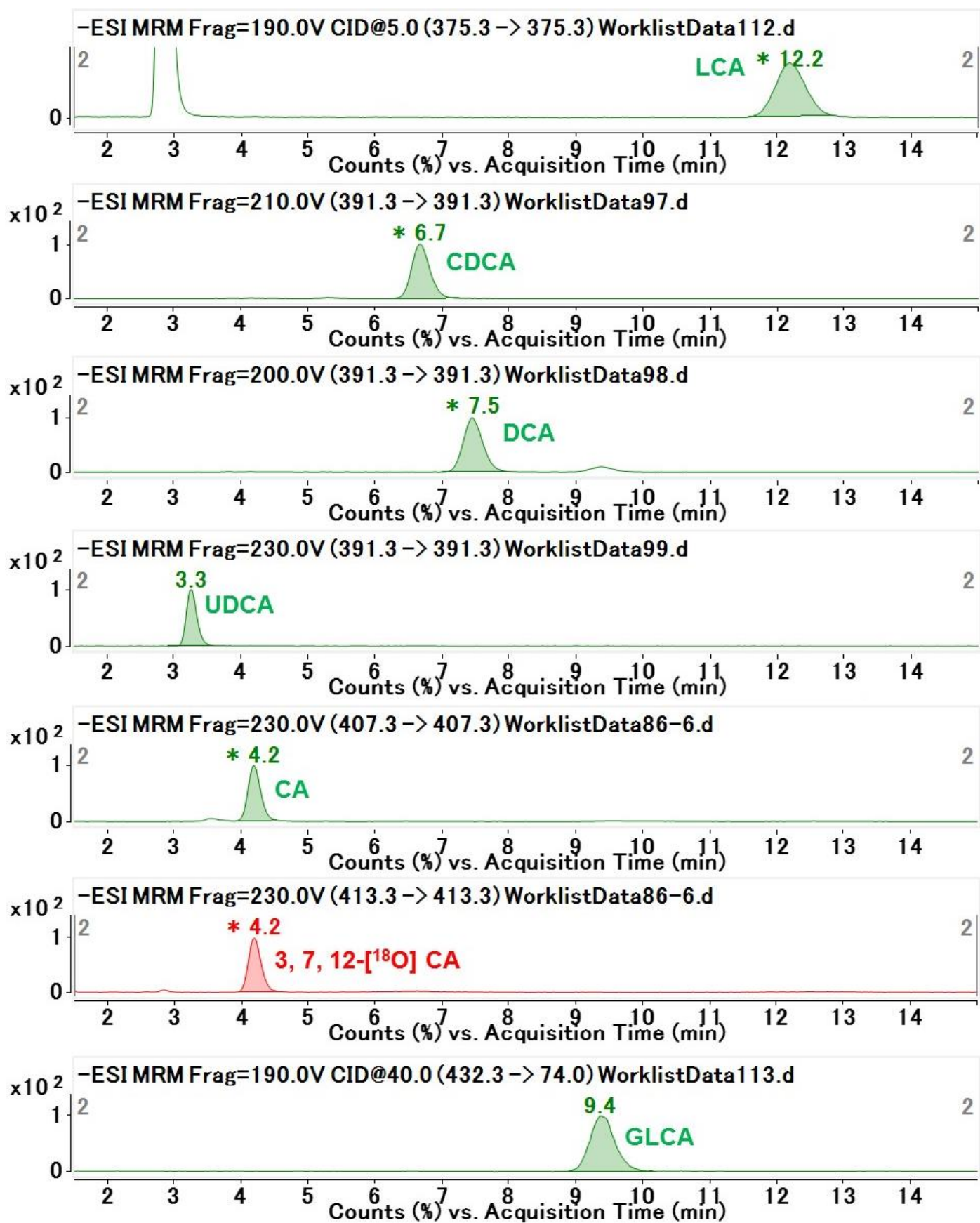


図 1. 胆汁酸類の SRM クロマトグラム

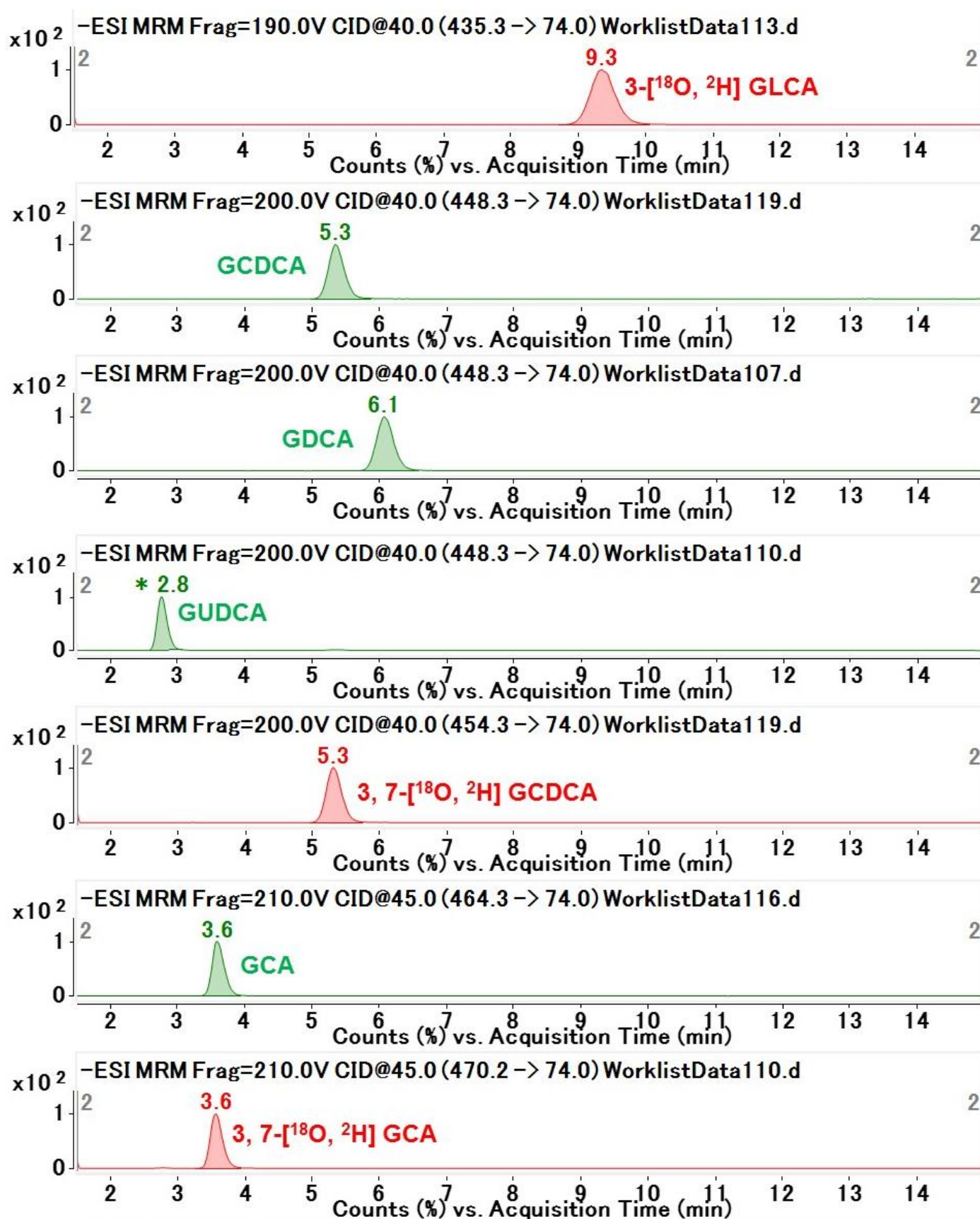


図 1. 胆汁酸類の SRM クロマトグラム (続き)

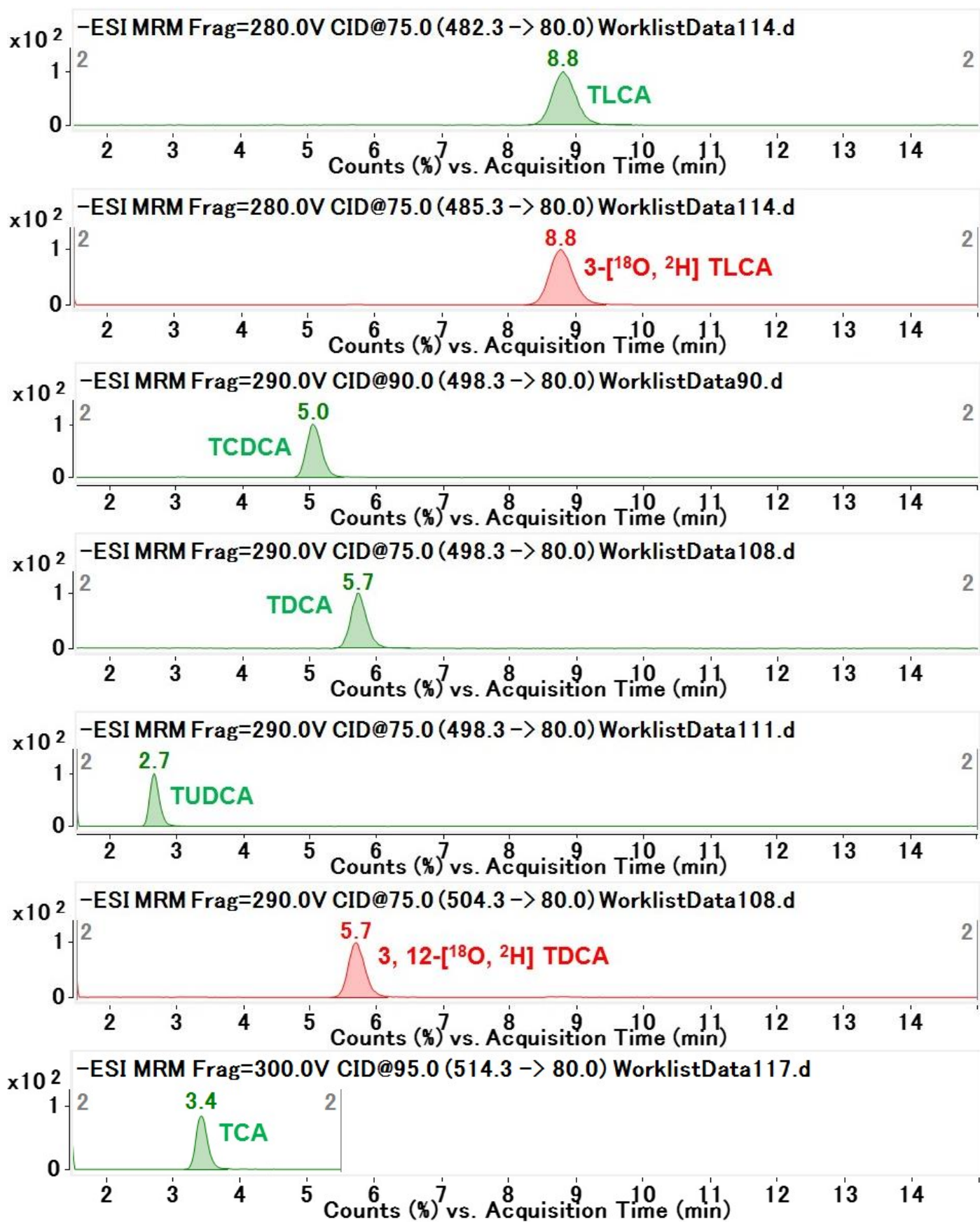


図 1. 胆汁酸類の SRM クロマトグラム (続き)

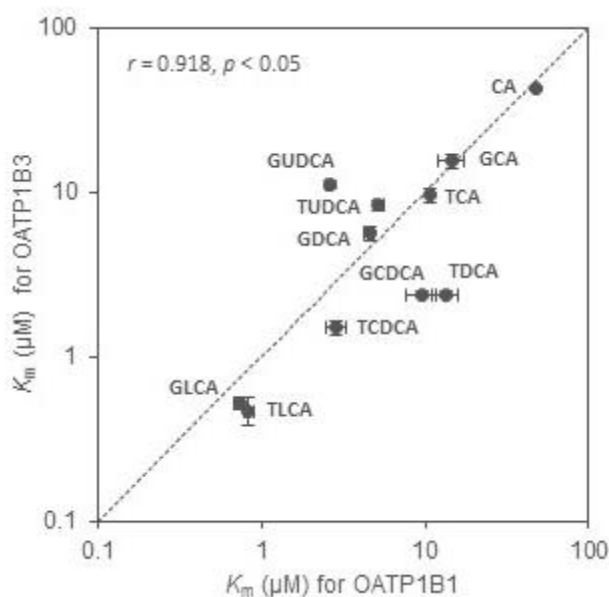


図 2. OATP1B1 および OATP1B3 に対する胆汁酸の親和性

結論

Agilent 1290 UHPLC-Agilent 6460 TQ を用いることにより、アイソマーを含む 15 種の内因性胆汁酸を一斉分析することが出来ました。構築した分析法を用いることで、 Na^+ -independent な OATP サブファミリーの新規基質と親和性の違いを明らかにすることが出来ました。

参考文献

- [1] de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 2013, 17(5): 657-669.
- [2] Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res.* 2009, 50(12): 2340-2357.
- [3] Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol.* 2002, 64: 635-661.
- [4] St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol.* 2001, 204 (Pt 10): 1673-1686.
- [5] Cui Y, Koning J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic

uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem.* 2001, 276(13): 9626-9630.

[6] Abe T, Kakyō M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, et al. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem.* 1999, 274(24): 17159-17163.

[7] Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, et al. LST-2, a human liver specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* 2001, 120 (7): 1689-1699

[8] Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RI, Perez MJ, Jimenez F, et al. OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem.* 2006, 281 (421): 30326-30335.

[9] Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, et al. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitory transporters. *J Biol Chem.* 1999, 274 (52): 37161-37168

[10] Letschert K, Keppler D, Koning J. Mutations in the SLC01B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics.* 2004, 14 (7): 441-452.

[11] Maeda K, Kambara M, Tian Y, Hofmann AF, Sugiyama Y. Update of ursodeoxycholate and its conjugates by human hepatocytes: role of Na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 (OATP-C), and oatp1B3 (OATP8). Mol Pharma. 2006, 3 (1):70-77

[12] Goto J, Miura H, Inada M, Nambara T, Nagakura T, Suzuki H. Studies on steroids. CCXXXVIII. Determination of bile acids in liver tissue by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization detection. J Chromatogr. 1988,

452: 119-129.

[13] Suga T, Yamaguchi H, Sato T, Maekawa M, Goto J, Mano N. Preference of conjugates bile acid as substances for OATP1B1 and OATP1B3. PLoS One. 2017, 12 (1): e0169719.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, May, 2018

LC-MS-201805ME-001

