

## 微生物叢の解明：LC/MS/MS による 生体サンプル中の胆汁酸のターゲット分析

### 著者

Pietro Morlacchi  
Agilent Technologies, Inc.  
Justin Cross  
Ruben J. F. Ramos  
Cell Metabolism Core Facility  
Memorial Sloan Kettering  
Cancer Center New York  
NY, USA  
Christophe Deckers  
Agilent Technologies, Inc.  
Mark Sartain  
Agilent Technologies, Inc.  
Limian Zhao  
Agilent Technologies, Inc.  
Daniel J. Cuthbertson  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

胆汁酸 (BA) は食物中の脂質や脂質溶解性ビタミンの消化と吸収に関する重要な分子です。これらの両親媒性化合物は小腸における脂肪の乳化を促進し、栄養素の効率的な吸収を助けます。一次胆汁酸は肝臓でコレステロールから複雑なプロセスを経て合成され、脂質恒常性を保つために厳密に制御されています。一次胆汁酸は生成後は胆嚢に蓄えられて食物摂取時に十二指腸に放出され、そこで消化機能を担います。胆汁酸の約 95 % は回腸末端で再吸収されて腸肝循環によって肝臓に戻されることから、このシステムの効率の良さがわかります。残りの 5 % は再吸収されず、腸内微生物叢による大幅な構造修飾が行われます。このプロセスで二次胆汁酸と呼ばれる関連代謝物が生成されます。二次胆汁酸は独自の生物学的活性を持ち、多くが未解明のままになっています。

最近の研究で二次胆汁酸が健康と疾患に幅広く関わっていることが示されています。また、免疫調節に関係し、免疫細胞の活性や炎症反応に影響する可能性が新たな研究において指摘されています。発がんや腫瘍の進行を二次胆汁酸に結び付けるエビデンスも増えており、特定のがんの発生と進行における潜在的な役割が注目されています。これらの発見は、胆汁酸、特に二次胆汁酸が単なる消化剤ではなく、複雑な生理学的プロセスに深く関わっていることを示しています。その多様な役割を理解することで、さまざまな疾患の原因に関する新しい知見が得られたり、新たな治療戦略が見つかる可能性があります。このアプリケーションノートでは、Agilent 6495D トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) プラットフォームを用いて血漿、血清、糞便サンプル中の 68 種類の BA のターゲット分析を行うための新しい標準 LC/MS/MS メソッドを紹介します。

## はじめに

胆汁酸の本質的な複雑さのため、液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) による BA 分析は重要であるとともに困難さを伴います。これらの化合物には構造が似ているさまざまな異性体種があり、質量電荷比 ( $m/z$ ) やリテンションタイムがほぼ同じものが多数あります。この類似性のために、ベースライン分離や正確な同定の実現が特に困難です。

また、胆汁酸は比較的安定した分子であるため、一般的に質量分析システムで広範なフラグメンテーションを行うことができません。フラグメンテーションがさらに困難な異性体胆汁酸は識別が難しいため、リテンションタイムも活用した標準メソッドが特に求められます。

こうした問題に加え、生体サンプル中の微生物叢由来の胆汁酸種の多くは一般的に低濃度であり、マトリックス成分によってイオンの抑制や過剰が生じる場合がよくあります。このようなマトリックス効果が正確な定量の妨げとなり、分析をさらに複雑にします。関連性の高い胆汁酸種の識別には高い感度と特異性が必要になりますが、それによってさらに複雑さが増します。

これらの課題に対処するには、高度に最適化された標準クロマトグラフィーメソッド、高度な質量分析技術、堅牢なサンプル前処理プロトコルが不可欠です。これらの戦略によって BA 分析の信頼性が向上し、研究および臨床研究の両方のアプリケーションで正確なプロファイリングが可能になります。

以前の資料にある LC/TQ メソッドでは 26 種類の胆汁酸を分析しました<sup>1</sup>。この実験では 6495D LC/TQ と第 4 世代のイオンファンネル技術を用いた新しいメソッドを紹介します。このメソッドで感度を向上させ、複雑なマトリックス中の胆汁酸の分析範囲を 68 種類に広げることができます。この胆汁酸メソッドは、アジレントのオミクス分析向け標準 LC/MS プラットフォームとの互換性および一貫性があり、ラボでの移行が容易であるため、新たな知見を迅速に得るのに適しています。

## 実験方法

LC 移動相と LC/MS サンプル前処理では、すべて HPLC または LC/MS グレードの化学物質を使用します。

### 標準と前処理

メソッド開発では、表 1 に示すようにさまざまなサプライヤから入手した胆汁酸標準を使用しました。粉末標準をメタノールに溶解し、1.0 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度の原液を調整します。これらの原液を用いて、Agilent Jet Stream (AJS) ESI ソース条件を最適化します (表 2)。Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェア 12.1 のイオン源および化合物最適化ツールを使用して、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) の取り込みパラメータを最適化します。

簡単に説明すると、自動反復注入プログラムを使用して、各 BA 原液を質量分析システムに連続注入 (0.5 ~ 1  $\mu\text{L}$ ) します。ポジティブモードとネガティブモードにおける最適な MRM トランジションを特定するためのプリカーサイオンとして、 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^-$  イオン種を選択しました。これらのトランジションと最適化した AJS ソースパラメータ (表 2) を、対応するリテンションタイムとともに、最終的な取り込みメソッドの化合物ダイナミック MRM (dMRM) 取り込みリストに含めます。標準 iFunnel 設定を使用してすべての胆汁酸を分析しました。トランジションとメソッドの詳細の一覧は、アジレントに請求して入手できる関連資料に記載されています。

この広範な最適化で次のような指針が得られました。(A) アミノ酸抱合胆汁酸は、抱合アミノ酸の損失によってポジティブイオン化モードで最も強く反応し、顕著な MRM トランジションを示します。(b) 非抱合胆汁酸が生成するフラグメンテーションスペクトルは比較的弱いものの、ネガティブモードで安定した強いギ酸付加物を多く形成します。(c) 特異性と感度を追加するため、MRM スケジュールにギ酸付加物の損失を含めることができます。つまり、対応する選択イオンモニタリング (SIM) のトランジションも含めることで感度が向上し、複雑なマトリックスの S/N 比が改善しました。BA ネガティブイオンモード付加物での同様の戦略について、参照した研究で詳しく説明されています<sup>1</sup>。

表 1. メソッド開発で用いた胆汁酸標準の一覧 (次ページに続く)

名称	省略記号	分子量	CAS 番号	ベンダー	カタログ番号
12-オキソリトコール酸	12-oxo-LCA	390.3	5130-29-0	Steraloids Inc.	C1650-000
3-デヒドロコール酸 (3-オキソコール酸)	3-oxo-CA	406.3	2304-89-4	Steraloids Inc.	C1272-000
3-オキソケノデオキシコール酸	3-oxo-CDCA	390.3	4185-00-6	Avanti	700255
3-オキソデオキシコール酸	3-oxo-DCA	390.3	4185-01-7	Avanti	700255
3-オキソリトコール酸 (デヒドロリトコール酸)	3-oxo-LCA	374.3	1553-56-6	Cayman	29544
6,7-ジオキソリトコール酸	6,7-diketo-LCA	404.3	1643669-23-1	Avanti	700234
3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -テトラヒドロキシ胆汁酸	6 $\alpha$ -THBA	424.3	80875-92-9	Avanti	700228
3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -テトラヒドロキシ胆汁酸	6 $\beta$ -THBA	424.3	80875-93-0	Avanti	700189
7,12-ジオキソリトコール酸	7,12-diketo-LCA	404.3	517-33-9	Avanti	700230
7-オキソコール酸 (7-デヒドロコール酸)	7-oxo-CA	406.3	911-40-0	Steraloids Inc.	C1250-000
3 $\beta$ -OH-7-オキソコレン酸	7-oxo-cholenic	388.3	25218-38-6	Cayman	29541
7-オキソリトコール酸 (ヌトリアコール酸)	7-keto-LCA	390.3	4651-67-6	Steraloids Inc.	C1600-000
アロコール酸	Allo-CA	408.3	474-25-9	Cayman	30415
アロリトコール酸	Allo-LCA	376.3	2276-93-9	Steraloids Inc.	C0680-000
コール酸	CA	408.3	81-25-4	Avanti	700212
コール酸硫酸	CAS	488.2		Isosciences	13098UNL3SO
ケノデオキシコール酸	CDCA	392.3	474-25-9	Avanti	700198
ケノデオキシコール酸硫酸	CDCAS	472.3	59132-32-0	Isosciences	13101UNL3SO
コレン酸	Cholenic	374.3	5255-17-4	Cayman	29543
デオキシコール酸	DCA	392.3	83-44-3	Avanti	700197
デオキシコール酸硫酸	DCAS	472.3	67030-48-2	Isosciences	13100UNL3SO
デヒドロコール酸	DHCA	402.2	81-23-2	Avanti	700215
グリココール酸	GCA	465.3	475-31-0	Avanti	700265
グリココール酸硫酸	GCAS	545.3		Isosciences	13443UNL3SO
グリコケノデオキシコール酸	GCDCA	449.3	640-79-9	Avanti	700266
グリコケノデオキシコール酸硫酸	GCDCAS	529.3	66874-09-7	Isosciences	13104UNL3SO
グリコデオキシコール酸	GDCA	449.3	360-65-6	Avanti	700267
グリコデオキシコール酸硫酸	GDCAS	529.3	67030-54-0	Isosciences	13226UNL3SO
グリコデヒドロコール酸	GDHCA	459.3	3415-45-0	Steraloids Inc.	C2022-000
グリコヒオデオキシコール酸	GHDCA	449.3	13042-33-6	Cayman	22643
グリコリトコール酸	GLCA	433.3	474-74-8	Avanti	700268
グリコリトコール酸硫酸	GLCAS	513.3	15324-64-8	Isosciences	13231UNL3SO
グリコウルソデオキシコール酸	GUOCA	449.3	64480-66-6	Avanti	700263
グリコウルソデオキシコール酸硫酸	GUOCAS	529.3	133429-88-6	Isosciences	13224UNL3SO
グリコ $\gamma$ -ムリコール酸 (グリコヒオコール酸)	G- $\gamma$ -MCA	465.3	32747-08-3	Steraloids Inc.	C1860-000
ヒオデオキシコール酸	HDCA	392.3	83-49-8	Avanti	700214
イソアロリトコール酸	Isoallo-LCA	376.6	2276-93-9	Steraloids Inc.	C0700-000
イソコール酸 (3-エピコール酸)	Iso-CA	408.3	3338-16-7	Cambridge	ULM-10566
イソケノデオキシコール酸	Iso-CDCA	392.6	566-24-5	TRC	I789600
イソデオキシコール酸	Iso-DCA	392.3	566.17-6	Steraloids Inc	C1165-000
イソリトコール酸	Iso-LCA	376.3	1534-35-6	Steraloids Inc.	C1475-000
リトコール酸	LCA	376.3	434-13-9	Avanti	700218
リトコール酸硫酸	LCAS	456.3	34669-57-3	Isosciences	13099UNL3SO
ムリデオキシコール酸 (ムロコール酸)	MDCA	392.3	668-49-5	Steraloids Inc.	C0910-000
ノルデオキシコール酸	norDCA	378.3	53608-86-9	Avanti	700240
タウロコール酸	TCA	515.3	81-24-3	Avanti	700251

名称	省略記号	分子量	CAS 番号	ベンダー	カタログ番号
タウロコール酸硫酸	TCAS	595.3	67030-62-0	Isosciences	13232UNL3SO
タウロケノデオキシコール酸	TCDCA	499.3	516-35-8	Avanti	700249
タウロケノデオキシコール酸硫酸	TDCAS	579.3		Isosciences	13105UNL3SO
タウロデオキシコール酸	TDCA	499.3	516-50-7	Avanti	700250
タウロデオキシコール酸硫酸	TDCAS	579.3		Isosciences	13225UNL3SO
タウロデヒドロコール酸	TDHCA	509.2	517-37-3	Avanti	700242
タウロヒデオキシコール酸	THDCA	499.3	2958-04-5	Steraloids Inc.	C0892-000
タウロリトコール酸	TLCA	483.3	516-90-5	Avanti	700252
タウロリトコール酸硫酸	TLCAS	563.3	15324-65-9	Isosciences	13230UNL3SO
タウロウルソデオキシコール酸	TUDCA	499.3	14605-22-2	Avanti	700247
タウロウルソデオキシコール酸硫酸	TUDCAS	579.3		Isosciences	13106UNL3SO
タウロ- $\alpha$ -ムリコール酸	T- $\alpha$ -MCA	515.3	25613-05-2	Steraloids Inc	C1893-000
タウロ- $\beta$ -ムリコール酸	T- $\beta$ -MCA	515.3	25696-60-0	Steraloids Inc	C1899-000
タウロ- $\gamma$ -ムリコール酸	T- $\gamma$ -MCA	515.3		Cayman	22669
タウロ- $\omega$ -ムリコール酸	T- $\omega$ -MCA	515.3	2456348-84-6	Steraloids Inc.	C1889-000
ウルソコール酸	UCA	408.3	2955-27-3	Avanti	700229
ウルソデオキシコール酸	UDCA	392.3	128-13-2	Avanti	700199
ウルソデオキシコール酸硫酸	UDCAS	472.3	68780-73-4	Isosciences	13102UNL3SO
$\alpha$ -ムリコール酸	$\alpha$ -MCA	408.3	2393-58-0	Avanti	700232
$\beta$ -ムリコール酸	$\beta$ -MCA	408.3	2393-59-1	Avanti	700233
$\gamma$ -ムリコール酸 (ヒオコール酸)	$\gamma$ -MCA	408.3	547-75-1	Steraloids Inc.	C1850-000
$\omega$ -ムリコール酸	$\omega$ -MCA	408.3		Avanti	700231

表 2. 質量分析計の取り込みパラメータ

パラメータ	設定値
イオン源	Agilent Jet Stream デュアル ESI
ソースガスの温度、流量	250 °C、11 L/min
ガス温度、流量	180 °C、20 L/min
ネブライザ	25 psi
キャピラリー	4,500 V (+) /5,000 V (-)
ノズル	1,000 V (+/-)
MS モード	ポジティブ/ネガティブ
iFunnel 設定	標準

## サンプル前処理

オスおよびメスのマウスとラットの認証血漿サンプルを BioIVT (Elevated Science、ウェストベリー、ニューヨーク州) から入手し、さまざまなヒトのドナーの糞便を Medix Biochemica (メリーランドハイツ、ミズーリ州) から購入しました。生体サンプルからの最適な BA 抽出条件を確立します。1 % のギ酸と d-BA 内部標準を含む 4 倍量のアセトニトリルを使用して、血漿/血清 (50 µL) から BA を抽出します。室温で 2 時間攪拌してインキュベートした後、サンプルを遠心分離 (20 分間、13,000 rpm、5 °C) してタンパク質を沈殿させ、30 °C の真空下で上清を乾燥させます。

d-BA 内部標準を含む 80 % メタノールを用いて、100 mg/mL で糞便サンプルを抽出します。サンプルに対して、6 m/s、30 秒/サイクルのピーズピーティングを、サイクル間のドウェルタイム 5 秒間で 6 サイクル行い、ホモジナイズします。-80 °C で一晩のインキュベーションを行ってタンパク質変性沈殿処理を促進し、サンプルを氷の上で 30 分間解凍して遠心分離 (20 分間、13,000 rpm、5 °C) できるようにします。上清を収集し、前述のとおり溶媒を蒸発させます。乾燥サンプルを 50 % メタノール (100 µL) で再溶解し、1 分間攪拌し、遠心分離 (2 分間、13,000 rpm、5 °C) して不溶性物質を沈殿させます。上清を LC/MS 分析用のガラス分析バイアルに移します。

あるいは、Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal Lipid (Captiva EMR-Lipid) カートリッジまたはプレートは抽出プロトコルに組み込み、乾燥、再溶解、LC/MS 分析の前にタンパク質と脂質を同時に除去することができます。一連の d-BA 標準によるスパイク前実験およびスパイク後実験を通して Captiva EMR-Lipid での胆汁酸の抽出回収率を評価し、85 % を超える回収率を達成しました (データは示していません)。これらの結果は以前に代謝物で報告された回収率と一致します<sup>3</sup>。

このワークフローへの Captiva EMR-Lipid の導入は、サンプルを並行リピドミクス分析にける場合に特に関係する場合があります。一般的なサンプルクリーンアップでメソッドの堅牢性を向上させる場合や、MS シグナルのマトリックス効果を最小限に抑える場合にも役立ちます。また、以前の研究で示されているとおり、血漿サンプルの胆汁酸抽出プロトコルは Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform を用いた自動化にも対応します<sup>2,3</sup>。

## 使用装置

LC/MS プラットフォームは、第 4 世代の iFunnel 技術を備えた 6495D トリプル四重極質量分析装置と、オミクスアプリケーション用のアジレント標準構成の Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムで構成しました。取り込みメソッドは、Agilent 6495C モデルおよび同じ標準オミクス構成の通常のステンレス Agilent 1290 Infinity II LC に完全対応しています。Infinity II LC システムを用いるメソッドはすべて Infinity III LC システムに完全対応しており、同一のメソッド性能が得られます。

## ソフトウェア

MS データの取得には、メソッド開発用のイオン源および化合物最適化ツールが組み込まれた MassHunter Acquisition ソフトウェア 12.1 を使用します。Agilent MassHunter Qualitative Analysis 12.0 ソフトウェアを使用して、取得したデータセットを視覚化し、定量の前にデータ品質を評価します。

LC/MS/MS データセットからの胆汁酸レベルの定量は、MassHunter Quantitative Analysis 12.0 ソフトウェアで行います。相対測定と絶対測定のための定量メソッドは、いずれかの品質管理 (QC) 注入で開発しました。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 15.1 で統計解析を実施しました。

## 胆汁酸の分離

BA の分離には、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、1.9 µm カラム (部品番号 695675-902) を使用し、18 分間の非直線グラジエントによる逆相クロマトグラフィーで行いました。このプロセスの後にカラムの洗浄と再平衡を行い、合計分析時間は 23 分になりました。表 3 に、最適化された LC 条件をまとめています。

表 3. クロマトグラフィー条件

液体クロマトグラフィー条件			
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、1.9 µm (p/n 695675902)		
カラム温度	50 °C		
注入量	2 µL、血漿/血清; 1 µL、糞便		
オートサンプリング温度	5 °C		
ニードル洗浄	標準洗浄、10 秒、70 % アセトニトリル		
移動相	A) 水 + 0.1 % ギ酸 B) アセトニトリル + 0.1 % ギ酸		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0.00	20	0.5
	1.50	20	0.5
	17.00	65	0.5
	17.10	98	0.5
	17.15	98	1.0
	19.50	98	1.0
	19.60	20	0.5
	22.00	20	0.5
合計分析時間	23 分		

これらのクロマトグラフィー条件下で、分析対象の異性体 BA や同重体 BA がほぼすべてベースピークレベルで分離されました (図 1 および 2)。1290 Infinity II Bio LC システムを用いたオミクスアプリケーションのためのアジレント標準構成では、直感的なメソッドでターゲットメタボロミクス、リビドミクス、プロテオミクスアプリケーションを切り替えることができます<sup>4</sup>。

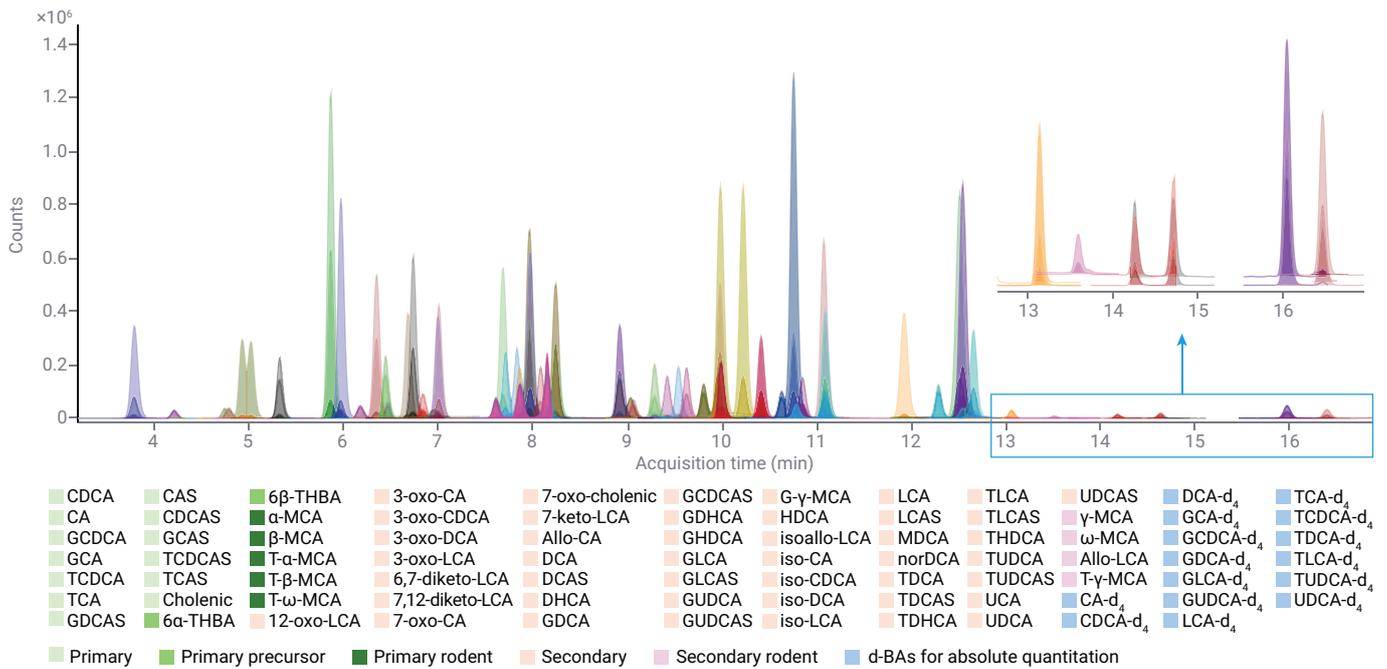


図 1. C-18 逆相クロマトグラフィーによる胆汁酸標準混合物のクロマトグラフィー分離

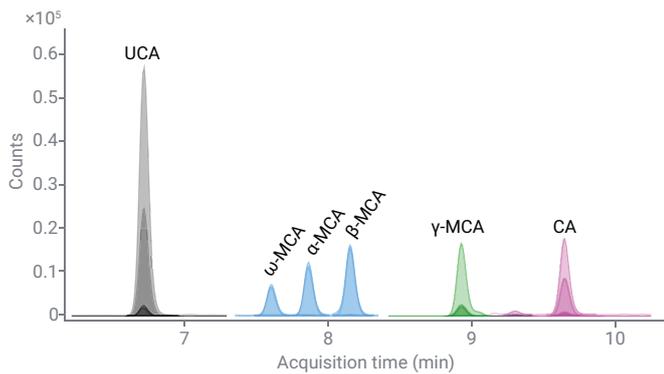


図 2. 関連する同重体胆汁酸のクロマトグラフィー分離。リテンションタイムを用いる標準手法は、MRM トランジションを共有することがある同重体種の分離において重要です。

### 関連する胆汁酸の絶対定量

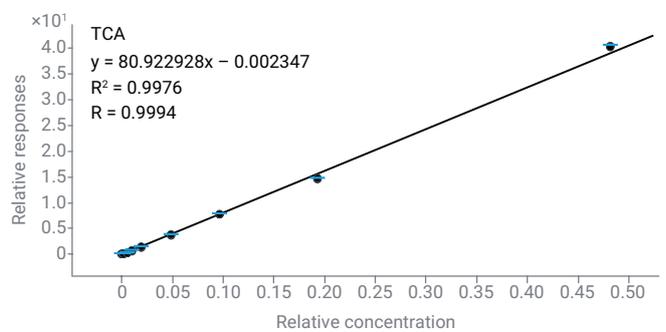
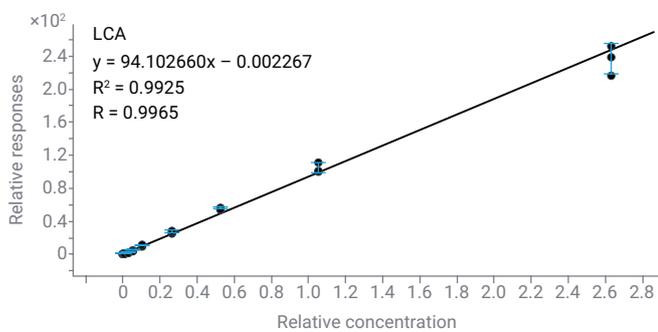
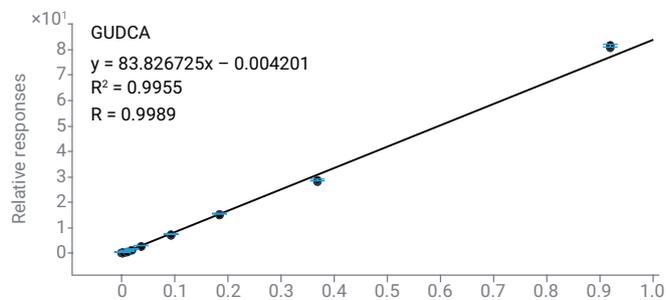
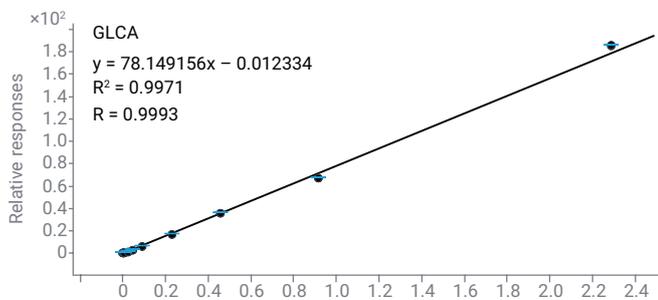
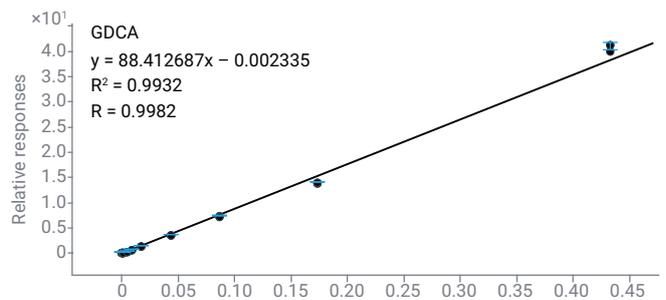
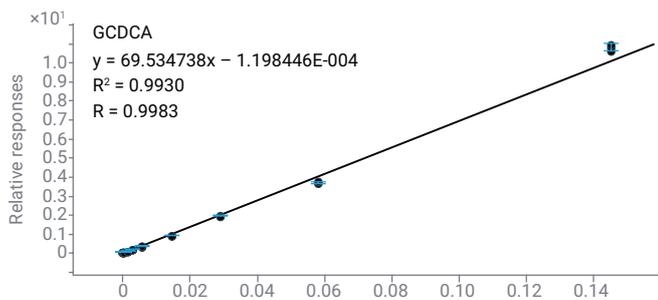
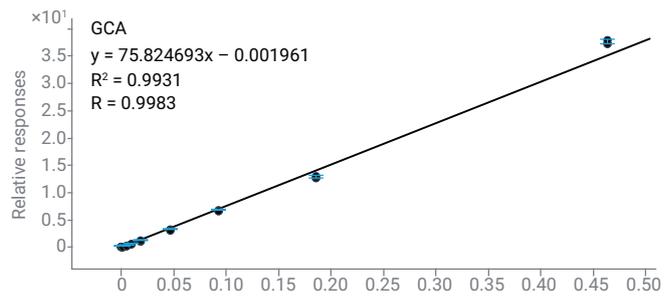
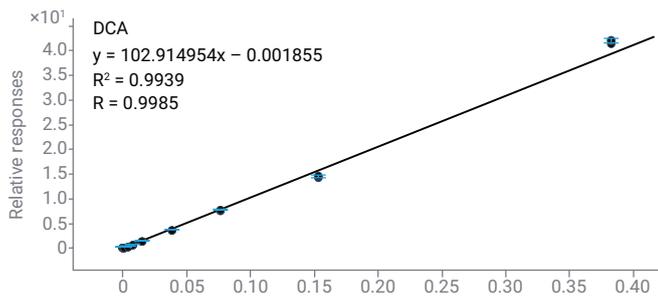
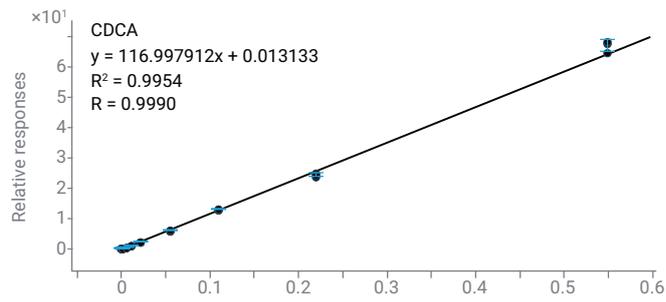
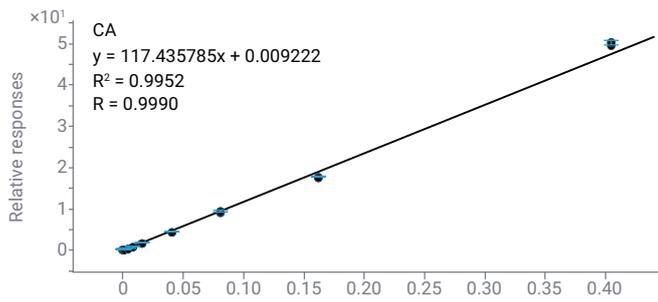
血漿および糞便サンプル中の 68 種類の内因性 BA を測定するための取り込みパラメータのほかに、LC/MS/MS 取り込みメソッドには Bile Acid Splash Lipidomix (Avanti Research) の 15 種類の重水素化胆汁酸 (d-BA) に対応する MRM トランジションとリテンションタイムが含まれます。これらを LC/MS/MS 取り込みメソッドの内部標準に指定し、対応する一次および二次血漿 BA の絶対定量で使用できます。

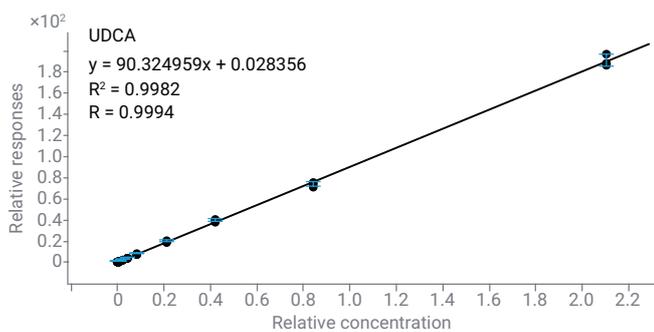
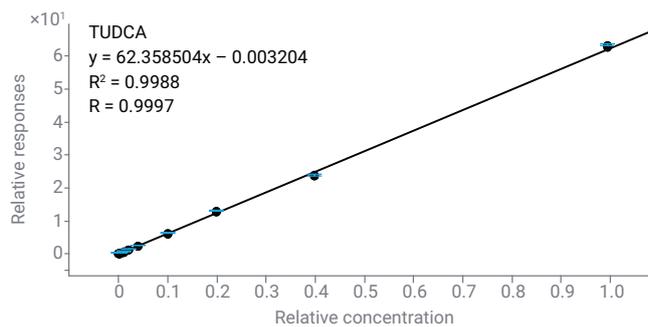
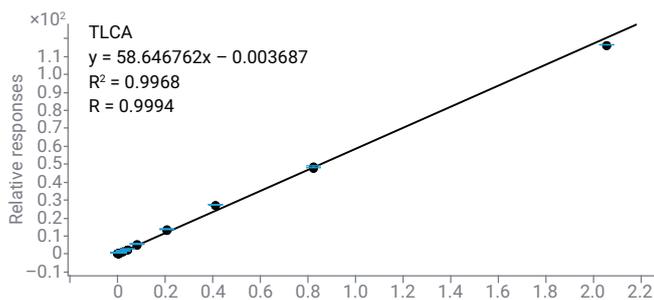
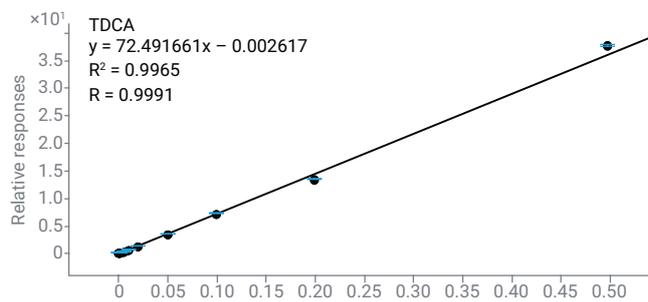
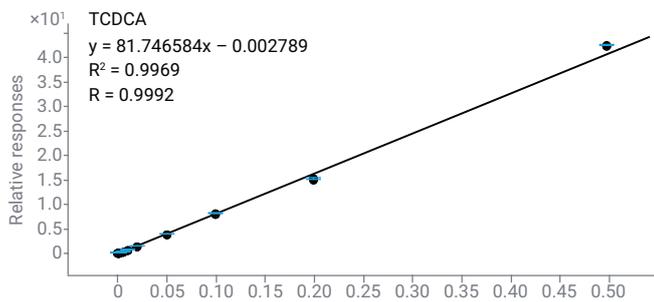
Bile Acid Splash Lipidomix をアセトニトリルと 0.1 % 酢酸で 100 倍に希釈し、血漿抽出溶媒を作成します。d-BA の濃度は表 4 のとおりです。純正標準原液から得られる外部検量線を用いて定量を行います。12 種類の標準溶液を使用し、それぞれに d-BA 混合物を添加して血漿サンプルと同じ濃度にします。

検量線は 0.1 ~ 2,500 ng/mL としました。R<sup>2</sup> > 0.99 の直線的レスポンスリプレーションの状況を一目で把握できる図が生成され、あらゆる検量線をすばやく処理し、ビューや化合物のサブセットに応じて表示をカスタマイズできます (図 3)。

表 4. Avanti d<sub>4</sub>-BA SPLASH の組成

名称	省略記号	Avanti SPLASH 標準混合液中の濃度 (nM)	絶対定量での使用
コール酸-d <sub>4</sub>	CA-d4	1,150	○
タウロコール酸-d <sub>4</sub> 、ナトリウム塩	TCA-d4	1,000	○
グリココール酸-d <sub>4</sub>	GCA-d4	1,150	○
デオキシコール酸-d <sub>4</sub>	DCA-d4	1,650	○
タウロデオキシコール酸-d <sub>4</sub> 、ナトリウム塩	TDCA-d4	1,000	○
グリコデオキシコール酸-d <sub>4</sub>	GDCA-d4	1,275	○
ケノデオキシコール酸-d <sub>4</sub>	CDCA-d4	1,150	○
タウロケノデオキシコール酸-d <sub>4</sub> 、ナトリウム塩	TCDCa-d4	1,000	○
グリコケノデオキシコール酸-d <sub>4</sub> 酸	GCDCA-d4	3,800	○
タウロウルソデオキシコール酸-d <sub>4</sub> 、ナトリウム塩	TUDCA-d4	500	○
グリコウルソデオキシコール酸-d <sub>4</sub>	GUDCA-d4	600	○
3β,5α,6β-トリヒドロキシコラン酸-d <sub>4</sub>	THCA-d4	250	×
リトコール酸-d <sub>4</sub>	LCA-d4	250	○
タウロリトコール酸-d <sub>4</sub> 、ナトリウム塩	TLCA-d4	250	○
グリコリトコール酸-d <sub>4</sub>	GLCA-d4	250	○
ウルソデオキシコール酸-d <sub>4</sub>	UDCA-d4	300	○
コレン酸-d <sub>4</sub>	Cholenic-d4	250	×





胆汁酸	R <sup>2</sup>	近似	重み付け
CA	0.995	線形	1/x
CDCA	0.995	線形	1/x
DCA	0.994	線形	1/x
GCA	0.993	線形	1/x
GCDCA	0.993	線形	1/x
GDCA	0.993	線形	1/x
GLCA	0.997	線形	1/x
GUDCA	0.995	線形	1/x

胆汁酸	R <sup>2</sup>	近似	重み付け
LCA	0.993	線形	1/x
TCA	0.998	線形	1/x
TCDC	0.997	線形	1/x
TDCA	0.997	線形	1/x
TLCA	0.997	線形	1/x
TUDCA	0.999	線形	1/x
UDCA	0.998	線形	1/x

図 3. 胆汁酸の検量線

### メソッドの堅牢性と再現性

LC/MS 取り込みメソッドの性能と再現性を評価するため、厳密なストレステストを行いました。10 匹のオスと 10 匹のメスのマウスの血漿 (BioIVT) を同量 (50  $\mu$ L) 混合して、プールされた血漿サンプルを調製しました。先ほど説明した最適化された血漿からの抽出方法に従って、Avanti d-BA Splash 混合物を添加したギ酸アセトニトリルを用いて胆汁酸を分離します。溶媒を除去した後、サンプルを 50 % メタノールに再溶解させて完全に混合し、6495D LC/MS システムに総取り込み時間 96 時間 (4 日間) で 250 回連続して注入します。

この大がかりな連続注入は、長期にわたるハイスループットの分析ワークフローをシミュレートした条件下でのメソッドの堅牢性を評価するためのものです。15 種類の d-BA に対応するピーク面積を MassHunter Quantitative Analysis 12.0 ソフトウェアで積分し、経時的なシグナル応答とリテンションタイムの再現性を評価しました。分析が長時間にわたるにもかかわらず、このメソッドはすぐれた性能を発揮しました。250 回の注入でのピーク面積測定の変動係数 (%CV) は 5 % 未満にとどまり、リテンションタイム (RT) に対する %CV の再現性は 0.15 % でした (図 4)。これらの結果により、このメソッドにおいて、長時間にわたる使用で一貫したシグナル強度とデータ品質を維持できることを確認しました。

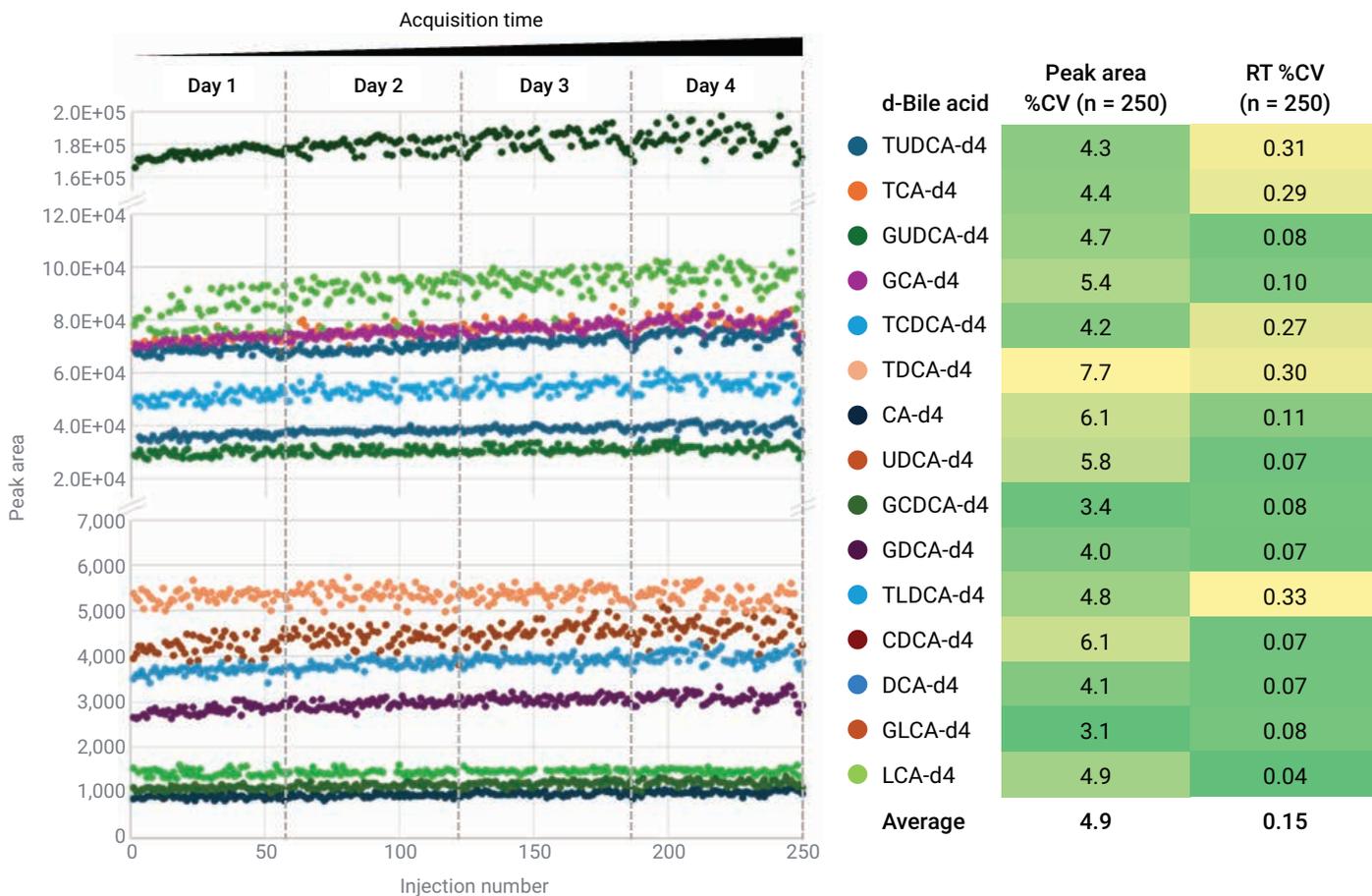


図 4. 4 日間にわたる取り込みでプールされた血漿サンプルを 250 回連続注入した後のメソッドの再現性の調査

## サンプル分析

生体マトリックスに対する LC/MS/MS メソッドの適応性を評価するため、代表的な血漿および糞便サンプル中の胆汁酸レベルを測定します。10 匹のオスと 10 匹のメスのマウスおよびラット (BioIVT) の一定量の血漿 (100  $\mu$ L) から BA を抽出します。抽出したマウスおよびラットの血漿を混合して調製したプールされた QC サンプルを注入し、サンプル分析前にカラムをマトリックスに合わせてコンディショニングして、データ取り込み中の機器のレスポンスをモニタリングします。すべてのげっ歯類血漿サンプルを種固有のブロックに分け、各ブロック内でランダムに注入しました。こうすることで、装置のレスポンスの分布が変動した場合も、サンプルグループ間で正確な比較を行うことができます。

LC/MS/MS 分析の後、MassHunter Quantitative Analysis 12.0 ソフトウェアで生データを処理します。胆汁酸のシグナルアブundance (ピーク面積) を使用して MassHunter 定量レポートを生成し、これを使用して下流ケモメトリックス分析用のデータを MPP にインポートします。または、積分ピーク面積を MassHunter Quantitative Analysis 12.0 ソフトウェアから Microsoft Excel の表としてエクスポートし、一般的なインポートオプションを使用して MPP に読み込むこともできます。このような柔軟性のため、Skyline などの外部ソフトウェアで LC/MS/MS の生データセットを処理する場合も、統計解析で MPP を使用できます。

健康なヒトおよび基礎疾患のあるヒトのドナーのコホートから収集した糞便 (Medix Biochemica) の BA 抽出物 (1  $\mu$ L) を分析し、処理して、MPP で評価します。一次 BA に加えて、関連する二次 BA を血漿サンプルと糞便サンプルで多数検出しました。

サンプルグループ間の違いを評価するため、MPP でデータセットの多変量解析を行います。階層的クラスター分析 (HCA) と主成分分析 (PCA) によって、血漿サンプル中の胆汁酸組成を明らかにします。PCA によって、げっ歯類のバイオリジカルレプリケート間でサンプルが適切にグルーピングされていることが示されました。主成分 1 (PC1、49%) で動物種ごとに顕著に分離され、主成分 2 (PC2、9%) で性別ごとに適度に分離されています (図 5A)。これに対し、糞便サンプルグループ間では大きなばらつきは見られませんでした (データは示していません)。

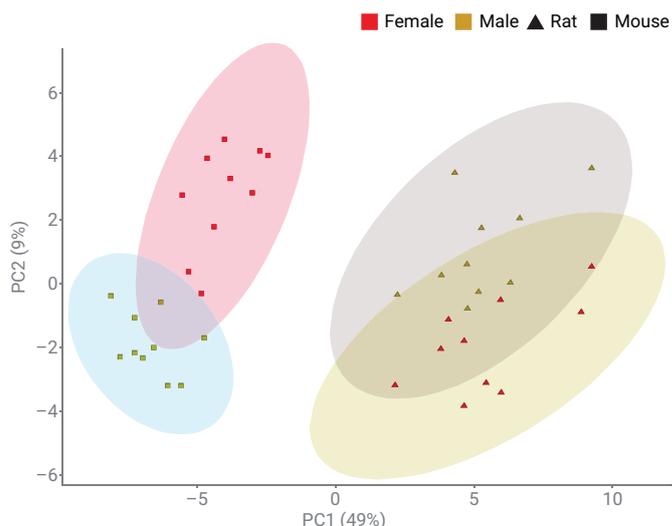


図 5A. 主成分分析 (PCA) でサンプルグループ間の BA 分布の違いが示されました。

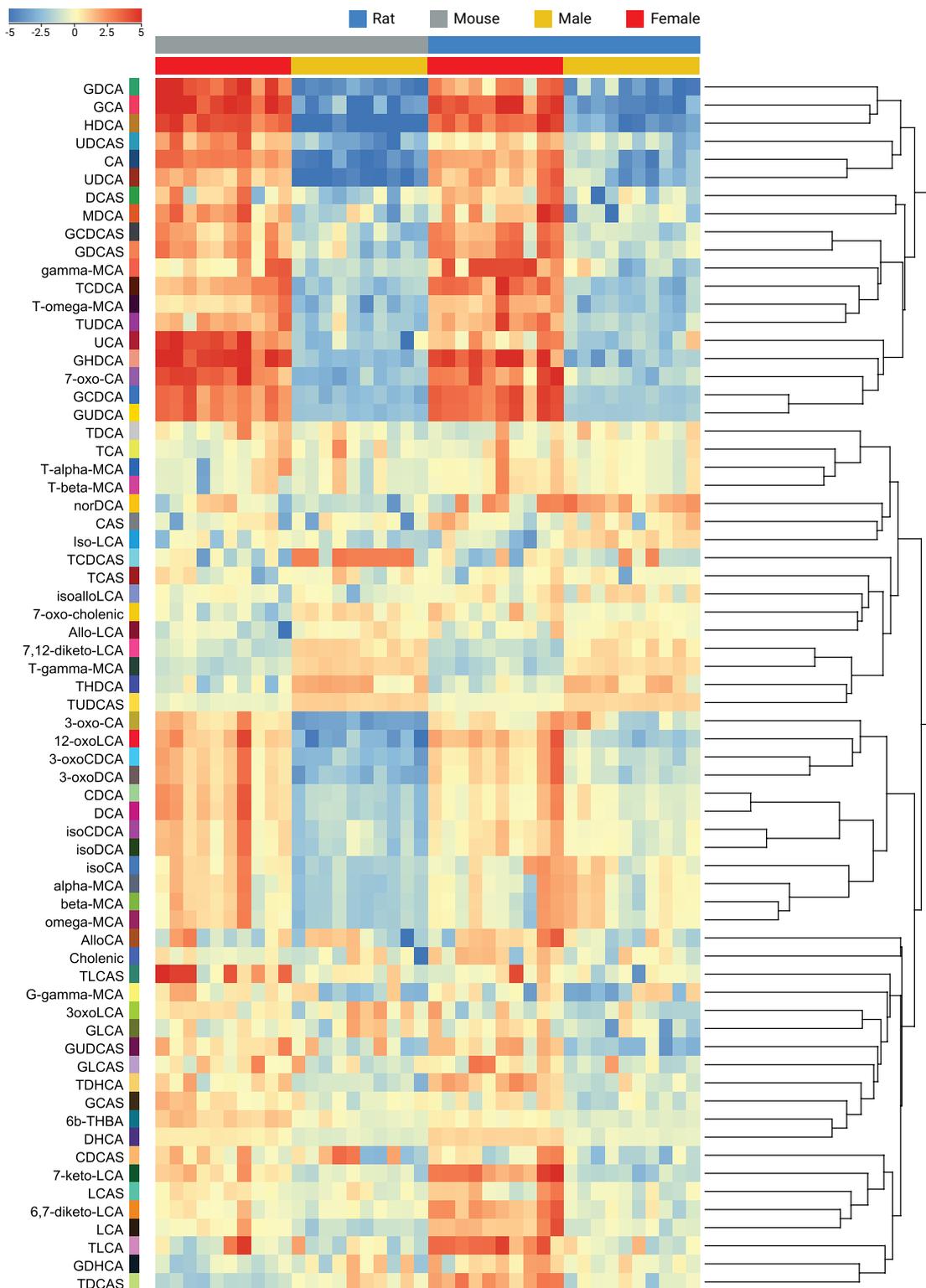


図 5B. 階層的クラスタリングでサンプルグループ間の BA 分布の違いが示されました。

## 結論

LC/MS/MS による、胆汁酸の分析のための堅牢な標準ターゲットダイナミック MRM メソッドを、Agilent 6495D トリプル四重極/LC プラットフォームで開発しました。血漿および糞便サンプルからの最適な胆汁酸抽出条件と、1 回のクロマトグラフィー分析で多くの種類の胆汁酸を測定できる LC/MS 条件を確立しました。この分析メソッドは汎用性が高く、血漿/血清および糞便サンプルの両方に適用することができ、全身および腸特有の胆汁酸プロファイルに関する貴重な知見をもたらします。血漿では、肝機能、代謝の健全性、疾病状態の重要な指標となる胆汁酸の循環を評価するための信頼できる手段になります。糞便サンプルでは、腸内微生物叢の相互作用や腸の健全性に関する胆汁酸の詳細なプロファイルリングを行い、消化と腸肝循環の仕組みを明らかにすることができます。

## 参考文献

1. Sartain, M.; et al. 腸内微生物叢からの胆汁酸をターゲットとする精密な LC/MS/MS メソッド, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4956JAJP, **2023**.
2. Van de Bittner, G. C.; et al. 哺乳類細胞サンプル用の代謝物 + 脂質のデュアル自動化サンプル前処理ワークフロー, Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-5065JAJP, **2022**.
3. Sartain, M.; et al. Enabling Automated, Low-Volume Plasma Metabolite Extraction with the Agilent Bravo Platform, Agilent Technologies application note, publication number 5994-2156EN, **2020**.
4. 安定したパフォーマンスの LC/TQ プラットフォームを用いた精査されたターゲットオミックスのワークフロー, Agilent Technologies flyer, publication number 5994-7447JAJP, **2024**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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おりません。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。

RA250421.245

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, July 8, 2025

5994-8263JAJP