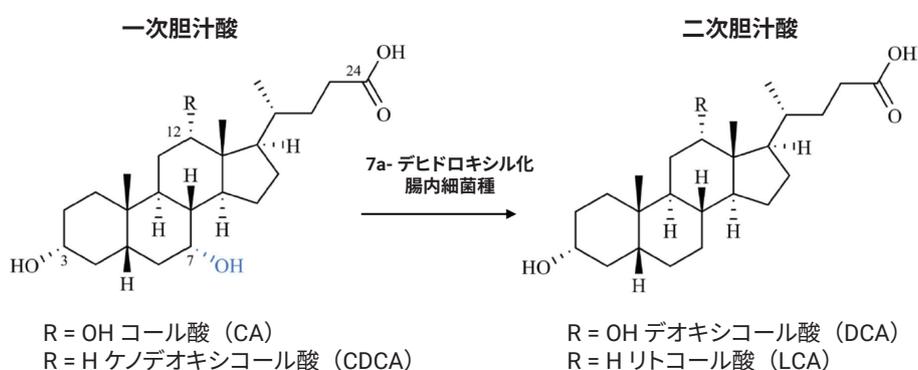


腸内微生物叢からの胆汁酸を ターゲットとする 精密な LC/MS/MS メソッド



著者

Mark Sartain
 Agilent Technologies, Inc.
 Santa Clara, California, USA

Ariel R. Brumbaugh and
 Michael A. Fischbach
 Department of Bioengineering
 Stanford University
 Stanford, California, USA

Justin R. Cross
 Donald B. and Catherine C.
 Marron Cancer Metabolism
 Center
 Memorial Sloan Kettering
 Cancer Center
 New York City, New York, USA

はじめに

二次胆汁酸は最もアバundanceが高くて変化しやすい微生物叢由来の代謝物であり、宿主の生理機能に影響を与えることが示されています。しかし、個々の組成の違い、生物学的活性、バクテリア株、生成時の分子経路の多くが未解明です¹。

最近ではサンプル前処理に手間のかかる確立済みの GC/MS アプローチの代わりとして、ターゲット LC/MS メソッドでの胆汁酸のプロファイリングへの関心が高まっています。このアプリケーションノートでは、構造が近い胆汁酸異性体を効率よく分離すると同時に、カラムで脂質が蓄積する問題も解決してメソッドの堅牢性を向上させるために、独自の移動相システムによるクロマトグラフィーメソッドを開発しました。LC メソッドに加え、最適化された MRM パラメータを使用してトリプル四重極質量分析計を操作し、胆汁酸の高感度かつ特異的な検出を実現しました。

実験方法

試薬および調製

すべての試薬と溶媒には、HPLC または LC/MS グレードのものを使用しました。アセトン、アセトニトリル、メタノールは Honeywell (モリスタウン、ニュージャージー州、米国) から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm ユースポイントメンブレンフィルタカートリッジ (EMD Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。移動相の添加剤には、ギ酸 (Optima LC/MS グレード、Fisher、フェアローン、ニュージャージー州) と MS グレードの酢酸アンモニウム (Sigma-Aldrich Corp.、セントルイス、ミズーリ州、米国) を使用しました。

代表的な一次胆汁酸、二次胆汁酸、抱合胆汁酸である 26 種類の純正標準試料を分析して、最適化された MRM 取り込みデータベースを精査しました。定量下限 (LLOQ) を確立するため、50/50 メタノール/水で 100 pM ~ 10 μM の濃度の標準溶液を 16 種類調製しました。

サンプル前処理

無菌のマウス 3 匹と従来の方法で飼育されたマウス 3 匹の糞 (20 ~ 154 mg) を収集します。糞を計量し、セラミックビード 6 個とメタノール 200 μL が入ったホモジナイズチューブに添加します。Qiagen TissueLyser II (Qiagen、ヒルデン、ドイツ) で 20 分間糞をホモジナイズし、10 分間遠心分離します (16,000 × g、23 °C)。メタノール 100 μL を、水 100 μL が入った新しいチューブに添加します。チューブをもう一度遠心分離し、メタノール/水混合溶液 100 μL を MS バイアルに添加します。

4 倍量のメタノールを用い、NIST SRM 1950 血漿を氷の上で 20 分間インキュベートし、16,000 × g、4 °C で 15 分間遠心分離して、糞のタンパク質を抽出します。真空濃縮器で上清を乾燥させ、抽出物を 50/50 メタノール/水に再溶解させて、LC/MS 分析で使用します。

使用装置

Agilent 1290 Infinity II LC は以下の構成です。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ、サーモスタット付き (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

- Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS システム、Agilent Jet Stream 技術イオン源搭載

メソッド

LC/MS の条件とパラメータを以下の表に示します。

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II LC																																	
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (p/n 693775-902)																																	
ガードカラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 Fast Guard, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm (p/n 821725-911)																																	
カラム温度	45 °C																																	
注入量	5 μL																																	
オートサンブラ温度	4 °C																																	
ニードル洗浄	フラッシュポートで 10 秒間 (50/50 メタノール/水)																																	
移動相	A) 20 mM 酢酸アンモニウム + 0.1 % ギ酸 B) 0.1 % ギ酸アセトン溶液																																	
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間</th> <th>%B</th> <th>流量 (μL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.00</td><td>32</td><td>200</td></tr> <tr><td>6.00</td><td>32</td><td>200</td></tr> <tr><td>6.10</td><td>32</td><td>400</td></tr> <tr><td>25.00</td><td>65</td><td>400</td></tr> <tr><td>25.10</td><td>100</td><td>400</td></tr> <tr><td>26.30</td><td>100</td><td>500</td></tr> <tr><td>26.40</td><td>100</td><td>1,000</td></tr> <tr><td>28.00</td><td>100</td><td>1,000</td></tr> <tr><td>28.10</td><td>32</td><td>400</td></tr> <tr><td>32.10</td><td>32</td><td>400</td></tr> </tbody> </table>	時間	%B	流量 (μL/min)	0.00	32	200	6.00	32	200	6.10	32	400	25.00	65	400	25.10	100	400	26.30	100	500	26.40	100	1,000	28.00	100	1,000	28.10	32	400	32.10	32	400
時間	%B	流量 (μL/min)																																
0.00	32	200																																
6.00	32	200																																
6.10	32	400																																
25.00	65	400																																
25.10	100	400																																
26.30	100	500																																
26.40	100	1,000																																
28.00	100	1,000																																
28.10	32	400																																
32.10	32	400																																
ストップタイム	32.10 min																																	
実測カラム圧力	260 ~ 540 bar																																	

パラメータ	Agilent 6470 LC/TQ
極性	ポジティブとネガティブの切り替え
時間セグメント	1) 0.0 ~ 4.0 分、切り替えバルブおよび廃液 2) 4.0 ~ 25.5 分、切り替えバルブおよび MS (分析) 3) 25.5 ~ 32.0 分、切り替えバルブおよび廃液
ガス温度	200 °C
乾燥ガス (窒素)	12 L/min
ネプライザガス	40 psi
シースガス	200 °C
シースガス流量	10 L/min
キャピラリー電圧	4,500 V (+)、-3,000 V (-)
ノズル電圧	2,000 V (+)、0 V (-)
スキャンタイプ	ダイナミック MRM (dMRM)
Q1/Q2 分解能	ユニット (0.7 amu)
デルタ EMV	200 V
セル加速電圧	4 V
サイクル時間	750 ms
MRM の総数	84 (ポジティブ 78、ネガティブ : 6)
最小/最大ドウェルタイム	24.94/748.01 ms

データ解析

MRM データは、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアバージョン 10.2 で定量しました。検量線は、重み付け $1/x$ または $1/x^2$ の二次近似を使用しました。一部のデータには、一致する定量標準がなく、サロゲート標準を使用して内因性濃度を概算しました。Allo-LCA および Iso-LCA については LCA 検量線を使用し、Muro-CA および TUDCA については UDCA を使用し、TCDCA および TDCA については GCDCA を使用しました。記録した糞の質量を用いて最終濃度 nmol/g を計算しました。定量分析レポートを生成し、Pathway Architect モジュールが搭載された Agilent MassHunter Mass Profiler Professional ソフトウェア (MPP) バージョン 15.1 による差分解析の入力として使用しました。

結果と考察

クロマトグラフィーと MRM の最適化

一般的に、胆汁酸はメタノールを用いる抽出方法で複雑な生体サンプルから抽出されます。しかし、このような単純な抽出方法では分析カラムに脂質が蓄積し、LC/MS による胆汁酸分析の妨げになることが多くのレポートで指摘されています。その結果、カラム背圧の上昇や複数回注入時のリテンションタイムのドリフトといった影響が見られます。サンプルタンパク変性沈殿処理の後、オフライン固相抽出 (SPE) によるクリーンアップの代わりに LC 移動相をいくつか組み合わせることで、胆汁酸異性体の分離能を維持しながら脂質分子の干渉を除去できるかを調査しました。溶離溶媒としてのアセトンには、各分析後にホスファチジルコリン (PC) 脂質を溶出できるという

固有の特性があり、これによって複雑なサンプルでのメソッドの堅牢性を向上できることがわかりました。血漿でこの所見を確認し、高濃度の B でグラジエントを 3 分間保持した場合にアセトンが問題のリン脂質とトリアシルグリセロール (TAG) を溶出することが示されました (図 1)。流量を 1 mL/min に増やし、その間に LC 流路を最終 dMRM メソッドの廃液ラインへ送ることで、この高速脂質溶出ステップをある程度実現しました。アセトンは粘度が低いため、流量を増やしてもカラム背圧を許容範囲内に保つことができます。

タンデム四重極 (TQ) ベースのメソッドで分析対象物の特異性が高くなるように設計された移動相組成の追加調整を行いました。CID プロセスに対するステロイド骨格の耐性のため、ネガティブイオンモードでは非抱合型胆汁酸は非常に弱いフラグメントイオンを生成します。そのため、MRM スキャンの代わりに、多くの LC/MS メソッドで選択イオンモニタリング (SIM) を使用して定量を行います。この場合、四重極スキャンのたびにフラグメンテーションなしの、同じ脱プロトン化されたプリ

カーサ m/z を選択します。しかし、複雑なマトリックスでは特に、SIM モードの TQ 機器のユニット質量分解能で特異性と S/N 比が低下することがよくあります。Wegner ^ら2 は、 $[M+NH_4]^+$ 胆汁酸プリカーサの MRM ベースのスキャンは $[M-H]^-$ イオンの SIM ベースのスキャンより優れていることを発見しました。移動相 A の最終濃度 20 mM に酢酸アンモニウムを添加することで、 NH_3 および複数の H_2O 分子の損失に応じた胆汁酸 $[M+NH_4]^+$ イオンの形成が促進され、CID フラグメンテーションは強いプロダクトイオンになります。この研究によってこれらの所見を確認し、これらのプロダクトイオンで作成された複数の MRM トランジションによって、生体サンプル中のマトリックスからの干渉が原液に比べて減り、分析の選択性が向上することが示されました (図 2)。このように、このメソッドでターゲットとなるほとんどの胆汁酸で MRM の選択性を活用できます。ただし、6 種類の胆汁酸はポジティブイオンモードでのイオン化がまだ不十分であったため、引き続きネガティブ SIM モードで脱プロトン化されたプリカーサの検出

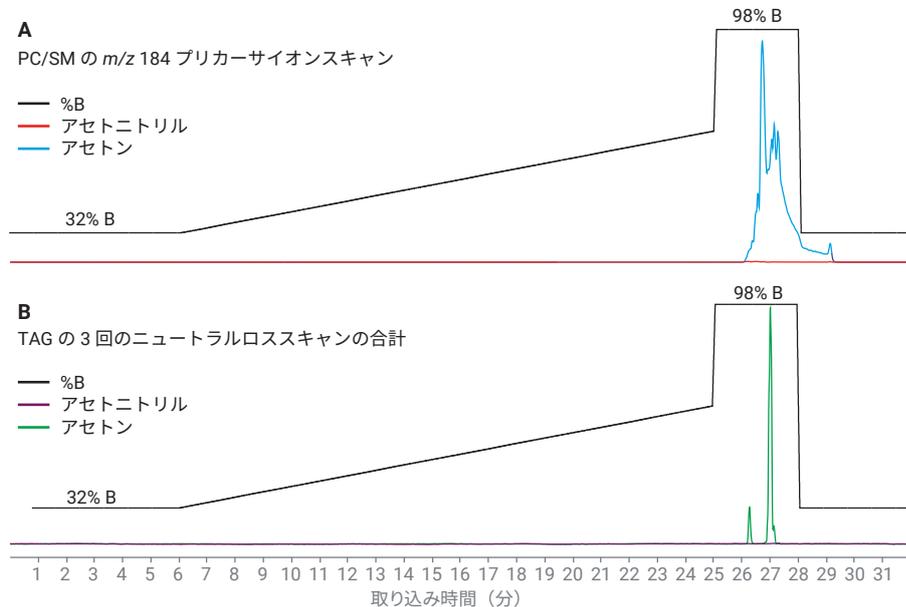


図 1. 移動相 B で溶離溶媒としてアセトニトリルまたはアセトンを用いた除タンパクした血漿からのホスファチジルコリン/スフィンゴミエリン (PC/SM) の溶出 (A) とトリアシルグリセロール (TAG) の溶出 (B) の比較。ギ酸アンモニウムをポストカラム法で注入し、TAG のイオン化を実現しました。

を行いました。表 1 は最適化された MRM トランジションの情報と観察された標準のリテンションタイムを示しています。最適化されたパラメータはほかの Agilent LC/TQ モデルに直接転送できます。

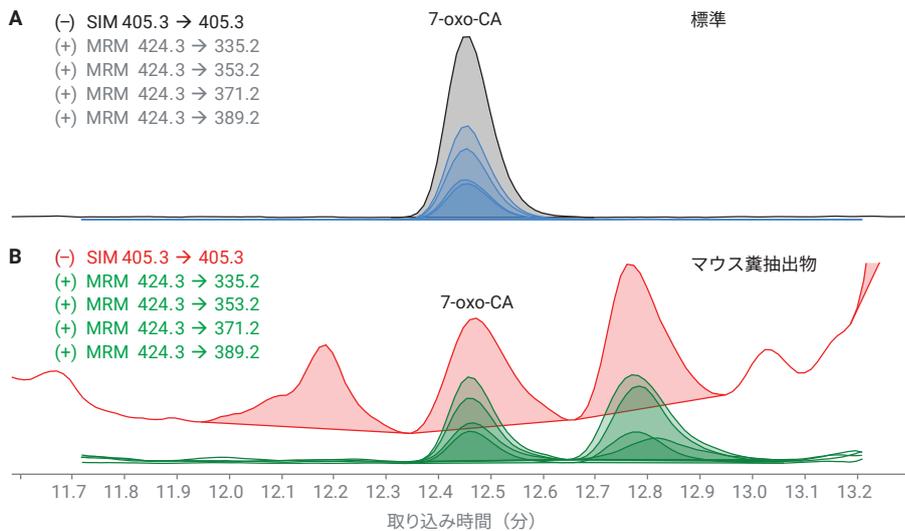


図 2. 原液中の 100 ppb 標準の 7-oxo-CA の MRM スキャンと SIM スキャンの比較 (A) およびマウス糞抽出物中の内因性 7-oxo-CA (B)

表 1. 最適化された MRM トランジション

化合物名	慣用名	Steraloids の命名規則	分類	CAS ID	極性/ プリカーサ種	スキャン タイプ	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	Δ RT	フラグメンター V	CE
T-Alpha-MCA	タウロ- α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25613-05-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	516.3	5.1	1.5	102	4
T-Alpha-MCA	タウロ- α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25613-05-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	480.2	5.1	1.5	102	12
T-Alpha-MCA	タウロ- α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25613-05-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	462.2	5.1	1.5	102	24
T-Alpha-MCA	タウロ- α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25613-05-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	126	5.1	1.5	102	32
T-Beta-MCA	タウロ- β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25696-60-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	516.3	5.33	1.5	112	4
T-Beta-MCA	タウロ- β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25696-60-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	480.2	5.33	1.5	112	16
T-Beta-MCA	タウロ- β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25696-60-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	462.2	5.33	1.5	112	20
T-Beta-MCA	タウロ- β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)- AMIDE	抱合一次ム リコール酸	25696-60-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	126	5.33	1.5	112	32

化合物名	慣用名	Steraloids の命名規則	分類	CAS ID	極性/ プリカーサ種	スキャン タイプ	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	Δ RT	フラグメンター V	CE
TUDCA	タウロウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸 (げっ歯類)、抱合二次胆汁酸 (ヒト)	14605-22-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	500.3	8.15	1.5	102	4
TUDCA	タウロウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸 (げっ歯類)、抱合二次胆汁酸 (ヒト)	14605-22-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	464.2	8.15	1.5	102	16
TUDCA	タウロウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸 (げっ歯類)、抱合二次胆汁酸 (ヒト)	14605-22-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	126	8.15	1.5	102	40
TUDCA	タウロウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β , -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸 (げっ歯類)、抱合二次胆汁酸 (ヒト)	14605-22-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	81.1	8.15	1.5	102	68
TCA	タウロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)	抱合一次胆汁酸	81-24-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	480.2	8.88	1.5	114	16
TCA	タウロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)	抱合一次胆汁酸	81-24-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	462.2	8.88	1.5	114	24
TCA	タウロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)	抱合一次胆汁酸	81-24-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	337.2	8.88	1.5	114	32
TCA	タウロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(2-SULPHOETHYL)	抱合一次胆汁酸	81-24-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	533.3	126	8.88	1.5	114	52
GUDCA	グリコウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 β -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	64480-66-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	432.3	10.95	1.5	112	4
GUDCA	グリコウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 β -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	64480-66-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	414.3	10.95	1.5	112	12
GUDCA	グリコウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 β -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	64480-66-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	339.3	10.95	1.5	112	20
GUDCA	グリコウルソデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 β -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	64480-66-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	76	10.95	1.5	112	28
GHDCa	グリコヒオデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次ムリコール酸	13042-33-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	432.3	11.35	1.5	110	8
GHDCa	グリコヒオデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次ムリコール酸	13042-33-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	414.3	11.35	1.5	110	12
GHDCa	グリコヒオデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次ムリコール酸	13042-33-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	81.1	11.35	1.5	110	60
GHDCa	グリコヒオデオキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次ムリコール酸	13042-33-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	76.1	11.35	1.5	110	32

化合物名	慣用名	Steraloids の命名規則	分類	CAS ID	極性/ プリカーサ種	スキャン タイプ	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	Δ RT	フラグメンター V	CE
GCA	グリココール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(CARBOXYMETHYL)	抱合一次胆汁酸	475-31-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	483.3	466.3	11.41	1.5	100	8
GCA	グリココール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(CARBOXYMETHYL)	抱合一次胆汁酸	475-31-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	483.3	430.3	11.41	1.5	100	16
GCA	グリココール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(CARBOXYMETHYL)	抱合一次胆汁酸	475-31-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	483.3	412.3	11.41	1.5	100	20
GCA	グリココール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL N-(CARBOXYMETHYL)	抱合一次胆汁酸	475-31-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	483.3	337.2	11.41	1.5	100	28
7-oxo-CA	7-オキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL-7-ONE	二次胆汁酸	911-40-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	389.2	12.38	1.5	112	8
7-oxo-CA	7-オキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL-7-ONE	二次胆汁酸	911-40-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	371.2	12.38	1.5	112	16
7-oxo-CA	7-オキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL-7-ONE	二次胆汁酸	911-40-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	353.2	12.38	1.5	112	16
7-oxo-CA	7-オキシコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL-7-ONE	二次胆汁酸	911-40-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	335.2	12.38	1.5	112	24
TCDCa	タウロケノデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸	516-35-8	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	500.3	12.47	1.5	112	4
TCDCa	タウロケノデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸	516-35-8	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	464.2	12.47	1.5	112	20
TCDCa	タウロケノデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸	516-35-8	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	126	12.47	1.5	112	44
TCDCa	タウロケノデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合一次胆汁酸	516-35-8	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	81.1	12.47	1.5	112	72
TDCA	タウロデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	516-50-7	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	500.3	13.26	1.5	102	8
TDCA	タウロデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	516-50-7	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	482.3	13.26	1.5	102	12
TDCA	タウロデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	516-50-7	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	464.3	13.26	1.5	102	20
TDCA	タウロデオキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(2-SULPHOETHYL)-AMIDE	抱合二次胆汁酸	516-50-7	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	517.3	126	13.26	1.5	102	48
Alpha-MCA	α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α -TRIOL	一次ムリコール酸	2393-58-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	373.2	13.61	1.5	112	8
Alpha-MCA	α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α -TRIOL	一次ムリコール酸	2393-58-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	355.2	13.61	1.5	112	16
Alpha-MCA	α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α -TRIOL	一次ムリコール酸	2393-58-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	159.1	13.61	1.5	112	28
Alpha-MCA	α -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 α -TRIOL	一次ムリコール酸	2393-58-0	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	105	13.61	1.5	112	68

化合物名	慣用名	Steraloids の命名規則	分類	CAS ID	極性/ プリカーサ種	スキャン タイプ	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	Δ RT	フラグメンター V	CE
Beta-MCA	β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β -TRIOL	一次ムリ コール酸	2393-59-1	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	373.2	14.08	1.5	102	12
Beta-MCA	β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β -TRIOL	一次ムリ コール酸	2393-59-1	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	355.2	14.08	1.5	102	20
Beta-MCA	β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β -TRIOL	一次ムリ コール酸	2393-59-1	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	159.1	14.08	1.5	102	32
Beta-MCA	β -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β , 7 β -TRIOL	一次ムリ コール酸	2393-59-1	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	105	14.08	1.5	102	64
3-oxo-CA	3-オキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-7 α , 12 α -DIOL-3-ONE	二次胆汁酸	2304-89-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	353.2	14.78	1.5	142	20
3-oxo-CA	3-オキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-7 α , 12 α -DIOL-3-ONE	二次胆汁酸	2304-89-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	335.2	14.78	1.5	142	28
3-oxo-CA	3-オキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-7 α , 12 α -DIOL-3-ONE	二次胆汁酸	2304-89-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	55.1	14.78	1.5	142	80
3-oxo-CA	3-オキソコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-7 α , 12 α -DIOL-3-ONE	二次胆汁酸	2304-89-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	424.3	371.2	14.78	1.5	142	20
Gamma-MCA	γ -ムリコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 α , 7 α -TRIOL	二次ムリ コール酸	547-75-1	ネガティブ/[M- H] ⁻	SIM	407.3	407.3	15.07	1.5	294	0
Muro-CA	μ ロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β -DIOL	二次ムリ コール酸	668-49-5	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	357.3	15.2	1.5	112	8
Muro-CA	μ ロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β -DIOL	二次ムリ コール酸	668-49-5	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	95.1	15.2	1.5	112	44
Muro-CA	μ ロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β -DIOL	二次ムリ コール酸	668-49-5	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	81.1	15.2	1.5	112	48
Muro-CA	μ ロコール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 β -DIOL	二次ムリ コール酸	668-49-5	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	67.1	15.2	1.5	112	72
GCDCA	グリコケノデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合一次胆 汁酸	640-79-9	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	432.3	15.321	1.5	114	8
GCDCA	グリコケノデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合一次胆 汁酸	640-79-9	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	414.3	15.321	1.5	114	16
GCDCA	グリコケノデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合一次胆 汁酸	640-79-9	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	76.1	15.321	1.5	114	36
GCDCA	グリコケノデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合一次胆 汁酸	640-79-9	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	55.1	15.321	1.5	114	80
CA	コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL	一次胆汁酸	81-25-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	373.2	15.91	1.5	112	12
CA	コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL	一次胆汁酸	81-25-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	355.2	15.91	1.5	112	20
CA	コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL	一次胆汁酸	81-25-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	105	15.91	1.5	112	72
CA	コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α , 12 α -TRIOL	一次胆汁酸	81-25-4	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	426.3	55.1	15.91	1.5	112	80
GDCA	グリコデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆 汁酸	360-65-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	414.3	16.07	1.5	108	12

化合物名	慣用名	Steraloids の命名規則	分類	CAS ID	極性/ プリカーサ種	スキャン タイプ	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	Δ RT	フラグメンター V	CE
GDCA	グリコデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆 汁酸	360-65-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	339.2	16.07	1.5	108	24
GDCA	グリコデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆 汁酸	360-65-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	105	16.07	1.5	108	76
GDCA	グリコデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	抱合二次胆 汁酸	360-65-6	ポジティブ/ [M+H] ⁺	MRM	450.3	55.1	16.07	1.5	108	80
UDCA	ウルソデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	一次胆汁 酸 (げっ歯 類)、二次胆 汁酸 (ヒト)	128-13-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	357.2	16.11	1.5	102	8
UDCA	ウルソデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	一次胆汁 酸 (げっ歯 類)、二次胆 汁酸 (ヒト)	128-13-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	105	16.11	1.5	102	60
UDCA	ウルソデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	一次胆汁 酸 (げっ歯 類)、二次胆 汁酸 (ヒト)	128-13-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	81.1	16.11	1.5	102	56
UDCA	ウルソデオキシ コール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL N-(CARBOXYMETHYL)-AMIDE	一次胆汁 酸 (げっ歯 類)、二次胆 汁酸 (ヒト)	128-13-2	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	55.1	16.11	1.5	102	80
HDCA	ヒオデオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 6 α -DIOL	二次ムリ コール酸	83-49-8	ネガティブ/ [M-H] ⁻	SIM	391.3	391.3	16.48	1.5	246	0
7-ketoLCA	7-ケトリトコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α -OL-7-ONE	二次胆汁酸	4651-67-6	ネガティブ/ [M-H] ⁻	SIM	389.3	389.3	16.82	1.5	248	0
CDCA	ケノデオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL	一次胆汁酸	474-25-9	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	357.2	19.93	1.5	92	8
CDCA	ケノデオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL	一次胆汁酸	474-25-9	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	95.1	19.93	1.5	92	44
CDCA	ケノデオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL	一次胆汁酸	474-25-9	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	81.1	19.93	1.5	92	56
CDCA	ケノデオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 7 α -DIOL	一次胆汁酸	474-25-9	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	55.1	19.93	1.5	92	76
DCA	デオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL	二次胆汁酸	83-44-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	357.2	20.46	1.5	110	12
DCA	デオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL	二次胆汁酸	83-44-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	95.1	20.46	1.5	110	52
DCA	デオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL	二次胆汁酸	83-44-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	81.1	20.46	1.5	110	56
DCA	デオキシコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α , 12 α -DIOL	二次胆汁酸	83-44-3	ポジティブ/ [M+NH ₄] ⁺	MRM	410.3	67.1	20.46	1.5	110	68
AlloLCA	イソアロリトコ ール酸	5 α -CHOLANIC ACID-3 β -OL	アロ型二次 胆汁酸	2276-93-9	ネガティブ/ [M-H] ⁻	SIM	375.3	375.3	22.23	1.5	218	0
IsoLCA	イソリトコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 β -OL	二次胆汁酸	1534-35-6	ネガティブ/ [M-H] ⁻	SIM	375.3	375.3	23.02	1.5	238	0
LCA	リトコ ール酸	5 β -CHOLANIC ACID-3 α -OL	二次胆汁酸	434-13-9	ネガティブ/ [M-H] ⁻	SIM	375.3	375.3	24.24	1.5	248	0

水-アセトンベースの移動相では、胆汁酸異性体の良好な分離が保たれました (図 3)。マウスモデルシステムの胆汁酸で主に分析対象となる 26 種類中 24 種類の胆汁酸のベースライン分離と早期に溶出するタウロα- および β-MCA の部分的な分離を実現できるように、グラジエントを最適化しました。

堅牢性

堅牢性を評価するため、標準を添加したマウス盲腸抽出物を 200 回注入し、4 日以上中断なしで分析しました (図 4)。独自の LC/MS 溶媒システムで、最小限のサンプル前処理でも

優れたリテンションタイムの再現性を実現できました。MRM ピーク面積の総平均 CV は各胆汁酸で 2.7 % でした。また、リテンションタイムの総平均 CV も各胆汁酸で 0.2 % 未満であり、優れた再現性が示されました。一部のサンプルでは、分析対象物を複数回注入するにつれて (n = 50)、分離ピーク形状が明らかに悪化し始めました。このピーク形状の悪化の主な原因は、ガードカラムのヘッドへのタンパク変性沈殿処理であると推測されます。メタノールベースのタンパク変性沈殿処理ステップでサンプルを前処理していますが、メタ

ノールでは一般的なサンプルからタンパク質を完全に除去できないことが知られています。今後の実験では、代替のタンパク変性沈殿処理溶媒や試薬を評価することや、分析前に 3,000 MWCO の限外ろ過ステップでサンプルから残留タンパク質を除去できる可能性があります。また、ガードカラムの交換やイソプロパノールによる単純な洗浄によってピーク形状を完全に回復できることがわかりました。後者の手順はサンプルバッチ間で手軽に実行できます。

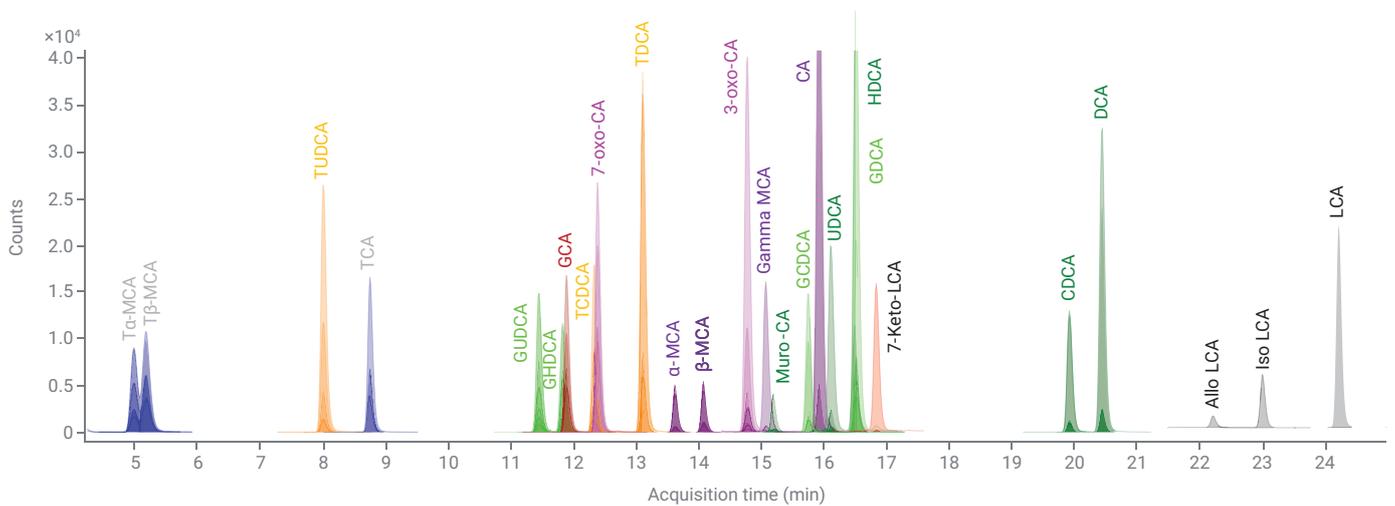


図 3. 最終的な dMRM LC/MS メソッドで取得した胆汁酸標準の混合物の MRM クロマトグラムと SIM クロマトグラムの重ね表示。同じプリカーサー m/z を共有する同体重胆汁酸を色で識別しています。

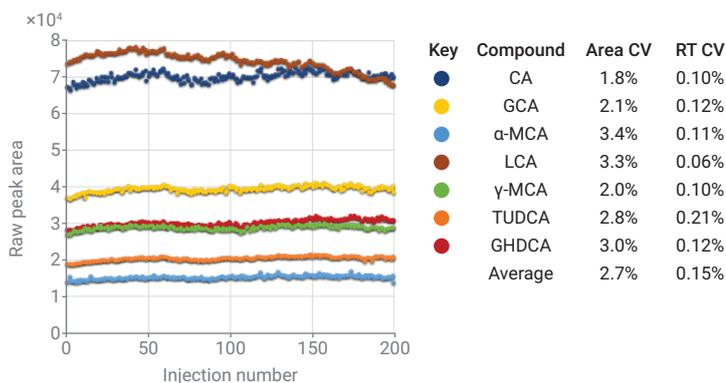


図 4. 7 種類の代表的な胆汁酸の経時的な MRM レスポンス (左)。対応する MRM ピーク面積と RT の CV (右)

定量

26 種類中 20 種類の標準を原液で希釈し、LOD である 100 pM ~ 10 μM の範囲の 16 種類の標準濃度で評価しました。優れた分析精度 (LLOQ で RSD % < 20 %、他のレベルでは < 15 %) と平均真度 (LLOQ で 80 ~ 125 %、他のレベルでは 85 ~ 115 %) を得ることができました。検量線の相関係数 (R^2) は 0.99 を超え、最大 4.3 桁のダイナミックレンジでした (図 5)。

二次胆汁酸生成物に対する腸内微生物叢の影響の評価

胆汁酸に対する腸内細菌の主な作用は C_{24} アミド加水分解と 7 α -デヒドロキシル化です。CA および CDCA のグリシン複合体とタウリン複合体を、二次胆汁酸であるデオキシコール酸 (DCA) とリトコール酸 (LCA) にそれぞれ変化させます。ヒトの糞便ではさらにおよそ 50 種類の二次胆汁酸が検出されています¹。胆汁酸の研究において、無菌のマウスは腸内微生物叢を保有しておらず二次胆汁酸もないため、宿主と微生物叢の相互作用を研究するうえで貴重な実験モデルになります。原理証明研究として、従来で飼育されたマウスおよび無菌のマウスそれぞれ 3 匹のバイオリジカルレプリケートの糞抽出物に、LC/MS/MS メソッドを適用しました。溶媒で調製した標準の

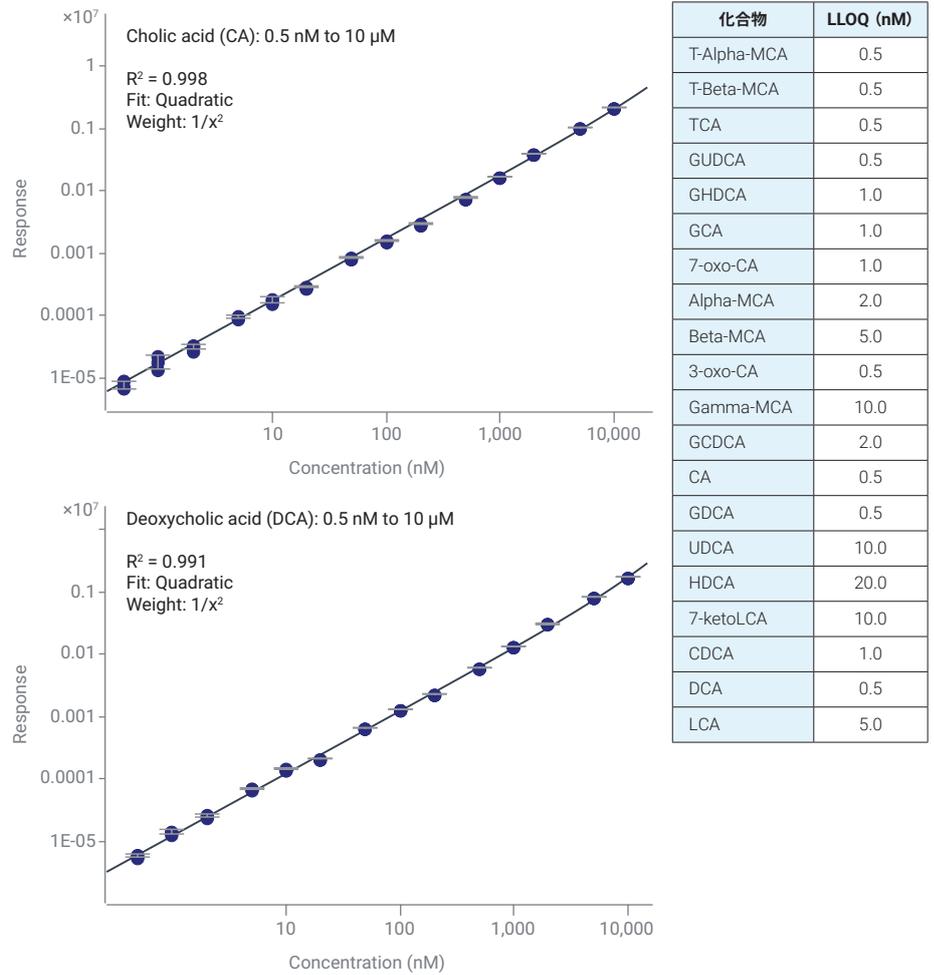


図 5. 最終 dMRM メソッドにより達成したダイナミックレンジと直線性の例。表は 20 種類の胆汁酸標準の LLOQ を示しています。

外部検量線に基づいて、糞の胆汁酸の濃度を概算しました。26 種類のうち 6 種類の化合物で定量標準を使用できませんでした。これらについては、フラグメンテーションパターンが似た関連標準の検量線を適用しました。同位体標識された内部標準を使用しない場合、示される濃度は大まかな推定になることを強調しておきます。特に、糞マトリックスで観察されるイオン化抑制の影響を大きく受けます。ただし、MRM は簡単に変更でき、安定同位体標識標準を導入して絶対定量を行うことができます。

胆汁酸の濃度は個々のマウスによってばらつきがありました。全体的な結果として、無菌のマウスはいずれも二次胆汁酸の代謝がないことが示されました (図 6)。

	従来			無菌			
	1	2	3	4	5	6	
CA	7.022	11.277	10.448	0.072	0.084	0.086	一次胆汁酸
CDCA	0.608	0.600	0.897	0.029	0.028	0.026	
α-MCA	6.908	2.511	6.199	0.014	ND	ND	
β-MCA	84.342	80.800	95.584	0.229	0.090	0.073	
GCA	0.036	0.055	0.096	ND	0.008	ND	
GCDCA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
T-α-MCA	0.354	0.528	1.320	2.235	2.663	1.841	
T-β-MCA	7.067	13.795	19.128	71.817	139.076	81.539	
TCA	2.363	3.258	7.071	12.064	37.400	20.216	
TCDC	0.305	0.293	0.710	1.178	1.094	0.646	
TUDCA	1.219	2.025	4.007	11.603	14.521	6.792	
UDCA	14.111	6.341	6.066	ND	ND	ND	
DCA	262.661	97.598	137.053	0.004	0.004	0.006	
LCA	26.301	8.470	14.261	ND	ND	ND	
3-oxo-CA	0.278	0.316	0.357	0.001	0.002	0.002	
7-ketoLCA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
7-oxo-CA	0.234	0.442	0.408	0.004	0.006	0.006	
IsoLCA	0.841	0.348	0.553	ND	ND	ND	
γ-MCA	0.328	0.164	0.234	ND	ND	ND	
HDCA	63.735	19.007	18.582	ND	ND	ND	
Muro-CA	5.442	4.507	4.685	ND	ND	ND	
GUDCA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
GDCA	0.021	0.004	0.007	ND	ND	ND	
GHDC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
TDCA	0.591	0.371	1.215	0.016	0.014	0.007	
AlloLCA	0.422	0.132	0.221	ND	ND	ND	

図 6. 従来の方法で飼育されたマウスと無菌のマウスの糞の胆汁酸の推定濃度。糞 1 g あたりの胆汁酸の質量 (nmol/g) で値を示しています。ND = 不検出

Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアでは、LC/MS データセットのインポート、比較、視覚化を行うことができます。Pathway Architect モジュールを使用して、多くの細菌の分類に共通する「胆汁酸 7 α -デヒドロキシ化」の MetaCyc パスウェイに、計算した胆汁酸濃度をマッピングします (図 7)。これにより、生体合成パスウェイに関して、6 匹のマウスサンプルの個々の胆汁酸濃度の違いを視覚化できます。

結論

胆汁酸のプロファイリングと定量のためのターゲット TQ ベースの LC/MS/MS メソッドを開発しました。このメソッドは生体マトリクスでの選択性が高く、独自の LC 移動相によって堅牢性が高まり、必要なサンプル前処理が最小限であり、分析感度も優れています。また、このアプリケーションノートでは、メソッドとソフトウェアワークフローが、マイクロバイオーーム研究分野で一般的な複雑なサンプルに由来する胆汁酸プロファイルの比較に適していることを示しました。

参考文献

1. Devlin, A. S.; Fischbach, M. A. A Biosynthetic Pathway for a Prominent Class of Microbiota-Derived Bile Acids. *Nature Chem. Biol.* **2015**, *11*, 685–90
2. Wegner, K. et al. Rapid Analysis of Bile Acids in Different Biological Matrices Using LC-ESI-MS/MS for the Investigation of Bile Acid Transformation by Mammalian Gut Bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 1231–1245.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

RA45065.7176157407

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2025
Printed in Japan, May 26, 2023
5994-4956JAJP

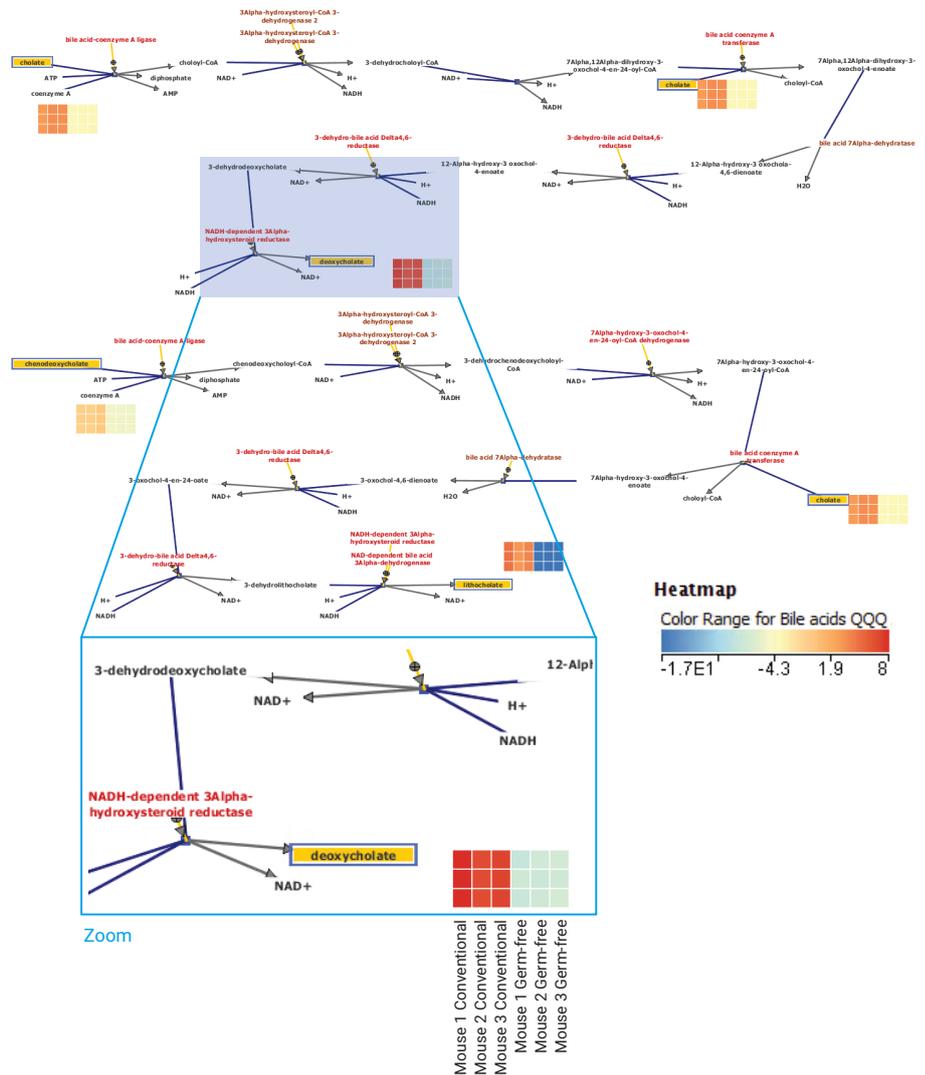


図 7. BioCyc (MetaCyc) の「胆汁酸 7 α -デヒドロキシ化」パスウェイの Pathway Architect の表示。データセットとパスウェイで一致する化合物が黄色で強調表示され、算出濃度がギルトプロットで示されています。