マスフラグメントグラフィーによる生体試料中胆汁酸の定量法¹⁾

篠 光正, 根津征夫,^{2a)} 立山 正,^{2b)} 坂口健哉,^{2a)} 片山幸一, 堤 淳三,^{2b)} 河部 靖^{2a)}

エーザイ株式会社分析研究所,^{2a)} 薬理研究所^{2b)}

Determination Method of Bile Acids in Biological Materials by Mass Fragmentography¹⁾

MITSUMASA SHINO, YUKUO NEZU,^{2a)} TADASHI TATEYAMA,^{2b)} KENYA SAKAGUCHI,^{2a)}
KOUICHI KATAYAMA, JUNZO TSUTSUMI,^{2b)} and KIYOSHI KAWABE^{2a)}

Analytical Research Laboratory^{2a)} and Experimental Therapeutics
Research Laboratory,^{2b)} Eisai Co., Ltd.

(Received October 17, 1978)

A new method was developed for quantitative analysis of deuterium-labelled and endogenous bile acids in human serum, urine, bile and feces. The conventional extraction method was modified to improve the recovery of the sulfated bile acids. The sulfated and nonsulfated bile acids were adsorbed on an Amberlite XAD-2 column, eluted with methanol containing 20 mM NaOH, and separated on a Sephadex LH-20 column. Sulfated bile acids were dissolved in ethanol (pH 1)-acetone (1:9, v/v) and solvolysed for 3 hr at 37°. A new alkaline hydrolysis method was also devised; bile acids were dissolved in 4 N NaOH-methanol (1:1, v/v) and hydrolyzed in a screw-capped Pyrex glass tube at 80° for 16 hr. After extraction with ether, bile acids were converted to methyl ester propionate derivatives. The determination of endogenous and deuterium-labelled bile acids was accomplished by gas chromatography-mass fragmentography. The reproducibility of the present method was good (3—8% of relative standard deviation for endogenous bile acid in serum) and 11,12-²H₂-chenodeoxycholic acid was determined up to 1% of the coexisting chenodeoxycholic acid. Endogenous bile acid levels in biological materials were measured and compared with previously reported results. The present method was sensitive and useful for the quantitation of minute amounts of bile acids. Further, this was a recommendable method for the determination of pool size of bile acids by using deuterium-labelled bile acids.

Keywords—quantitative analysis; endogenous bile acid; 11,12-deuterium-chenodeoxycholic acid; sulfated bile acid; human urine; human serum; human bile; human feces; mass fragmentography

Chenodeoxycholic acid (CDCA と略記) はヒトのコレステロール代謝における一次胆汁酸で, CDCA を経口投与したときコレステロール胆石を縮小, 溶解できることが報告され近年注目されている.³⁾ 著者らはヒトにおける CDCA の体内動態を検討するために 11,12-²H₂-chenodeoxycholic acid (²H-CDCA と略記)⁴⁾ を投与した場合の ²H-CDCA および内因性胆汁酸の微量定量法の確立を必要とした。

従来から gas chromatography による血清, 尿中胆汁酸の定量は広く行なわれているが sulfate 胆汁酸の定量については十分に検討されておらず,⁵⁻⁷⁾ とくに Amberlite XAD-2 カラム抽出過程で sulfate 胆汁酸の回収率

1) 日本薬学会第 98 年会で発表, 岡山, 1978 年 4 月。

2) Location: a, b) 4-6-10, Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

3) a) R.G. Danzinger, A.F. Hofmann, L.J. Shoenfield, J.L. Thistle, *New Eng. J. Med.*, **286**, 1 (1972); b) G.D. Bell, B. Whitney, R.H. Dowling, *Lancet*, **1972** (II), 1213.

4) a) A.E. Cowen, A.F. Hofmann, D.L. Hachey, P.J. Thomas, D.T.E. Belobaba, P.D. Klein, L. Tökes, *J. Lipid Res.*, **17**, 231 (1976); b) W.F. Balistreri, A.E. Cowen, A.F. Hofmann, P.A. Szczepanic, P.D. Klein, *Pediat. Res.*, **9**, 757 (1975).

5) a) I. Makino, H. Hashimoto, K. Shinozaki, K. Yoshino, S. Nakagawa, *Gastroenterology*, **68**, 545 (1975); b) I. Makino, K. Shinozaki, S. Nakagawa, K. Mashimo, *J. Lipid Res.*, **15**, 132 (1974); c) I. Makino, J. Sjövall, *Anal. Lett.*, **5**, 341 (1972).

6) C.B. Campbell, C. McGuffie, L.W. Powell, *Clin. Chim. Acta*, **63**, 249 (1975).

7) A. Norman, B. Strandvik, Ö. Ojamäe, *Acta Paediat Scand.*, **63**, 97 (1974).

が低く、また solvolysis 過程で副生成物を生成するなど定量精度に問題が残されていた。

著者らはこれらに検討、改良を加えると共に、さらに alkaline hydrolysis はオートクレーブを用いない簡便な方法を見出して用いた。また揮発性誘導体は従来の不安定な methyl ester trifluoroacetate 誘導体に替えて安定な methyl ester propionate 誘導体を見い出して用いた。定量は重水素標識体と非標識体を分離でき、かつ検出感度の高い gas chromatography-mass fragmentography (GC-MF と略記) を用いて行なった。本定量法は回収率、再現精度、検出感度ともに良好で、この定量法を用いてヒトの尿、血清などの測定を行ない、従来の分析値と比較した。

尚、重水素標識体をヒトに投与することの必要性和安全性について考慮した。胆汁酸の代謝は動物による種差が大きくヒトによる実験が必要であり、海外では放射性同位元素標識胆汁酸のヒト投与例が報告⁸⁾ されているほか、著者らと同じ ³H-CDCA のヒト投与例も報告⁹⁾ されている。しかし日本人における CDCA の pool size や生合成速度などの測定例は無く、本定量法による結果として一部をすでに報告した。¹⁰⁾ CDCA はヒトの生合成物質であり、投与量 50 mg は pool size (726 ± 130 mg/man)¹⁰⁾ の 6.9% であり、また ³H-CDCA 50 mg 中の重水素量は 0.51 mg で摂取食物中の量 (40 mg/day·man)¹¹⁾ の 1.3% にすぎず、さらに重水素化合物の一般的な安全性についての報告¹²⁾ から見ても、著者らのボランティアへの ³H-CDCA の投与は安全であると考えられた。

実 験 の 部

試薬 ³H-CDCA は Merck Sharp and Dohme 製を再結晶後 NaOH 水溶液に溶解して塩酸で中和し、生じた沈殿を蒸留水で洗浄し乾燥して使用した。この ³H₂ 標識純度は mass spectrum (MS) より 81.6% であった。Lithocholic acid-3-sulfate (LCAS と略記, IR $\lambda_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1722 (C=O), 1250 (SO₂), 1060 (SO₂)), glycolithocholic acid-3-sulfate (GLCAS と略記, IR $\lambda_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1645 (CONH), 1245 (SO₂), 1060 (SO₂)), 24-¹⁴C-lithocholic acid-3-sulfate (¹⁴C-LCAS と略記, 比放射能 1.01 μ Ci/mg) および ³H(G)-glycolithocholic acid-3-sulfate (³H-GLCAS と略記, 1.21 μ Ci/mg) は Palmer ら¹³⁾ の方法で合成した。7-Ketolithocholic acid (7-KLCA と略記) は Hsia ら¹⁴⁾ に準じて合成した。Lithocholic acid (LCA と略記), CDCA, deoxycholic acid (DCA と略記), cholic acid (CA と略記), hyodeoxycholic acid および glycolitho-cholic acid (GLCA と略記) は Sigma 製を, ursodeoxycholic acid (UDCA と略記), 12-ketochenodeoxycholic acid (12-KCDCA と略記), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA と略記), taurochenodeoxycholic acid は Calbiochem 製を使用した。³H(G)-glycolithocholic acid (³H-GLCA と略記, 38.5 mCi/mg) と ³H(G)-glycochenodeoxycholic acid (³H-GCDCA と略記, 11 mCi/mg) は New England Nuclear 製を, 24-¹⁴C-lithocholic acid (¹⁴C-LCA と略記, 145 μ Ci/mg) と 24-¹⁴C-chenodeoxycholic acid (¹⁴C-CDCA と略記, 1.39 mCi/mg) は The Radiochemical Centre 製を使用した。Amberlite XAD-2 (XAD-2 と略記) は Rohm and Hass 製, Sephadex LH-20 (LH-20 と略記) は Pharmacia Fine Chemicals 製であった。シリジンは Pierce 製 silylation grade を, 無水プロピオン酸は東京化成製を, またその他の試薬は市販の特級品を使用した。

ジアゾメタンは Schlenk ら¹⁵⁾ の方法に準じて用時調整し, エーテル-メタノール (9:1, v/v) 飽和溶液として使用した。

実験方法 実験で特に記述のない条件および方法は後述の定量操作法の記載に従って行なった。

1) XAD-2 カラムによる抽出法——Radioisotope (RI と略記) 標識胆汁酸を添加したヒト血清および尿を試料

8) a) S. Lindstedt, *Acta Physiol. Scand.*, **40**, 1 (1957); b) G.P. van Berge-Henegouwen, A.F. Hofmann, *Gastroenterology*, **73**, 300 (1977); c) M.T.R. Subbiah, N.E. Tyler, M.D. Buscaglia, L. Marai, *J. Lipid Res.*, **17**, 78 (1976); d) Z.R. Vlahcevic, C.C. Bell, I. Buhac, J.T. Farrar, L. Swell, *Gastroenterology*, **59**, 165 (1970); e) H. Danielsson, P. Eneroth, K. Hellstrom, S. Lindstedt, J. Sjövall, *J. Biological Chem.*, **238**, 2299 (1963).

9) W.F. Balistreri, A.E. Cowen, A.F. Hofmann, P.A. Szcze-Panik, P.D. Klein, *Pediat. Res.*, **9**, 757 (1975).

10) 立山 正, 根津征夫, 篠 光正, 坂口健哉, 片山幸一, 堤 淳三, 藤沢 洸, *肝臓*, **60**, 590 (1978).

11) 堀江正信, 馬場茂雄, 榎田義彦, 浜田知子, *薬誌*, **97**, 805 (1977).

12) a) D.R. Knapp, T.E. Gaffney, *Clin. Pharm. Therapeutics*, **13**, 307 (1974); b) M.I. Blake, H.L. Crespi, J.J. Katz, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 367 (1975); c) 飯尾正宏, *臨床薬理*, **4**, 318 (1973); d) 馬場茂雄, *質量分析*, **26**, 19 (1978).

13) R.H. Palmer, M.G. Bolt, *J. Lipid Res.*, **12**, 671 (1971).

14) S.L. Hsia, "The Bile Acids," Vol. I, ed. by P.P. Nair and D. Kritchevsky, Plenum Press, New York-London, 1971, p. 95.

15) H. Schlenk, J.L. Gellerman, *Anal. Chem.*, **32**, 1412 (1960).

とし、尿はそのまま直ちに、血清は 0.1 N NaOH を含む 0.9% NaCl で希釈の後直ちにあるいは 3 日間放置の後カラムに注いだ。エタノール、メタノールあるいは 20 mM NaOH メタノール溶液を溶出液として胆汁酸を溶出し、分画しながら溶出胆汁酸量を液体シンチレーションカウンター (LSC と略記) で定量した。

2) LH-20 カラムによる Sulfate および Nonsulfate 胆汁酸分画法——RI 標識胆汁酸を添加した血清および尿を試料とし、1) 項の最適条件で XAD-2 カラム抽出し溶出液を LH-20 カラムへ注いだ。Sulfate および nonsulfate 両画分を溶出し、分画しながら溶出胆汁酸量を LSC で定量した。

3) Solvolysis——GLCAS および LCAS を 2N HCl で pH 1 に調整したエタノール 1 ml とアセトン 9 ml を加えて溶解し、室温あるいは 37° で振とうしながら、溶解後の各経過時間における反応の進行を TLC で測定した。回収率は solvolysis 後さらに alkaline hydrolysis して GC-MF で定量した。

4) Alkaline Hydrolysis——溶解液の検討: 4N NaOH, 4N NaOH-エチレングリコール (3:1, v/v), 4N NaOH-メタノール (3:1 および 1:1, v/v) の各溶解液に GLCA を溶解し、80°, 16 時間で加水分解した。反応の進行を薄層クロマトグラフィー (TLC) で測定し、回収率を GC-MF で定量した。

各種抱合胆汁酸の加水分解: 4N NaOH-メタノール (1:1, v/v) に抱合胆汁酸を溶解し、80°, 5 時間あるいは 80°, 16 時間加水分解した。加水分解の進行を TLC で測定した。

容器材質: RI 標識胆汁酸 (1×10^6 dpm) を Pyrex glass 製のスクリーキャップ付きガラスチューブ (SC チューブと略記) に入れて alkaline hydrolysis し、エーテル抽出して回収量を LSC で定量した。

5) GC-MF 測定条件——日本電子(株)製の JMS-D100 gas chromatograph-mass spectrometer (multiple ion detector 付き) を使用した。GC 条件は 3% OV-3, Gas Chrom Q (100—120 mesh) の充填剤を 1.5 m × 2 mm のガラスカラムに充填し、カラム温度 280°, 試料注入口温度 310°, ヘリウムガス圧 2 kg/cm² で行なった。MS 条件は、ヘリウムセパレーター温度 310°, イオン化電圧 25 V, イオン化電流 300 μA で行なった。

胆汁酸 methyl ester propionate 誘導体の相対保持時間は、日本電子(株)製の JGC-20K gas chromatograph (FID 検出器付き) を使用して、3% OV-1, 3% OV-3, 3% OV-17 のカラム液相について測定した。

6) Thin-Layer Chromatography——Merck 製の silica gel GF₂₅₄ プレートにスポットし、*n*-プロパノール-プロピオン酸-酢酸イソアミル-水 (10:15:20:5, v/v, S-VIII と略記) あるいは *n*-ブタノール-酢酸-水 (50:5:5, v/v) にて展開した。⁸⁾ リンモリブデン酸-酢酸-濃硫酸 (5 g: 100 ml: 5 ml) を噴霧し 120°, 5 分間加熱して発色した。また RI 標識化合物はヨウ素蒸気で発色した。

Fig. 1. Pretreatment Procedure for Bile Acid Analysis

IS: 12-ketochenodeoxycholic acid as internal standard.

7) Radioactivity—Aloka 製の LSC-653 液体シンチレーションカウンターを使用した。シンチレーターはジオキサン系を使用し外部線源法により計数効率を補正した。

8) 生体試料の採取——健康な男子 4 名のボランティアより、12 時間絶食後早朝空腹時採血し、直ちに十二指腸ゾンデを用いてパンクレオザイミン刺激後の胆汁を採取した。尿および糞は前 24 時間の全量を集めホモジナイズ後その一部を分取し -20° で他の生体試料と共に凍結保存した。 ^2H -CDCA 50 mg をゼラチンカプセル剤として経口 1 回投与し、投与後 2 日目の尿を採取した。

定量操作法 添加回収率、再現精度および健康人の内因性胆汁酸量を下記方法で測定した。操作の概略を Fig. 1 に示した。

1) 尿——尿 50 ml に内部標準物質 (IS と略記) として 12-KCDCA 50 μg を添加後、あらかじめ水、メタノール、アセトン、メタノールそして水の 5 倍量で順次洗浄した XAD-2 樹脂⁵⁾ を充填し水 60 ml で洗浄したカラム (1 cm $\times$ 20 cm) に注ぎ、胆汁酸を吸着させた。水 60 ml で洗浄後胆汁酸を 20 mM NaOH メタノール溶液 80 ml で溶出し、減圧乾固した。残渣を、10 mM NaCl を含むクロロホルム-メタノール (1:1, v/v) 溶液の少量に溶解し、あらかじめ同溶液中で一晩浸潤した HL-20 樹脂を充填したカラムに注ぎ、同溶液 60 ml で nonsulfate 画分を溶出し減圧乾固した。続いて sulfate 画分を 10 mM NaCl メタノール溶液 80 ml で溶出し、IS 50 μg を添加して減圧乾固した。Sulfate 画分の残渣は少量のメタノールに溶解して 2N HCl で中和し直ちに塩酸臭が無くなるまで減圧乾固の後、2N HCl で pH 1 に調整したエタノール 1 ml とアセトン 9 ml を加えて溶解し、 37° 、3 時間で solvolysis を行ない直ちに減圧乾固した。続いてこの残渣と nonsulfate 画分をそれぞれ 4N NaOH-メタノール (1:1, v/v) 溶液 6 ml に溶解し、SC チューブに入れて密栓し、 80° 16 時間で alkaline hydrolysis を行なった。0.5 ml まで減圧濃縮してメタノールを留去後水 3 ml で希釈した。氷-水浴中冷却下 6N HCl で pH 1 とし、エーテル (3 ml $\times$ 3 回) で胆汁酸を抽出し直ちに減圧乾固した。残渣を少量のメタノールに溶解し、ジアゾメタン溶液 6 ml を加えて室温、30 分で methylester 化後減圧乾固した。残渣に無水プロピオン酸-ピリジン (7:3, v/v) 100 μl を加えて SC チューブに入れて密栓し 80° 、8 時間で反応させ、methyl ester propionate 誘導体とした。そのまま通常 4 μl を 3% OV-3 カラムに注入し GC-MF にて定量した。

2) 血清——血清 3 ml に IS 5 μg を添加後 0.1N NaOH を含む 0.9% NaCl の 9 倍容で希釈して超音波浴で 10 分間ホモジナイズし、室温で 3 日間放置後 XAD-2 カラム (1 cm $\times$ 20 cm) に注いだ。水 60 ml で洗浄後 20 mM NaOH メタノール溶液 80 ml で胆汁酸を溶出し乾固した。少量のメタノールを加えて溶解し上澄を分取して 2N HCl で中和後直ちに乾固した。Solvolysis を行ない再び上清を分取し乾固した。Alkaline hydrolysis, エーテル抽出、誘導体化 (propionate 化剤 50 μl) の後 GC-MF 測定した。

3) 胆汁——胆汁 100 μl に IS 200 μg を添加後 alkaline hydrolysis し、エーテル抽出、誘導体化 (propionate 化剤 1 ml) の後 GC-MF 測定した。

4) 糞——1 日分の糞に水を加えてホモジナイズしその 1/1000 量を分取して凍結乾燥した。これに 2N NaOH-エタノール (1:8, v/v) 45 ml と IS 500 μg を加え還流抽出後濾過し、濾液を 0.5 ml まで減圧濃縮した。¹⁶⁾ Alkaline hydrolysis し再び 0.5 ml まで減圧濃縮し水 3 ml を加えて希釈後アルカリ性のままエーテル (4 ml $\times$ 3 回) で洗浄した。この水層を pH 1 とし胆汁酸をエーテル抽出し誘導体化 (propionate 化剤 1 ml) の後 GC-MF 測定した。

結果および考察

1) XAD-2 カラムによる抽出法の検討

血清中あるいは尿中胆汁酸の抽出は従来用いられてきた XAD-2 カラムを用い、^{5,7,17)} 溶出液を検討して得られた結果を Table I に示した。従来のエタノールあるいはメタノールで溶出したとき溶出パターンはピークを持ち一見正常に見えたが sulfate 胆汁酸の回収率は低く、ことに GLCAS ではほとんど溶出されなかった。そこでメタノールに 20 mM NaOH を含有させることにより尿では良好な回収率が得られたので、この条件 (Table I の条件 C) を採用した。血清ではさらに室温で 3 日間放置してカラムに注ぐことにより良好な回収率が得られたので、この条件 (Table I の条件 D) を採用した。このアルカリ性下 3 日間放置の間、GLCAS は安定でグリシンおよび硫酸抱合基は分解しないことを TLC で確認した。

2) LH-20 カラムによる Sulfate および Nonsulfate 胆汁酸分画法の検討

Sulfate および nonsulfate 胆汁酸の分画は、牧野ら⁵⁾ の LH-20 カラム分画法を用い sulfate 胆汁酸の溶出液を 10 mM NaCl メタノール溶液⁶⁾ に変更して行なった。また XAD-2 カラム溶出物は多量の NaOH を含みアルカリ性 (従来は中性) であるが中和することなく LH-20 カラムへ注いだ。両画分への回収率を Table II に示した。

16) S.M. Grundy, E.H. Ahrens, T.A. Miettinen, *J. Lipid Res.*, **6**, 397 (1965).

17) A. Norman, B. Strandvik, *J. Lab. Clin. Med.*, **78**, 181 (1971).

TABLE I. Recoveries of Bile Acids on Amberlite XAD-2 Column by Eluting with Various Solvents

Added bile acids	Amounts ($\times 10^5$ dpm)	Recovery (%)	
		Serum ^{b)}	Urine
A. Eluted with 60 ml of ethanol			
³ H-Glycolithocholic acid sulfate	9.0	6	7
¹⁴ C-Lithiocholic acid sulfate	8.8	6	40
³ H-Glycochenodeoxycholic acid	17.7	16	99
³ H-Glycolithocholic acid	16.8	24	91
¹⁴ C-Chenodeoxycholic acid	9.3	45	103
¹⁴ C-Lithocholic acid	10.5	41	95
B. Eluted with 60 ml of methanol			
³ H-Glycolithocholic acid sulfate	5.6	2	—
¹⁴ C-Chenodeoxycholic acid	4.4	67	—
C. Eluted with 60 ml of methanol containing 0.02 M NaOH			
³ H-Glycolithocholic acid sulfate	5.6	25 (40) ^{a)}	98
¹⁴ C-Chenodeoxycholic acid	4.4	102	94
D. Standing for 3 days after adding 0.1N NaOH containing 0.9% NaCl, charged on column, then eluted with 75 ml of methanol containing 0.02 M NaOH			
³ H-Glycolithocholic acid sulfate	5.6	89	—
¹⁴ C-Chenodeoxycholic acid	4.4	94	—
¹⁴ C-Lithocholic acid	3.0	104	—

a) The chromatographic pattern had a tailing, and 40% recovery was obtained by eluting with 105 ml.

b) Serum was diluted with 9 volumes of 0.1M NaOH containing 0.9% NaCl, and charged on the column.

TABLE II. Recoveries of Bile Acids on Sephadex LH-20 Column

Bile acid	Added amounts ($\times 10^5$ dpm)	Recovery (%)			
		Serum		Urine	
		Nonsulf. fr.	Sulf. fr.	Nonsulf. fr.	Sulf. fr.
¹⁴ C-Lithocholic acid	8.8	99.7	0.3	98.8	0.6
¹⁴ C-Chenodeoxycholic acid	4.4	99.1	0.2	97.3	0.5
³ H-Glycochenodeoxycholic acid	17.7	94.0	0.8	94.2	1.0
Taurochenodeoxycholic acid	—	+ ^{a)}	—	+ ^{a)}	—
¹⁴ C-Lithocholic acid-3-sulfate	8.8	1.0	92.4	0.3	97.5
³ H-Glycolithocholic acid-3-sulfate	9.0	1.5	91.8	1.3	98.1

a) The recovery of taurochenodeoxycholic acid eluted in a nonsulfate fraction was not measured.

溶出クロマトグラムおよび回収率は血清、尿ともに良好であり遊離胆汁酸、グリシン抱合体、タウリン抱合体は nonsulfate 画分へ、また硫酸抱合体および硫酸・グリシン抱合体は sulfate 画分へ溶出した。

3) Solvolysis 条件の検討

Sulfate 胆汁酸の solvolysis は Palmer ら¹³⁾ の塩酸酸性エタノール (pH1)-アセトン (1:9, v/v) 溶媒中で行ない solvolysis 時間を検討した。Palmer らおよび文献の方法⁵⁻⁷⁾ では室温で 2—3 日間で行なっている。著者らが検討したところ GLCAS と LCAS は室温で 30 分、37° で 15 分と非常に短時間で solvolysis されることが判った。37°, 3 時間の条件で solvolysis 後 alkaline hydrolysis したとき GLCAS は LCA として定量的に回収 (回収率 98.2%) されたことからこの条件を採用した。なお GLCAS は同溶媒中で 37°, 3 時間以上放置すると副生成物 (TLC, Rf 0.90, S-VIII) を生じ、2 日間放置後 alkaline hydrolysis したとき、LCA としての回

収率は 71.8% と低かった. GLCA でも同じ副生成物を生じ, LCAS では生成しなかった.

4) Alkaline Hydrolysis 条件の検討

従来グリシンあるいはタウリン抱合胆汁酸の加水分解法として 1—5 N NaOH^{5,6,18)} あるいはこれにエタノール^{18,19)} を添加した溶液に溶解し, 120°, 3—10 時間で行なう方法が用いられている. その際, テフロンあるいはニッケル製容器に移し替えて²⁰⁾ オートクレーブ中で行なうことを要する. 著者らはオートクレーブを用いずまた容器も Pyrex glass 製の SC チューブで行なえる簡便法を考案した. Table III に示したように, GLCA を用いて SC チューブ中 80°, 16 時間で加水分解したとき, 溶解液として 4 N NaOH-メタノール (1:1, v/v) を使用すると最も加水分解速度が速く, LCA として 100% 回収され, 最適であった.

次にこの最適溶解液を用いて各種抱合胆汁酸の加水分解を検討した. 加水分解速度は抱合胆汁酸の種類により異なり GLCA が最も遅かった. 胆汁酸を同一としたときタウリン抱合体よりグリシン抱合体が遅く, 抱合基を同一としたとき CA より CDCA さらに LCA と順次遅かったが, 全てのグリシンおよびタウリン抱合胆汁酸は 80°, 16 時間の条件でそれぞれ対応する遊離胆汁酸へ加水分解され, 副生成物の生成も認められなかった. Pyrex glass 製の SC チューブ中で処理したとき 96—98% (¹⁴C-CDCA, ³H-GCDC, ³H-GLC) がエーテル抽出され, 微量胆汁酸分析においても処理中に生成したシリカゲルの吸着による損失¹³⁾ は無いことを見出した. 従って従来法のようにテフロンあるいはニッケル製容器中に行なう必要は無くなり, この結果 solvolysis からエーテル抽出までの操作を容器を移し変えることなく SC チューブ中に行ない操作を簡便化した.

5) GC-MF 測定条件の検討

胆汁酸を GC 分析する際の揮発性誘導体としてはカルボキシル基を methyl ester 化後水酸基を trifluoroacetate 化^{5,6,20)} する方法が従来用いられてきた. しかし trifluoroacetate は不安定でより安定性の良い誘導体として trimethylsilyl ether^{19,21)} あるいは acetate²¹⁻²³⁾ が検討されているが, trimethylsilyl 誘導体でも反応後 1 日以内¹⁹⁾ に測定する必要がある.

そこで著者らは他の揮発性誘導体を検討したところ, methyl ester propionate が安定性に優れ 3 ヶ月後でも分解せずかつ各種胆汁酸の分離が良いことが判った. OV-1, OV-3, OV-17 の 3 種のシリコン系カラム液相における 13 種胆汁酸の相対保持時間を Table IV に示した. またそれら誘導体のマススペクトルは, その一例を Fig. 2 に示したようにプロピオン酸が脱離した fragment ion が強く検出された. 重水素標識胆汁酸は非標識胆汁酸と同一保持時間で流出するが, この fragment ion の *m/e* 値は 2 マスユニットと異なり両者を分離できることから, この fragment ion を用いて GC-MF 測定を行なった. 測定に使用した *m/e* 値を Table IV に記載

TABLE III. Amounts of Glycolithocholic Acid Hydrolyzed to Lithocholic Acid in Various Alkaline Solvent Systems

Solvent system	Amounts of hydrolyzed glycolithocholic acid (%, <i>n</i> =2)
4 N NaOH	8.2
4 N NaOH-ethylene glycol (3: 1, v/v)	45.3
4 N NaOH-methanol (3: 1, v/v)	95.2
4 N NaOH-methanol (1: 1, v/v)	100.0

Glycolithocholic acid was dissolved in various solvent systems and hydrolyzed in a screw capped Pyrex glass tube for 16 hr at 80°. Proceeding of hydrolysis was checked by means of thin layer chromatography and amounts of lithocholic acid were measured by means of GC-MS.

- 18) J.L. Irbin, C.G. Jhonston, J. Kopala, *J. Biol. Chem.*, **153**, 439 (1944).
- 19) B. Almé, A. Bremmelgaard, J. Sjövall, P. Thomassen, *J. Lipid Res.*, **18**, 339 (1977).
- 20) D.H. Sandberg, J. Sjövall, K. Sjövall, D.A. Turner, *J. Lipid Res.*, **6**, 182 (1965).
- 21) R. Galeazzi, E. Kok, N. Javitt, *J. Lipid Res.*, **17**, 288 (1976).
- 22) R.N. Allan, J.L. Thistle, A.F. Hofmann, J.A. Carter, *Gut*, **17**, 405 (1976).
- 23) I.M. Yousef, M.M. Fisher, J.J. Myher, A. Kuksis, *Anal. Biochem.*, **75**, 538 (1976).

TABLE IV. Relative Retention Times of Methyl Ester Propionate Derivatives of Bile Acids and Selected m/e Values for Mass Fragmentography

Bile acid	Functional groups	Molecular weight	m/e for MF	Relative retention time		
				OV-1 ^{b)}	OV-3 ^{c)}	OV-17 ^{d)}
5 β -Cholanic acid ^{a)}	None	374	374	0.24	0.25	0.14
3-Ketocholanic acid ^{a)}	3-Keto	388	388	0.48	0.44	0.42
Lithocholic acid	3 α	446	372	0.71	0.67	0.72
Isolithocholic acid	3 β	446	372	0.69	0.66	0.73
Deoxycholic acid	3 α , 12 α	518	370	1.00	1.00	1.00
7-Ketolithocholic acid	3 α , 7-keto	460	386	1.05	1.03	1.04
Chenodeoxycholic acid	3 α , 7 α	518	370	1.13	1.12	1.11
α -Hyodeoxycholic acid	3 α , 6 α	518	370	1.37	1.40	1.41
Ursodeoxycholic acid	3 α , 7 β	518	370	1.44	1.39	1.37
Cholic acid	3 α , 7 α , 12 α	590	368	1.46	1.56	1.70
12-Ketochenodeoxycholic acid	3 α , 7 α , 12-keto	532	384	1.58	1.69	1.92
β -Muricholic acid	3 α , 6 β , 7 β	590	368	2.62	2.66	2.56
³ H-Chenodeoxycholic acid	3 α , 7 α	520	372	1.13	1.12	1.11

a) Methyl ester.

b) 3% OV-1 on Gas Chrom Q 100—120 mesh, 1.8 m $\times$ 2 mm i.d., column temp. 260°.c) 3% OV-3 on Gas Chrom Q 100—120 mesh, 1.8 m $\times$ 2 mm i.d., column temp. 270°.d) 3% OV-17 on Gas Chrom Q 100—120 mesh, 1.8 m $\times$ 2 mm i.d., column temp. 280°. Fig. 2. Mass Spectrum of Methyl Ester Propionate Derivative of 11,12-³H₂-Chenodeoxycholic Acid

した. OV-3 カラムを使用して GC-MF 測定した例として, ヒト血清中の内因性胆汁酸を Fig. 3 に, また ³H-CDCA 50 mg を経口投与したときの尿中の重水素標識および内因性胆汁酸を Fig. 4 に示した. ここにおいて ³H₂-lithocholic acid (³H-LCA と略記) が ³H-CDCA の代謝物として検出された. 両図から判るように ³H-LCA, ³H-CDCA, LCA, DCA, CDCA, UDCA, CA および IS の GC-MF による分離は良好であり, また 10 分間以内で測定できることから OV-3 を採用した. OV-1 は UDCA と CA および IS の GC 分離が充分でなく, OV-17 は OV-3 より更に良い GC 分離を示したが測定所要時間は 30 分と長時間を要した.

GC-MF 測定において天然同位体存在比で含まれる ¹³C と ¹⁸O の影響で CDCA の m/e 370 のイオン強度の 4.2% が m/e 372 に検出された. 従って ³H-CDCA の定量はこの寄与分を減算して行ない, ³H-CDCA は内因性 CDCA に対し 1% まで定量可能であった.

6) 内部標準物質の検討

IS としては 12-KCDCA を選定し, 試料処理の最初に添加した. IS を添加しないときの各生体試料の測定を

Fig. 3. Mass Fragmentograms of Endogenous Bile Acids in Healthy Human Serum

Fig. 4. Mass Fragmentograms of Bile Acids in Sulfate Fraction of Healthy Human Urine at 2 Days after Administration of 50 mg 11,12- $^2\text{H}_2$ -Chenodeoxycholic Acid

TABLE V. Recoveries of Internal Standard and Added Bile Acids

Added bile acid		Recovery	
Bile acid	Amounts (μg)	Fraction	Mean $\pm$ S.D. (% , $n=3$)
Absolute recovery of internal standard			
Serum	10	—	92 $\pm$ 7
Urine	20	Nonsulf.	106 $\pm$ 5
	20	Sulf.	100 $\pm$ 3
Bile	100	—	97 $\pm$ 3
Feces	1000	—	91 $\pm$ 4
Relative recovery of bile acid to internal standard			
Serum	Glycolithocholic acid sulfate	—	87 $\pm$ 5
	^2H -Chenodeoxycholic acid	—	89 $\pm$ 6
	Cholic acid	—	97 $\pm$ 5
Urine	Glycolithocholic acid sulfate	Sulf.	86 $\pm$ 6
	^2H -Chenodeoxycholic acid	Nonsulf.	89 $\pm$ 4
Bile	Glycolithocholic acid	—	89 $\pm$ 5
	^2H -Chenodeoxycholic acid	—	92 $\pm$ 5
Feces	Glycolithocholic acid	—	87 $\pm$ 7

Internal standard: 12-ketochenodeoxycholic acid.

行ない検討したところ、内因性の 12-KCDCA あるいは他の成分に由来するピークは検出されず、妨害は無いことから、IS として 12-KCDCA を採用した。

7) ^3H -CDCA の安定性

11, 12 標識位の生体内安定性は Cowen⁴⁾ によりトリチウム標識体で確認されている。著者らは定量操作中における標識重水素の脱離について検討した。

Solvolysis および alkaline hydrolysis を行なったときの ^3H -CDCA のマススペクトルは未処理時と比較して m/e 370—372 のイオン強度において差は認められず、11, 12 位に標識した ^3H は安定であると判断した。

8) 検量線

^3H -CDCA, CDCA, LCA, DCA, UDCA, CA, 7-KLCA および IS を含む標準溶液について GC-MF 測定を行ない、IS に対する相対検量線として Fig. 5 に示した。検出限界は注入量として 1 ng で 900 ng まで良好な直線性が得られた。

9) 定量法の回収率および再現精度

全定量操作を通しての回収率を測定した結果を Table V に示した。IS の絶対回収率は血清、尿、胆汁、糞において 91—106% であり、胆汁酸の IS に対する相対回収率も各生体試料において 86—97% と良好であった。

Fig. 5. Calibration Curves of Methyl Ester Propionate Derivatives of Bile Acids by Gas Chromatography-Mass Fragmentography

IS: Internal standard (100 ng of 12-ketochenodeoxycholate)

Lines: 1. Lithocholate; 2. Chenodeoxycholate; 3. 11,12- $^3\text{H}_2$ -chenodeoxycholate.

Relative sensitivities of other bile acids to lithocholate: Deoxycholate 0.79; Ursodeoxycholate 0.54; 7-Ketolithocholate 0.26; cholate 0.55.

TABLE VI. Reproducibility of Bile Acid Analysis of Serum

Bile acid	Mean ($\mu\text{g/ml}$ serum, $n=4$)	Standard dev.	Rel. std. dev. (%)
Deoxycholic acid	0.66	0.026	3.9
Chenodeoxycholic acid	1.28	0.043	3.4
Ursodeoxycholic acid	0.25	0.021	8.4
Cholic acid	0.33	0.019	5.8

TABLE VII. Bile Acid Levels in Urine, Serum, Bile and Feces of Four Healthy Men

Sample		Bile acid levels (mean $\pm$ S.D., $n=4$)						
		LCA	DCA	UDCA	7-KLCA	CDCA	CA	Total
Urine ($\mu\text{g/day}$)	NS	27 $\pm$ 21	120 $\pm$ 39	84 $\pm$ 30	736 $\pm$ 476	155 $\pm$ 69	428 $\pm$ 251	1550 $\pm$ 784
	S	330 $\pm$ 119	610 $\pm$ 402	248 $\pm$ 125	204 $\pm$ 78	284 $\pm$ 221	65 $\pm$ 33	1741 $\pm$ 818
	NS+S	357 $\pm$ 127	730 $\pm$ 418	332 $\pm$ 148	940 $\pm$ 519	439 $\pm$ 196	493 $\pm$ 271	3291 $\pm$ 1178
	S%	92 $\pm$ 4.2	84 $\pm$ 12	75 $\pm$ 7.6	22 $\pm$ 11	65 $\pm$ 22	13 $\pm$ 4.8	53 $\pm$ 14
Serum ($\mu\text{g/ml}$)	NS+S	0.22 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.14	0.40 $\pm$ 0.09	NE	0.80 $\pm$ 0.32	0.22 $\pm$ 0.10	2.26 $\pm$ 0.46
Bile (mg/ml)	NS	0.09 $\pm$ 0.06	3.42 $\pm$ 2.16	0.33 $\pm$ 0.37	NE	6.10 $\pm$ 4.70	4.22 $\pm$ 3.93	14.2 $\pm$ 9.8
Feces (mg/day)	NS	100 $\pm$ 82	137 $\pm$ 132	6.2 $\pm$ 3.0	NE	6.2 $\pm$ 3.0	3.1 $\pm$ 2.5	249 $\pm$ 218

NE: not estimated, NS: nonsulfate, S: sulfate, S%: percent of S/(NS+S).

TABLE VIII. Previously Reported Bile Acid Levels in Urine and Serum of Human

Sample	Bile acid levels							Method	Year	Remarks
	LCA	DCA	UDCA	7-KLCA	CDCA	CA	Total			
Urine ($\mu\text{g/day}$)										
a) NS	NE	97	NE	NE	—	—	97	GC	1975	Healthy person ($n=3$)
S	NE	131	NE	NE	63	12	206			
NS+S	NE	228	NE	NE	63	12	303			
b) NS(U,G,T)	—	90 $\pm$ 78	—	—	—	195 $\pm$ 65	1081 $\pm$ 745	GC-MC	1977	Healthy person ($n=5$)
S(MoS)	504 $\pm$ 98	545 $\pm$ 321	71 $\pm$ 27	—	341 $\pm$ 157	28 $\pm$ 12	1998 $\pm$ 392			
NS+S	504 $\pm$ 98	635 $\pm$ 341	71 $\pm$ 27	—	341 $\pm$ 157	223 $\pm$ 59	3069 $\pm$ 643			
Serum ($\mu\text{g/ml}$)										
a) NS	NE	0.200	NE	NE	0.356	0.068	0.624	GC	1975	Healthy person ($n=8$)
S	NE	0.029	NE	NE	0.033	0.000	0.062			
NS+S	NE	0.229	NE	NE	0.389	0.068	0.686			
c) NS	0.04 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.50	NE	NE	0.46 $\pm$ 0.49	0.86 $\pm$ 1.00	1.80 $\pm$ 1.92	GC	1975	Healthy person ($n=10$)
S	0.21 $\pm$ 0.20	0.00 $\pm$ 0.00	NE	NE	0.05 $\pm$ 0.12	0.00 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.23	(Without XAD-2 column extraction)		
NS+S	0.25 $\pm$ 0.18	0.46 $\pm$ 0.50	NE	NE	0.51 $\pm$ 0.48	0.86 $\pm$ 1.00	0.86 $\pm$ 1.00			
b) NS(U,G,T)	—	0.24	—	—	0.41	1.64	2.46	GC-MC	1977	Women with cholestasis ($n=1$)
S(MoS)	0.23	0.24	—	—	0.22	0.01	0.78			
NS+S	0.23	0.48	—	—	0.63	1.65	3.24			

Bile acid levels were approximated to $\mu\text{g/day}$ in urine and $\mu\text{g/ml}$ in serum.

a) Ref. 5a.

b) Ref. 19. Unconjugated bile acid values represent sum of unconjugates, glycine conjugates and taurine conjugates.

c) Ref. 6.

NS: nonsulfate; S: sulfate; NE: not estimated; —: not detected.

次に本定量法の再現精度を検討するために同一血清試料について4回の反復処理を行なった結果をTable VIに示した。血清中の主要胆汁酸について各処理操作による相対標準誤差は4—8% ($n=4$)であり再現精度は良好であった。

10) 内因性胆汁酸分析値

本定量法による健康人 ($n=4$) の各生体試料中の胆汁酸分析値をTable VIIに示した。Sulfate胆汁酸の定量精度を向上した本法において、尿中胆汁酸における sulfate 胆汁酸の比率はLCAの $92 \pm 4.2\%$ (mean $\pm$ S.D., $n=4$) また総胆汁酸の $53 \pm 14\%$ と高い値を示した。またTable VIII中、血清の分析値は sulfate と nonsulfate 胆汁酸の合算値であるが、尿と同様に LH-20 カラムで分画したときLCAの 80.2%, DCAの 30.4%, CDCAの 9.8% が sulfate 胆汁酸であった。従来定量されていない 7-KLCA²³⁾ が尿中に多量 ($940 \pm 519 \mu\text{g/day}$) に検出された。

本定量法によるこれら分析値を文献値^{5a,6,19)} (Table VIII) と比較したところ尿、血清中主要胆汁酸の濃度および sulfate 比率は Almé¹⁹⁾ の値に近かった。

以上、GC-MFによる本定量法は従来のGC法に比べ検出感度は10—50倍高く、²⁹⁾ 各胆汁酸間の分離も良いため、血清、尿中の微量胆汁酸が精度よく定量でき、また解毒機構で注目されている sulfate 胆汁酸の定量精度も向上した。また ^3H -CDCAを投与してヒトでの代謝測定も可能であり、その一環としての胆汁酸の pool size の測定にも使用できるものであることから今後の応用が期待される。

謝辞 終りに、生体試料採取で御協力賜った東京慈恵会医科大学第一内科の藤沢 洵博士と定量法について有益な御助言を賜った北海道大学第二内科の牧野 勲博士に感謝の意を表します。また本研究の発表に許可と御助言を賜ったエーザイ株式会社の友枝宗光研究開発本部長、大竹信三郎薬理研究所長、森 豊機器分析室長をはじめ御協力頂いた R.K. Garg, 今林助広, 若林邦夫, 山城智子の諸氏に感謝致します。