

報 文

ガスクロマトグラフィー/質量分析法による胆汁酸生合成中間体の定量法の開発

村 井 毅*, 山口 佳奈*, 吉村 昭毅*, 恵 淑 萍*, 黒澤 隆夫®*

Development of an analytical method for intermediates in
bile acid biosynthesis by GC/MS

Tsuyoshi MURAI, Kana YAMAGUCHI, Teruki YOSHIMURA, Shu-Ping HUI and Takao KUROSAWA*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Toubetsu, Hokkaido 061-0293

(Received 18 January 2002, Accepted 4 March 2002)

A method for the analysis of bile alcohols and hydroxycholesterols as intermediates in mono-hydroxyl bile acid biosynthesis has been developed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) with selected ion monitoring in a high-resolution mode. The linearity of the calibration curves for the bile alcohols, hydroxycholesterol and bile acids ranged from 10~250 pmol ($r > 0.999$), and the detection limits were 50~100 fmol ($S/N = 2 \sim 6$). The recoveries of the bile alcohols, hydroxycholesterol and bile acids from the rat liver mitochondrial fraction ranged over 97.9~111%, respectively, of the added amounts of their standard samples. The present method was made available for the determination of bile alcohols, hydroxycholesterol and related monohydroxy bile acids in incubation mixtures after only a simple extraction procedure using a solid-phase extraction cartridge.

Keywords : GC/MS; monohydroxy bile acid; bile alcohol; hydroxycholesterol; biosynthesis of bile acid.

1 諸 言

3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (1a) 及び 3 β -hydroxy-5-cholen-24-oic acid (1b) 等のモノヒドロキシ胆汁酸は、胆汁うっ滞を誘起する原因物質の一つであることが知られており¹⁾²⁾, その発症機構の解明, 予防法並びに治療法の開発に関連して, モノヒドロキシ胆汁酸の生成機構に大きな関心が寄せられている。通常の胆汁酸(コール酸: CA 及びケノデオキシコール酸: CDCA)の生合成はコレステロールが7 α 位の水酸化を受け³⁾, 母核の変換後, 炭素数27の高級胆汁酸へと変換される^{4)~10)}。これらは更に β -酸化により, 側鎖の酸化開裂を受け, 胆汁酸へと変換される^{11)~13)}。モノヒドロキシ胆汁酸の生成機構についても CA

及び CDCA と同様に考えられているが, 最近, 著者らは胆汁酸生合成中間体である高級胆汁酸の β -酸化系酵素による側鎖切断反応が, モノヒドロキシ胆汁酸に対しては進行しないことを明らかにした¹⁴⁾。したがって, モノヒドロキシ胆汁酸の生成は, β -酸化を経由せず 25-水酸化反応¹⁵⁾¹⁶⁾ (25-hydroxylase pathway) のような副経路, あるいはこれまで見いだされていない新規の生合成経路により生成することが推測される。

25-水酸化反応による胆汁酸生合成経路では, コレステロールより導かれた 3 α ,7 α ,12 α -トリヒドロキシ-5 β -コレスタン (THC) が, 肝ミクロソームに存在する 25-水酸化酵素¹⁷⁾により水酸化を受け, 3 α ,7 α ,12 α ,25-テトラヒドロキシ-5 β -コレスタン (25-THC) に変換された後, 引き続き 24 位が水酸化を受け 3 α ,7 α ,12 α ,24,25-ペンタヒドロキシ-5 β -コレスタン (24,25-THC) が生成する¹⁸⁾¹⁹⁾。その後, 可

* 北海道医療大学薬学部: 061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757

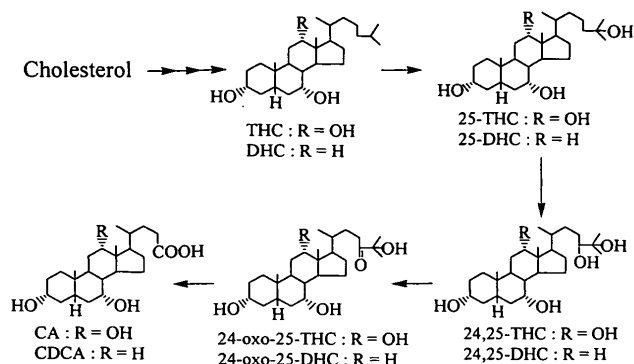


Fig. 1 25-Hydroxylase pathway in bile acid biosynthesis

溶性画分に存在する酵素により $3\alpha,7\alpha,12\alpha,25$ -テトラヒドロキシ- 5β -コレスタン-24オン (24-oxo-25-THC) へと変換され²⁰⁾, 最終的に側鎖が開裂し CA が生成するとされている (Fig. 1). しかし, モノヒドロキシ胆汁酸の生成に本経路がどのように関与しているかは全く知られていない.

これまで, 高速液体クロマトグラフィー^{21)~24)}及びガスクロマトグラフィー/質量分析法²⁵⁾²⁶⁾ (GC/MS) による, 各種胆汁アルコール並びに胆汁酸の多くの分析法が開発され, 体内動態の解析並びに胆汁酸生合成酵素の活性測定等, 胆汁酸生合成機構の解明に応用されている. これら分析法には煩雑なクリーンアップ操作が必須となる場合が多く, より簡便性に優れた分析法の開発が望まれる. 高分解能 GC/MS 法は上記分析法に比べ, 極めて高い選択性を有することから, より高精度な分析が可能になるばかりか, 煩雑なクリーンアップ操作を必要とせず, より簡便性に優れた分析が可能と考えられる. 以上のことから, 著者らはモノヒドロキシ胆汁酸の生成機構と 25-水酸化による胆汁酸の生成経路の関連性を明らかにすることを目的として, Fig. 2 に示したモノヒドロキシ胆汁酸 (1a, 1b) 並びに, 生合成中間体と推定される各種胆汁アルコール (2a~8a) 及びヒドロキシコレステロール (3b~8b) の, 高分解能 GC/MS 法による一斉分析法の開発を行った.

2 実験

2.1 胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロール及び胆汁酸標品

3α -ヒドロキシ- 5β -コラン酸 (1a) は市販品を再結晶により精製したものを使用した. 3α -ヒドロキシ- 5β -コレスタン (2a), $3\alpha,24$ -ジヒドロキシ- 5β -コレスタン (3a), $3\alpha,25$ -ジヒドロキシ- 5β -コレスタン (4a), $3\alpha,26$ -ジヒドロキシ- 5β -コレスタン (5a), $3\alpha,25$ -ジヒドロキシ- 5β -コレスタン-24オン (6a), $3\alpha,24,25$ -トリヒドロキシ- 5β -コレスタン (7a), $3\alpha,25,26$ -トリヒドロキシ- 5β -コレスタン (8a) 並びに 3β -ヒドロキシ- 5 -コレン酸 (1b), $3\beta,24$ -ジヒドロキシ-コレスト-5-エン (3b), $3\beta,25$ -ジヒドロキシ-コレスト-5-エン (4b), $3\beta,25$ -ジヒドロキシ-コレスト-5-エン (5b), $3\beta,25$ -ジヒドロキシ-コレスト-5-エン-24-オン (6b), $3\beta,24,25$ -トリヒドロキシ-コレスト-5-エン (7b), $3\beta,24,26$ -トリヒドロキシ-コレスト-5-エン (8b) は当研究室で既に合成したものを使用した.

エン (4b), $3\beta,26$ -ジヒドロキシ-コレスト-5-エン (5b), $3\beta,25$ -ジヒドロキシ-コレスト-5-エン-24-オン (6b), $3\beta,24,25$ -トリヒドロキシ-コレスト-5-エン (7b), $3\beta,24,26$ -トリヒドロキシ-コレスト-5-エン (8b) は当研究室で既に合成したものを使用した.

2.2 装置及び分析条件

分析にはマイクロマス製 Auto Spec 3000 型ガスクロマトグラフ/質量分析計を用いた. 分離カラムは J&W 製メチルシリコン系溶融シリカキャピラリーカラム DB-1 (0.25 mm × 30 m) を使用した. 分析は注入口温度 300℃ に設定し, スプリットレスモードを使用した. カラム温度は初期温度 150℃ で 2 分間保持した後, 30℃/min の割合で 230℃ まで昇温した. 次に, 3 分間同温度で保持した後, 3℃/min の割合で 310℃ まで昇温した. キャリヤガスにはヘリウムを用い, 流量を 1 ml/min に設定した. イオン源温度は 290℃, イオン化電圧は 70 eV に設定した. 分解能は 10000 以上となるように設定した.

2.3 胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロール及び胆汁酸の揮発性誘導体化

胆汁アルコール及びヒドロキシコレステロールのメタノール溶液 (1 µg/ml) を調製し, その 100 µl を採取し溶媒留去後, 残留物にヘキサメチルジシラザン及びトリメチルクロロシランのピリジン溶液 (50 µl) を加え, 60℃ で 60 分間加温しトリメチルシリル (TMS) エーテル誘導体とした. 胆汁酸の誘導体化は, ジアゾメタンのエーテル溶液を加え室温で 10 分間反応し, メチルエステルとした後, 同様に TMS エーテル誘導体とした.

2.4 酵素反応液からの胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロール及び胆汁酸の抽出法の検討

タンパク量として 1 mg のラット肝ミクロソーム, ミトコンドリア及び可溶性画分を含む酵素反応液 (1.0 ml) に, 既知量の胆汁酸 (1a, 1b) 及び胆汁アルコール (2a~8a), ヒドロキシコレステロール (3b~8b) を氷冷下添加し, 次にエタノール (4 ml) 及び内標準物質 ($3\beta,24$ -ジヒドロキシ- 5 -コレン) を加え, 遠心分離 (2800 rpm, 10 分) 後, 上澄みを回収した. 溶媒を留去した後, 残留物に水 (1 ml) を加え, Bond Elut C18 カートリッジ (3 ml, バリアン製) に通導した. 水 (4 ml) で洗浄後, 10% クロロホルム-メタノール溶液 (5 ml) で溶出した. 溶媒を留去した後, 2.3 の実験条件に従って誘導体化を行った.

3 結果及び考察

Fig. 2 に示したモノヒドロキシ胆汁酸の生合成中間体として推定される各種胆汁アルコール及びヒドロキシコレス

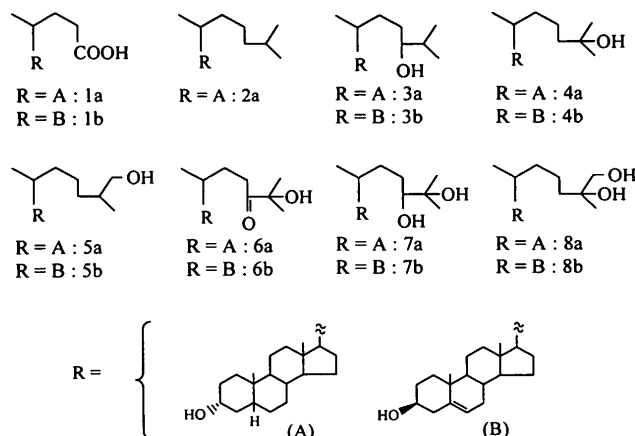


Fig. 2 Standard compounds expected as intermediates in the biosynthesis of monohydroxy bile acids

テロールを測定対象として, GC/MS による分析法の開発を行った。

3・1 揮発性誘導体化条件の検討

ケトール構造を有する 3 α ,25-ジヒドロキシ-5 β -コレスト-24-オン (6a) 並びに 3 β ,25-ジヒドロキシ-コレスト-5-エン-24-オン (6b) では, シリルエーテル誘導体へ変換する際に, カルボニル基のエノール化が進行し, 単一ピークが得られない可能性があるため, 誘導体化条件について検討した。誘導体化試薬として 1) トリメチルシリルイミダゾール (TMSI), 2) ジメチルエチルシリルイミダゾール (DMESI), 3) 20% TMSI-アセトニトリル溶液, 4) 20% DMESI-アセトニトリル溶液を用い, それぞれ誘導体化を行い GC/MS により分析した。その結果, 1), 2) では, 目的とするピークのほかに 24 位ケトンエノール化に起

因したと推定されるピークが認められた。また, 3), 4) では, 上記副産物は認められないものの, 25 位水酸基を有する胆汁アルコール及びヒドロキシコレステロールのシリル化が完全に進行せず, 複数のピークを与えた。そこで, ヘキサメチルジシラザン及びトリメチルクロロシランのピリジン溶液を誘導体化試薬として用いたところ, 上記副産物は認められず, またほかの胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロール及び胆汁酸のシリル化も完全に進行した。

3・2 高分解能 SIM による胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロール及び胆汁酸の分離条件の検討

GC/MS における胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロール及び胆汁酸の TMS エーテル誘導体の分離条件, 並びに特徴的なフラグメントイオンをモニターイオンとする高分解能選択イオンモニタリング (SIM) 法について検討を行った。Table 1 に主なフラグメントイオン, 高分解能 SIM 測定におけるモニターイオン並びに相対保持時間を示した。すべての化合物において, 脱メチル基に基づくフラグメントイオン ($M^+ - 15$) 及びトリメチルシリノール ($M^+ - n \times 90$) が順次脱離したイオンが観測された。また, GC において保持時間の接近した成分も, 異なった質量数の特性イオンをモニターイオンとする SIM 法により分離可能と考えられた。Table 1 に示したモニターイオンを用いて高分解能 SIM を行ったところ, Fig. 3 (a), (b) に示すように胆汁酸並びに対応する胆汁アルコール, ヒドロキシコレステロールは良好に分離され, 25 分で分析は終了した。次いで, 内標準物質に 3 β ,24-ジヒドロキシ-5-コレンを用いて各成分の特性イオンとの面積比から検量線の作成を行ったところ, 10 ~ 250 pmol の範囲でいずれも良好な

Table 1 GC/mass spectrometric data of the TMS ether derivatives of standard bile acids and their expected biosynthetic intermediates

Bile acids, bile alcohols and hydroxycholesterols	RRT*	Monitor ion (m/z)	Fragment ions (m/z) (Relative intensity, %)
3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (1a)	1.00 ^{a)}	372.3028	215(93.8), 357(29.9), 372(100), 447(6.24), 462(1.52)
3 α -hydroxy-5 β -cholestane (2a)	0.92	370.3600	215(36.3), 355(36.7), 370(100), 445(2.21), 460(1.80)
3 α ,24-dihydroxy-5 β -cholestane (3a)	1.20	415.3396	145(100), 415(58.1), 325(41.2), 505(6.12), 533(0.21)
3 α ,25-dihydroxy-5 β -cholestane (4a)	1.21	131.0892	131(100), 215(4.32), 533(1.23)
3 α ,26-dihydroxy-5 β -cholestane (5a)	1.28	458.3944	215(77.6), 257(41.9), 443(24.9), 458(100), 533(1.82)
3 α ,25-dihydroxy-5 β -cholestane-24-one (6a)	1.34	131.0892	131(100), 159(1.65), 257(0.91), 457(0.41), 547(0.21)
3 α ,24,25-trihydroxy-5 β -cholestane (7a)	1.45	131.0892	131(100), 325(1.41), 415(1.32), 621(0.31)
3 α ,25,26-trihydroxy-5 β -cholestane (8a)	1.46	533.4210	257(12.5), 353(30.5), 443(15.6), 533(100), 621(4.62)
3 β -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (1b)	1.00 ^{b)}	331.2630	129(100), 331(83.1), 370(46.0), 445(8.1), 460(22.1)
3 β ,24-dihydroxy-cholest-5-ene (3b)	1.21	413.3240	129(48.7), 145(100), 413(66.2), 531(3.21), 546(5.12)
3 β ,25-dihydroxy-cholest-5-ene (4b)	1.22	131.0892	131(100), 271(15.8), 456(8.01), 532(1.3), 546(3.9)
3 β ,26-dihydroxy-cholest-5-ene (5b)	1.28	456.3788	129(100), 417(74.0), 456(71.0), 531(11.0), 546(28.8)
3 β ,25-dihydroxy-cholest-5-ene-24-one (6b)	1.35	131.0892	131(100), 159(1.80), 545(0.52)
3 β ,24, 25-trihydroxy-cholest-5-ene (7b)	1.44	131.0892	131(100), 413(1.01), 619(0.51)
3 β ,25, 26-trihydroxy-cholest-5-ene (8b)	1.46	531.4053	129(28.6), 219(37.0), 441(17.1), 531(100), 619(5.71)

* Relative retention time. a) Retention time is 15.95 min. b) Retention time is 17.12 min.

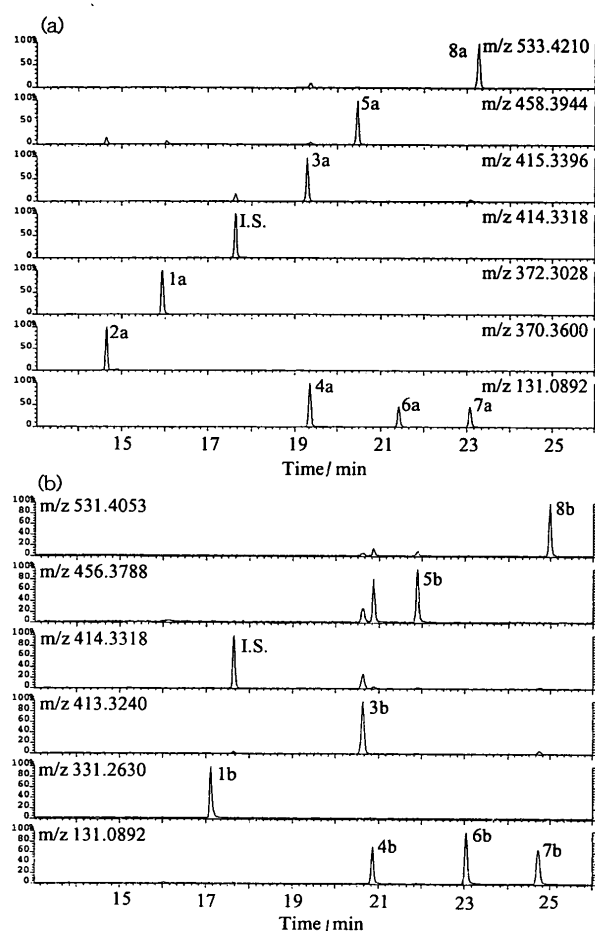


Fig. 3 Selected ion chromatograms of the reference compounds as the TMS derivatives

1a: 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid; 2a: 3 α -hydroxy-5 β -cholestane; 3a: 3 α ,24-dihydroxy-5 β -cholestane; 4a: 3 α ,25-dihydroxy-5 β -cholestane; 5a: 3 α ,26-dihydroxy-5 β -cholestane; 6a: 3 α ,25-dihydroxy-5 β -cholestane-24-one; 7a: 3 α ,24,25-trihydroxy-5 β -cholestane; 8a: 3 α ,25,26-trihydroxy-5 β -cholestane; 1b: 3 β -hydroxy-5-cholen-24-oic acid; 3b: 3 β ,24-dihydroxy-cholest-5-ene; 4b: 3 β ,25-dihydroxy-cholest-5-ene; 5b: 3 β ,26-dihydroxy-cholest-5-ene; 6b: 3 β ,25-dihydroxy-cholest-5-ene-24-one; 7b: 3 β ,24,25-trihydroxy-cholest-5-ene; 8b: 3 β ,25,26-trihydroxy-cholest-5-ene; I.S.: internal standard (3 β ,24-dihydroxy-5-cholene)

直線性 ($r > 0.999$) を示した。また、検出限界は 50~100 fmol ($S/N = 2 \sim 6$) であった。

3.3 ラット肝ミトコンドリア画分を用いた添加・回収実験

本分析法の実試料への適用を目指して、ラット肝ミトコンドリア画分を酵素源として用いる、酵素反応生成体の分析への適用を検討した。酵素反応液からの胆汁アルコール、ヒドロキシコレステロール並びに胆汁酸の抽出には操作の簡便性を考慮し、逆相系固相抽出カートリッジを用いることとした。ラット肝ミトコンドリア画分に既知量の胆

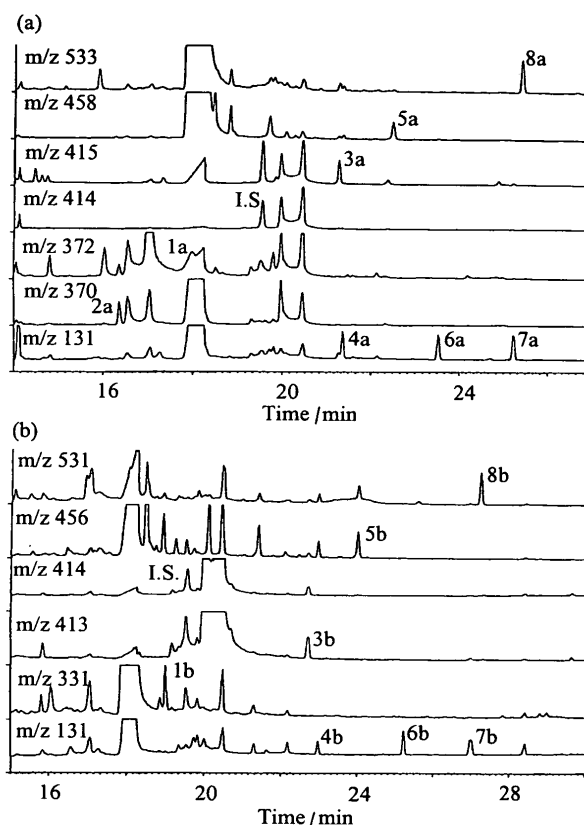


Fig. 4 Low resolution selected ion chromatograms of 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid and its biosynthetic intermediates (a), and 3 β -hydroxy-5-cholen-24-oic acid and its biosynthetic intermediates (b) from rat liver mitochondrial fraction after addition of reference compounds

Peak identities are the same as in Fig. 3.

汁アルコール、ヒドロキシコレステロール並びに胆汁酸を添加し、2.4の実験条件に従い抽出し、誘導体化後、分解能 600 での低分解能測定 {Fig. 4(a), (b)} 及び分解能 10000 での高分解能測定 {Fig. 5(a), (b)} を行い、得られたクロマトグラムを比較した。Fig. 4 及び 5 に示すように、分解能の異なる条件下で得られたクロマトグラムで各成分の同定は可能であったが、低分解能 {Fig. 4(a), (b)} の場合には生体試料由来のきょう雑ピークが極めて多く認められ、定量は困難であり、さらなる試料の精製が必要と考えられた。一方、高分解能 {Fig. 5(a), (b)} では、低分解能のクロマトグラムに比べきょう雑ピークは著しく減少し、精製操作は必要ないことが判明した。また、各成分の内標準物質に対する相対回収率は 97.9~111% と良好な値を示し、相対標準偏差も 0.8~9.7% と満足すべき結果を与えた (Table 2)。

現在、開発した分析法を用いて、ラット肝におけるモノヒドロキシ胆汁酸の生成機構について検討中である。また、本法は血液及び尿試料への適用が可能と考えられ、各

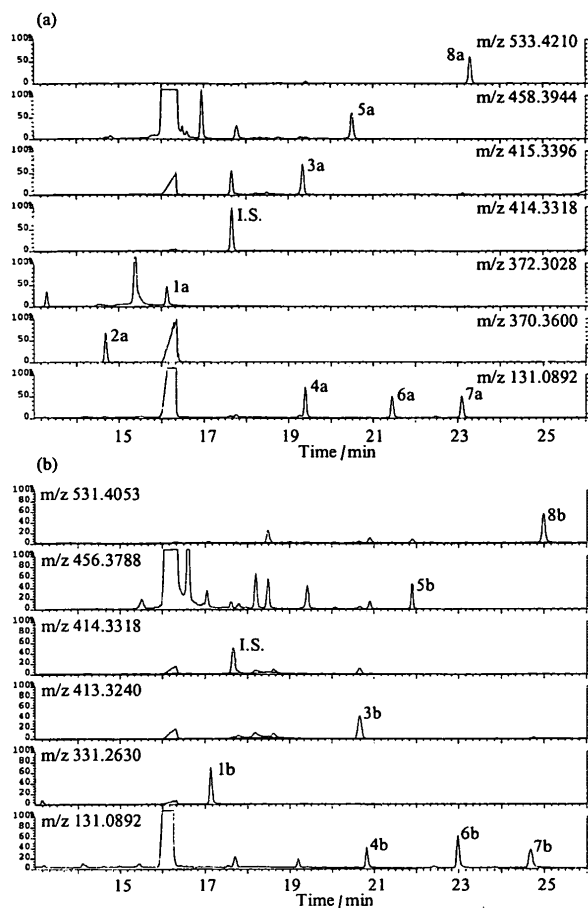


Fig. 5 High resolution selected ion chromatograms of 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oic acid and its biosynthetic intermediates (a), and 3β -hydroxy-5-cholen-24-oic acid and its biosynthetic intermediates (b) from rat liver mitochondrial fraction after addition of reference compounds

Peak identities are the same as in Fig. 3.

種胆汁酸代謝異常症の解析にも応用できるものと思われる。

文 献

- 1) N. B. Javitt, S. Emerman: *J. Clin. Invest.*, **48**, 1002 (1968).
- 2) R. Arnon, T. Yoshimura, A. Reiss, K. Budai, J. H. Lefkowitz, N. B. Javitt: *Gastroenterology*, **115**, 1223 (1998).
- 3) H. Danielsson, K. Einarsson, P. Johansson: *J. Clin. Invest.*, **55**, 478 (1975).
- 4) S. Bergstrom: *Rec. Chem. Progr.* (Kregg-Hooker Sci. Lib), **16**, 63 (1955).
- 5) S. Bergstrom, K. Paabo, J. A. Rumpf: *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1109 (1954).
- 6) I. Bjorkhem, H. Danielsson, K. Einarsson, G. Johansson: *J. Clin. Invest.*, **47**, 1573 (1968).
- 7) I. Bjorkhem, J. Gustafsson: *J. Biol. Chem.*, **249**, 2528 (1974).
- 8) Y. Atsuta, K. Okuda: *J. Lipid Res.*, **23**, 345 (1982).
- 9) K. Okuda, H. Danielsson: *Acta Chem. Scand.*, **19**, 2160 (1965).
- 10) K. Okuda, N. Tanigawa: *Biochem. Biophys. Acta*, **222**, 141 (1970).
- 11) J. Gustafsson: *J. Biol. Chem.*, **250**, 8234 (1975).
- 12) J. I. Pedersson, J. Gustafsson: *FEBS Lett.*, **121**, 345 (1980).
- 13) F. Kase, I. Bjorkhem, J. I. Pedersson: *J. Lipid Res.*, **24**, 1560 (1983).
- 14) T. Kurosawa, M. Sato, F. Kikuchi, T. Watanabe, T. Suga, M. Tohma: *Steroids*, **62**, 474 (1997).
- 15) G. Salen, S. Shefer, F. W. Chang, B. Dayal, A. K. Batta, G. S. Tint: *J. Clin. Invest.*, **63**, 38 (1979).
- 16) W. C. Daune, I. Bjorkhem, J. N. Hamilton, S. M. Muller: *Hepatology*, **8**, 613 (1988).
- 17) W. C. Daune, P. A. Pooler, J. N. Hamilton: *J. Clin. Invest.*, **82**, 82 (1988).

Table 2 Relative recoveries of bile acids and their expected biosynthetic intermediates from rat liver mitochondrial fraction

Bile acids, bile alcohols and hydroxycholesterols	Added amount/ng	Relative recovery, %	RSD, % ^{a)}
1a	50	102.0 ± 1.4*	1.4
2a	50	99.2 ± 1.6	1.6
3a	50	99.2 ± 2.2	2.3
4a	50	99.8 ± 1.7	1.7
5a	50	103.8 ± 2.1	2.2
6a	50	100.7 ± 1.9	1.8
7a	50	101.1 ± 3.6	3.5
8a	50	98.5 ± 0.8	0.8
1b	50	97.9 ± 9.7	9.7
3b	50	98.3 ± 8.8	9.0
4b	50	105.0 ± 5.1	4.8
5b	50	100.1 ± 3.0	3.0
6b	50	111.0 ± 6.2	5.5
7b	50	110.6 ± 9.0	8.2
8b	50	108.2 ± 5.8	5.4

3β ,24-dihydroxy-5-cholene (50 ng) was added as an internal standard for GC/MS analysis. a) Relative standard variation. *) Mean ± S.D. (n = 5).

- 18) M. Nakagawa, M. Une, S. Takenaka, T. Kuramoto, D. Abukawa, K. Iinuma: *Acta. Paediatr.*, **88**, 1078 (1999).
19) B. Dayal, G. S. Tint, A. K. Batta, S. Shefer, G. Salen, A. K. Bose. B. N. Pramanic: *J. Lipid Res.*, **24**, 208 (1983).
20) C. Furster, K. Wikvall: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1437**, 46 (1999).
21) S. Miyazaki, H. Tanaka, R. Horikawa, H. Tsuchiya, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **181**, 177 (1980).
22) A. K. Batta, S. Shefer, M. Batta, G. Salen: *J. Lipid Res.*, **26**, 690 (1985).
23) J. Goto, T. Chikai, T. Nambara: *Anal. Sci.*, **2**, 175 (1987).
24) S. Ikegawa, N. Hirabayashi, T. Yoshimura, M. Tohma, M. Maeda, A. Tsuji: *J. Chromatogr.*, **577**, 229 (1992).
25) R. Mahara, H. Takeshita, T. Kurosawa, S. Ikegawa, M. Tohma: *Anal. Sci.*, **3**, 449 (1987).
26) M. Szuki, T. Murai, T. Yoshimura, A. Kimura, T. Kurosawa, M. Tohma: *J. chromatogr. B.* **69**, 11 (1997).

要 旨

モノヒドロキシ胆汁酸 (3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oic acid 及び 3β -hydroxy- 5β -cholen-24-oic acid) は胆汁うっ滞を誘起する原因物質の一つであり、これらの新規生成経路の存在が推測されている。また、胆汁酸生合成機構の一つとして、25 位水酸化による側鎖切断反応が知られている。上記胆汁酸の生成機構と本経路の関連を検討することを目的として、生合成中間体と推測される各種胆汁アルコール、ヒドロキシコレステロール及び上記胆汁酸の GC/MS による一斉分析法の開発を行った。各種中間体標品をトリメチルシリルエーテル誘導体とした後、高分解能選択イオンモニタリング (SIM) 法により分析を行った。得られた検量線はいずれも 10~250 pmol の範囲で良好な直線性を示した。検出限界は 50~100 fmol であった。逆相系固相抽出法を用いる前処理のみで生体由来の妨害ピークは認められなかった。本分析法は各種生体試料中の上記中間体及び胆汁酸の分析法として適用可能であることが明らかとなった。