

# 마이크로바이옴 해독: 생물학적 시료 내 담즙산(BA)의 표적 LC/MS/MS 분석

## 저자

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.

## 개요

담즙산(BA)은 식이 지방과 지용성 비타민의 소화와 흡수에 관여하는 중요한 분자입니다. 이러한 양친매성 화합물은 소장에서 지방의 유화를 촉진하여 영양소의 효율적인 흡수를 돕습니다. 1차 담즙산은 간에서 복잡한 과정을 거쳐 콜레스테롤로부터 합성되며, 지질 항상성을 유지하기 위해 엄격하게 조절됩니다. 이러한 1차 담즙산은 일단 생성되면 담낭에 저장되고 음식 섭취에 따라 십이지장으로 분비되어 소화 기능을 수행합니다. 이러한 담즙산의 약 95%는 회장말단에서 재흡수되어 장간순환을 통해 간으로 다시 재순환되는데, 이는 이 시스템의 효율성을 잘 보여주는 대목입니다. 나머지 5%는 재흡수되지 않고 장내 미생물에 의해 광범위한 구조적 변형을 겪습니다. 이 과정을 통해 2차 담즙산이라 불리는 일련의 관련 대사산물이 생성되는데, 이는 고유한 생물학적 활성을 가지며 그 중 많은 부분은 아직 밝혀지지 않았습니다.

최근 연구들은 2차 담즙산이 건강과 질병에 더 넓은 영향을 미치는 것을 보여주고 있습니다. 이들은 면역 조절에 관여하는 것으로 보이며, 면역 세포의 활동과 염증 반응에 영향을 미칠 수 있음을 말합니다. 또한, 2차 담즙산과 발암 및 종양 진행 사이의 연관성을 보여주는 증거가 늘어나고 있으며, 특정 암의 발병과 진행에 있어서 2차 담즙산이 갖는 잠재적인 역할이 강조되고 있습니다. 이러한 발견은 담즙산, 특히 2차 담즙산이 단순한 소화 보조제 이상의 역할을 하며, 복잡한 생리적 과정에 적극적으로 관여한다는 것을 시사합니다. 이들의 다양한 역할을 이해하면 다양한 질병의 발병 기전에 대한 새로운 통찰력을 얻을 수 있으며, 잠재적으로는 새로운 치료 전략을 개발하는 데 도움이 될 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 Agilent 6495D QQQ LC/MS(LC/TQ) 플랫폼을 사용하여 혈장, 혈청 및 분변 시료에서 68종의 담즙산을 표적 분석하기 위한 새로운 표준화된 LC/MS/MS 분석법을 설명합니다.

## 소개

담즙산의 본질적인 복잡성으로 인해 액체 크로마토그래피-질량 분석법(LC/MS)을 사용한 담즙산 분석은 중요하면서도 까다롭습니다. 이러한 화합물은 구조적으로 유사하고 이성질체 종을 광범위하게 포괄하며, 거의 동일한 질량대 전하비( $m/z$ )와 머무름 시간을 나타내는 경우가 많습니다. 이러한 유사성으로 인해 바탕선 분리와 정확한 식별이 특히 어렵습니다.

또한 담즙산은 일반적으로 질량 분석기에서 광범위한 조각화를 겪지 않는 비교적 안정적인 분자입니다. 또한, 더욱 까다로운 조각화로 인해 이성질체 담즙산의 분별이 복잡해져서 머무름 시간을 이용하는 표준화된 분석법의 필요성이 강하게 대두됩니다.

이러한 문제를 더욱 복잡하게 만드는 것은, 미생물군에 의해 생성되는 담즙산 종류 중 많은 부분이 생물학적 시료에서 일반적으로 낮은 농도로 존재한다는 점입니다. 이러한 시료에는 종종 이온 억제나 증강으로 이어질 수 있는 매트릭스 성분이 포함되어 있습니다. 이러한 매트릭스 효과는 정확한 정량 분석을 방해하여 분석을 더욱 복잡하게 만들 수 있습니다. 게다가 서로 밀접하게 관련된 담즙산 종을 구별하기 위해서는 높은 감도와 특이성이 필요하므로 복잡성이 한층 더 커집니다.

이러한 과제를 해결하려면 표준화되고 고도로 최적화된 크로마토그래피 분석법, 첨단 질량 분석 기술, 견고한 시료 전처리 프로토콜이 필수적입니다. 이러한 전략을 함께 적용하면 담즙산 분석의 신뢰성이 향상되어 연구 및 임상 연구 응용 모두에서 정확한 프로파일링이 가능해집니다.

이전에 설명된 LC/TQ 분석법은 26종의 담즙산을 분석하는 데 사용되었습니다.<sup>1</sup> 본 연구에서는 4세대 이온 퍼널 기술을 적용한 6495D LC/TQ를 이용한 새로운 분석법을 소개하며, 이를 통해 감도를 개선하고 복잡한 매트릭스에서 68종의 고유한 담즙산을 분석할 수 있는 범위를 확장할 수 있습니다. 이 담즙산 분석법은 오믹스 분석을 위한 Agilent Standardized LC/MS 플랫폼과 호환되고 일관성을 가지며, 실험실에서 쉽게 전환할 수 있으므로 새로운 통찰력을 빠르게 얻는 데 적합합니다.

## 실험

LC 이동상과 LC/MS 시료 전처리에 사용된 모든 화학물질은 HPLC 또는 LC/MS 등급이었습니다.

### 표준물질 및 전처리

분석법 개발에 사용된 담즙산(BA) 표준은 표 1에 자세히 나와 있는 것처럼 다양한 공급업체에서 공급받았습니다. 분말 표준물질을 메탄올에 녹여 농도가 1.0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  범위인 원액을 제조했습니다. 이러한 원액은 Agilent Jet Stream(AJS) ESI 소스 조건을 최적화하는 데 사용되었습니다(표 2). 다중 반응 모니터링(MRM) 수집 파라미터는 Agilent MassHunter acquisition 소프트웨어 12.1의 소스 및 화합물 최적화 도구를 사용하여 최적화했습니다.

간략히 말하면, 개별 BA 원액을 자동화된 반복 주입 프로그램을 통해 질량 분석기에 순차적으로 주입했습니다(0.5-1 $\mu\text{L}$ ). 양이온 및 음이온 모드 모두에서 최적의 MRM transition을 식별하기 위해  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  및  $[\text{M}-\text{H}]^-$  이온 종을 전구 이온으로 선택했습니다. 이러한 transition은 최적화된 AJS 소스 파라미터(표 2)와 해당 머무름 시간과 함께 최종 수집 방법의 화합물 동적 MRM(dMRM) 수집 목록에 통합되었습니다. 모든 BA는 표준 iFunnel 설정을 사용하여 분석했습니다. 전체 transition 목록과 분석법 세부 정보는 요청 시 애질런트가 제공하는 지원 문서에서 확인할 수 있습니다.

이 광범위한 최적화의 기본 원칙은 다음과 같습니다. (a) 아미노산 결합 BA는 양이온 모드에서 가장 강한 반응을 보였고 결합된 아미노산 손실로 인해 MRM transition이 두드러졌습니다. (b) 결합되지 않은 BA는 비교적 조각화 스펙트럼을 적게 생성했지만 많은 경우에 음이온 모드에서 안정적이고 강한 포름산염 부가물이 형성되었습니다. (c) 포름산염 부가물의 손실을 MRM 스케줄에 포함시키면 특이성과 감도를 높일 수 있습니다. 따라서, 복잡한 매트릭스에서 감도를 높이고 신호대 잡음비(S/N)를 개선하기 위해 해당 선택적 이온 모니터링(SIM) transition도 포함시켰습니다. BA 음이온 모드 부가물을 이용한 유사한 전략은 참고 연구에 자세히 설명되어 있습니다.<sup>1</sup>

표 1. 분석법 개발에 사용되는 BA 표준 목록(다음 페이지에 계속).

이름	약어	분자량	CAS 번호	공급업체	카탈로그 번호
12-Oxolithocholic Acid	12-oxo-LCA	390.3	5130-29-0	Steraloids Inc.	C1650-000
3-Dehydrocholic Acid (3-Oxochocholic Acid)	3-oxo-CA	406.3	2304-89-4	Steraloids Inc.	C1272-000
3-Oxochenodeoxycholic Acid	3-oxo-CDCA	390.3	4185-00-6	Avanti	700255
3-Oxo-Deoxycholic Acid	3-oxo-DCA	390.3	4185-01-7	Avanti	700255
3-Oxolithocholic Acid (Dehydrolithocholic Acid)	3-oxo-LCA	374.3	1553-56-6	Cayman	29544
6,7-Dioxolithocholic Acid	6,7-diketo-LCA	404.3	1643669-23-1	Avanti	700234
3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Tetrahydroxy Bile Acid	6 $\alpha$ -THBA	424.3	80875-92-9	Avanti	700228
3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Tetrahydroxy Bile Acid	6 $\beta$ -THBA	424.3	80875-93-0	Avanti	700189
7,12-Dioxolithocholic Acid	7,12-diketo-LCA	404.3	517-33-9	Avanti	700230
7-Oxochocholic Acid (7-Dehydrocholic Acid)	7-oxo-CA	406.3	911-40-0	Steraloids Inc.	C1250-000
3 $\beta$ -Oh-7-Oxochocholic Acid	7-oxo-chocholic	388.3	25218-38-6	Cayman	29541
7-Oxolithocholic Acid (Nutriacholic Acid)	7-keto-LCA	390.3	4651-67-6	Steraloids Inc.	C1600-000
Allocholic Acid	Allo-CA	408.3	474-25-9	Cayman	30415
Allolithocholic Acid	Allo-LCA	376.3	2276-93-9	Steraloids Inc.	C0680-000
Cholic Acid	CA	408.3	81-25-4	Avanti	700212
Cholic Acid Sulfate	CAS	488.2		Isosciences	13098UNL3SO
Chenodeoxycholic Acid	CDCA	392.3	474-25-9	Avanti	700198
Chenodeoxycholic Acid Sulfate	CDCAS	472.3	59132-32-0	Isosciences	13101UNL3SO
Cholenic Acid	Cholenic	374.3	5255-17-4	Cayman	29543
Deoxycholic Acid	DCA	392.3	83-44-3	Avanti	700197
Deoxycholic Acid Sulfate	DCAS	472.3	67030-48-2	Isosciences	13100UNL3SO
Dehydrocholic Acid	DHCA	402.2	81-23-2	Avanti	700215
Glycocholic Acid	GCA	465.3	475-31-0	Avanti	700265
Glycocholic Acid Sulfate	GCAS	545.3		Isosciences	13443UNL3SO
Glycochenodeoxycholic Acid	GCDCA	449.3	640-79-9	Avanti	700266
Glycochenodeoxycholic Acid Sulfate	GCDCAS	529.3	66874-09-7	Isosciences	13104UNL3SO
Glycodeoxycholic Acid	GDCA	449.3	360-65-6	Avanti	700267
Glycodeoxycholic Acid Sulfate	GDCAS	529.3	67030-54-0	Isosciences	13226UNL3SO
Glycodehydrocholic Acid	GDHCA	459.3	3415-45-0	Steraloids Inc.	C2022-000
Glycohyodeoxycholic Acid	GHDCA	449.3	13042-33-6	Cayman	22643
Glycolithocholic Acid	GLCA	433.3	474-74-8	Avanti	700268
Glycolithocholic Acid Sulfate	GLCAS	513.3	15324-64-8	Isosciences	13231UNL3SO
Glycoursodeoxycholic Acid	GUDCA	449.3	64480-66-6	Avanti	700263
Glycoursodeoxycholic Acid Sulfate	GUDCAS	529.3	133429-88-6	Isosciences	13224UNL3SO
Glyco- $\Gamma$ -Muricholic Acid (Glycohyocholic Acid)	G- $\gamma$ -MCA	465.3	32747-08-3	Steraloids Inc.	C1860-000
Hyodeoxycholic Acid	HDCA	392.3	83-49-8	Avanti	700214
Isoalloolithocholic Acid	Isoallo-LCA	376.6	2276-93-9	Steraloids Inc.	C0700-000
Isocholic Acid (3-Epicholic Acid)	Iso-CA	408.3	3338-16-7	Cambridge	ULM-10566
Isochenodeoxycholic Acid	Iso-CDCA	392.6	566-24-5	TRC	I789600
Isodeoxycholic Acid	Iso-DCA	392.3	566.17-6	Steraloids Inc	C1165-000
Isolithocholic Acid	Iso-LCA	376.3	1534-35-6	Steraloids Inc.	C1475-000
Lithocholic Acid	LCA	376.3	434-13-9	Avanti	700218
Lithocholic Acid Sulfate	LCAS	456.3	34669-57-3	Isosciences	13099UNL3SO
Murideoxycholic Acid (Murocholic Acid)	MDCA	392.3	668-49-5	Steraloids Inc.	C0910-000
Nordeoxycholic Acid	norDCA	378.3	53608-86-9	Avanti	700240
Taurocholic Acid	TCA	515.3	81-24-3	Avanti	700251

이름	약어	분자량	CAS 번호	공급업체	카탈로그 번호
Taurocholic Acid Sulfate	TCAS	595.3	67030-62-0	Isosciences	13232UNL3SO
Taurochenodeoxycholic Acid	TCDCA	499.3	516-35-8	Avanti	700249
Taurochenodeoxycholic Acid Sulfate	TCDCAS	579.3		Isosciences	13105UNL3SO
Taurodeoxycholic Acid	TDCA	499.3	516-50-7	Avanti	700250
Taurodeoxycholic Acid Sulfate	TDCAS	579.3		Isosciences	13225UNL3SO
Taurodehydrocholic Acid	TDHCA	509.2	517-37-3	Avanti	700242
Taurohyodeoxycholic Acid	THDCA	499.3	2958-04-5	Steraloids Inc.	C0892-000
Tauroolithocholic Acid	TLCA	483.3	516-90-5	Avanti	700252
Tauroolithocholic Acid Sulfate	TLCAS	563.3	15324-65-9	Isosciences	13230UNL3SO
Tauroursodeoxycholic Acid	TUDCA	499.3	14605-22-2	Avanti	700247
Tauroursodeoxycholic Acid Sulfate	TUDCAS	579.3		Isosciences	13106UNL3SO
Tauro- $\alpha$ -Muricholic Acid	T- $\alpha$ -MCA	515.3	25613-05-2	Steraloids Inc	C1893-000
Tauro- $\beta$ -Muricholic Acid	T- $\beta$ -MCA	515.3	25696-60-0	Steraloids Inc	C1899-000
Tauro- $\gamma$ -Muricholic Acid	T- $\gamma$ -MCA	515.3		Cayman	22669
Tauro- $\omega$ -Muricholic Acid	T- $\omega$ -MCA	515.3	2456348-84-6	Steraloids Inc.	C1889-000
Ursocholic Acid	UCA	408.3	2955-27-3	Avanti	700229
Ursodeoxycholic Acid	UDCA	392.3	128-13-2	Avanti	700199
Ursodeoxycholic Acid Sulfate	UDCAS	472.3	68780-73-4	Isosciences	13102UNL3SO
$\alpha$ -Muricholic Acid	$\alpha$ -MCA	408.3	2393-58-0	Avanti	700232
$\beta$ -Muricholic Acid	$\beta$ -MCA	408.3	2393-59-1	Avanti	700233
$\gamma$ -Muricholic Acid (Hyochoic Acid)	$\gamma$ -MCA	408.3	547-75-1	Steraloids Inc.	C1850-000
$\omega$ -Muricholic Acid	$\omega$ -MCA	408.3		Avanti	700231

표 2. 질량 분석기 수집 파라미터.

파라미터	값
소스	Agilent Jet Stream Dual ESI
Sheath 가스 온도, 유량	250°C, 11L/분
가스 온도, 유량	180°C, 20L/분
네블라이저	25psi
캐필러리	4,500V(+)/5,000V(-)
노즐	1,000V(+/-)
MS 모드	양이온/음이온
iFunnel 설정	Standard

## 시료 전처리

수컷 및 암컷 마우스와 쥐의 인종된 혈장 시료는 BioIVT(Elevated Science, Westbury, NY)에서 구입했고, 다양한 인간 기증자의 분변 시료는 Medix Biochemica(Maryland Heights, MO)에서 구입했습니다. 생물학적 시료로부터 BA를 추출하는 최적의 조건이 확립되었습니다. 1% 포름산과 d-BA 내부 표준물질을 함유한 아세토니트릴 시료 4개 분량을 사용하여 혈장/혈청 시료(50µL)에서 BA를 추출했습니다. 2시간 동안 실온에서 흔들어 배양한 후, 시료를 원심분리(20분, 13,000rpm, 5°C)하여 단백질을 침전시키고, 상층액을 30°C에서 진공 원심분리하여 건조시켰습니다.

분변 시료는 d-BA 내부 표준물질을 함유한 80% 메탄올을 사용하여 100mg/mL로 추출했습니다. 시료를 6m/s, 사이클당 30초로 6사이클 동안 비드 비팅을 통해 균질화시켰으며, 사이클 사이에 5초의 측정 시간을 두었습니다. 단백질 침전을 촉진하기 위해 -80°C에서 밤새 배양한 후, 시료를 젖은 얼음 위에서 30분 동안 녹인 다음 원심분리(20분, 13,000rpm, 5°C)했습니다. 상층액을 수집하고 이전에 설명한 대로 용매를 증발시켰습니다. 건조 시료를 50% 메탄올(100µL)로 재용해하고 1분간 진탕한 후 원심분리(2분, 13,000rpm, 5°C)하여 불용성 물질을 침전시켰습니다. 그런 다음 상층액을 LC/MS 분석을 위해 유리 분석 바이알로 옮겼습니다.

또는, **Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal Lipid**(Captiva EMR-Lipid) 카트리지가나 플레이트를 추출 프로토콜에 통합하여 시료에서 단백질과 지질을 동시에 제거한 후 건조, 재용해 및 LC/MS 분석을 수행할 수 있습니다. Captiva EMR-Lipid를 사용한 BA 추출 회수율은 일련의 d-BA 표준물질을 사용한 사전 및 사후 스파이크 실험을 통해 평가되었으며, 회수율은 85%를 초과했습니다(데이터는 나타내지 않음). 이러한 결과는 이전에 보고된 대사산물 회수율과 일치합니다.<sup>3</sup>

Captiva EMR-Lipid를 이 워크플로에 포함시키는 것은 지질체학 분석을 동시에 하는 시료의 경우 특히 중요할 수 있습니다. 또한, 분석법의 견고성을 높이고 MS 신호에 미치는 매트릭스 효과를 최소화하기 위한 일반적인 시료 정제에도 유용합니다. 또한, 혈장 시료에 대한 BA 추출 프로토콜은 이전 연구에서 설명한 바와 같이 **Agilent Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼**을 사용한 자동화와 호환됩니다.<sup>2,3</sup>

## 기기

LC/MS 플랫폼은 4세대 iFunnel 기술을 탑재한 **6495D QQQ 질량 분석기**, 그리고 오믹스 응용을 위한 애질런트의 표준 구성을 갖춘 **Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템**으로 구성되었습니다. 이 수집 방법은 Agilent 6495C 모델 및 동일한 표준 오믹스 구성을 갖춘 일반 스테인리스 스틸 Agilent 1290 Infinity II LC와 완벽하게 호환됩니다. Infinity II LC 시스템을 사용하는 모든 분석법은 Infinity III LC 시스템과 완벽하게 호환되며 동일한 분석법 성능을 제공합니다.

## 소프트웨어

MS 데이터는 분석법 개발을 위한 소스 및 화합물 최적화 도구가 내장된 **MassHunter acquisition 소프트웨어 12.1**을 사용하여 수집했습니다. **Agilent MassHunter Qualitative Analysis 12.0** 소프트웨어를 사용하여 수집한 데이터 세트를 시각화하고 정량화 전에 데이터 품질을 평가했습니다.

LC/MS/MS 데이터 세트의 BA 양은 **MassHunter Quantitative Analysis 12.0** 소프트웨어를 사용하여 정량화했습니다. 상대적 측정과 절대적 측정을 위한 정량화 방법은 품질 관리(QC) 주입 중 하나를 사용하여 개발되었습니다. 통계 분석은 **Agilent Mass Profiler Professional(MPP) 15.1**을 사용하여 수행했습니다.

## 담즙산(BA) 분리

BA는 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100mm, 1.9µm 컬럼(제품 번호 **695675-902**)에서 18분 비선형 그레디언트를 사용하여 역상 크로마토그래피로 분리했습니다. 이 과정에 이어 컬럼 세척과 재평형화가 이루어졌고, 총 분석 시간은 23분이었습니다. 최적화된 LC 조건은 표 3에 요약되어 있습니다.

표 3. 크로마토그래피 조건.

액체 크로마토그래피 조건		
컬럼	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100mm, 1.9µm (제품 번호 695675-902)	
컬럼 온도	50°C	
주입량	2µL, 혈장/혈청; 1µL, 분변	
자동 시료 주입기 온도	5°C	
니들 세척	표준 세척, 10초, 70% 아세토니트릴	
이동상	A) 물 + 0.1% 포름산 B) 아세토니트릴 + 0.1% 포름산	
그레디언트	시간(분)	%B 유속(mL/분)
	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	
총 분석 시간	23분	

이러한 크로마토그래피 조건 하에서 패널에 포함된 거의 모든 이성질체 및 동중질량 BA가 기준 피크 수준에서 분리되었습니다 (그림 1 및 2). 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용하는 오믹스 응용에 대한 애질런트 표준 구성은 표적 대사체학, 지질체학 및 단백질체학 응용을 위한 분석법 간의 간편한 교체를 가능하게 합니다.<sup>4</sup>

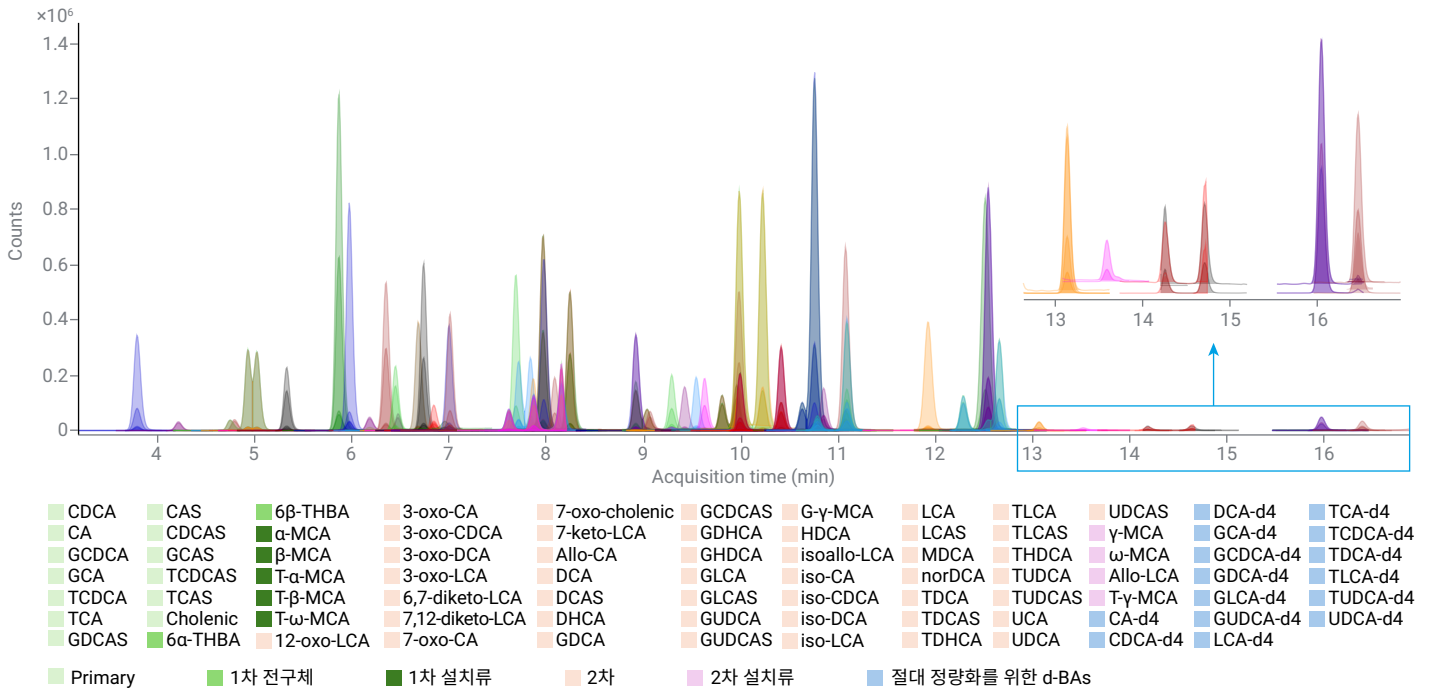


그림 1. C-18 역상 크로마토그래피를 이용한 BA 표준 혼합물의 크로마토그래피 분리.

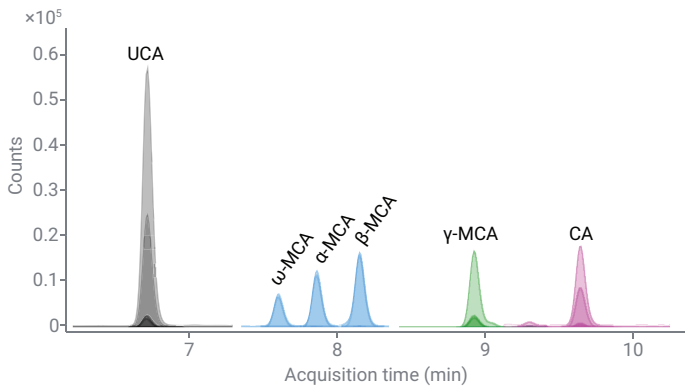


그림 2. 관련 동중질량 BA의 크로마토그래피 분리. 때때로 MRM transition을 공유하는 동중질량 종을 분리하는 데는 머무름 시간이 포함된 표준화된 방법론이 필수적입니다.

### 관련 담즙산의 절대 정량 분석

혈장 및 분변 시료에서 68종 내인성 BA를 측정하기 위한 수집 파라미터 외에도 LC/MS/MS 수집 방법에는 Bile Acid Splash Lipidomix(Avanti Research)의 15종 중수소 표지 담즙산(d-BA)에 해당하는 MRM transition 및 머무름 시간이 포함됩니다. 이는 LC/MS/MS 수집 방법에서 내부 표준으로 지정되며 해당 1차 및 2차 혈장 BA의 절대 정량화에 사용될 수 있습니다.

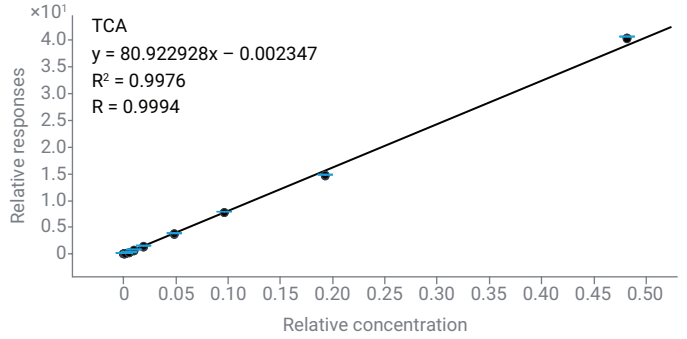
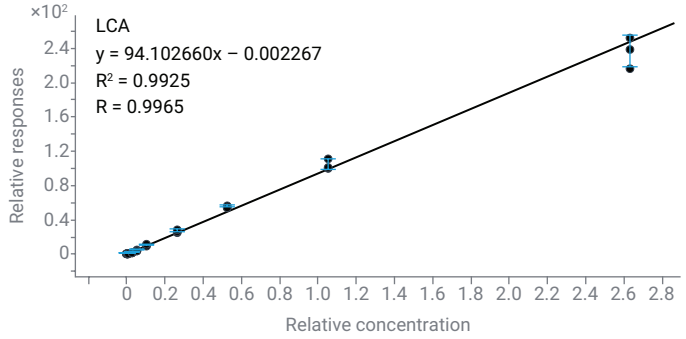
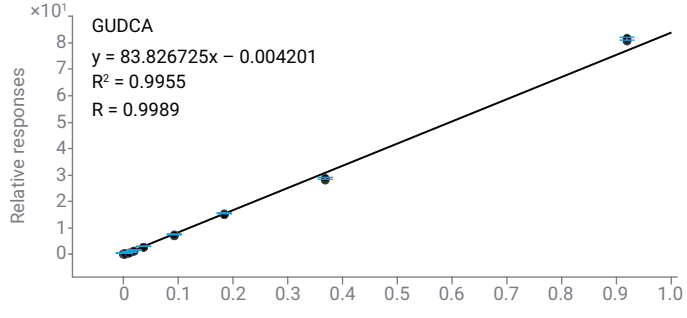
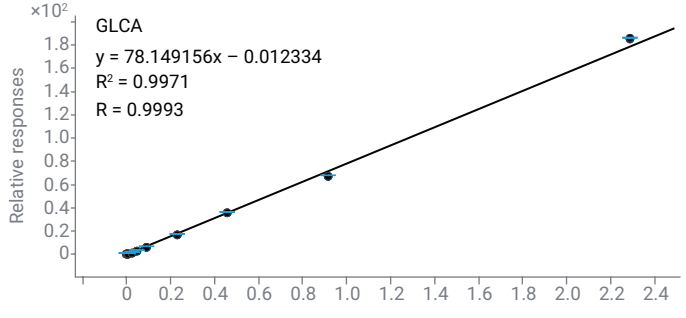
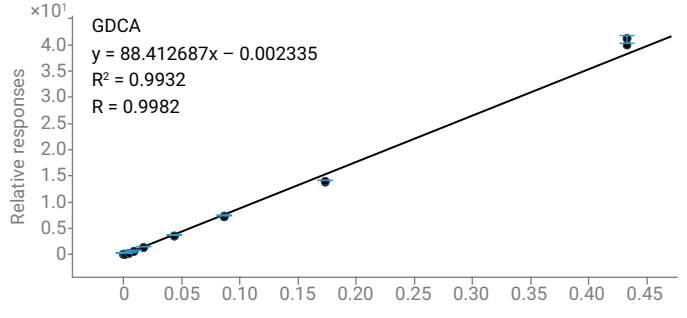
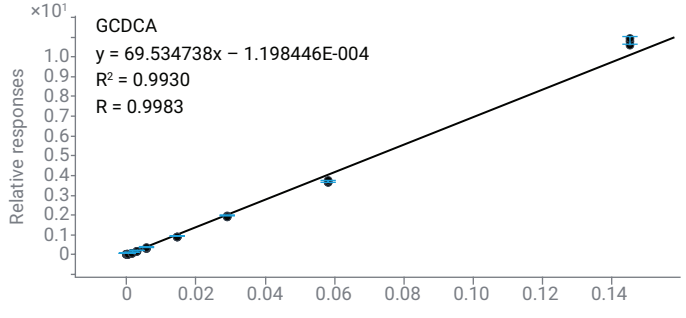
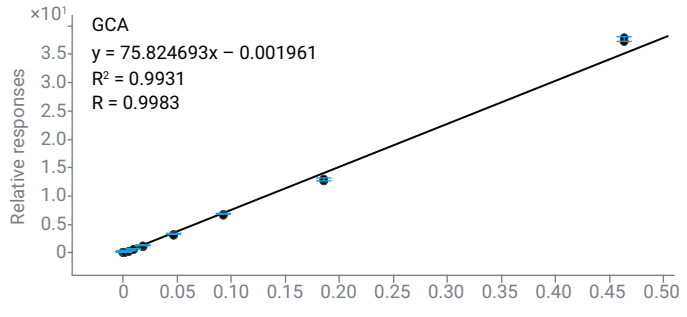
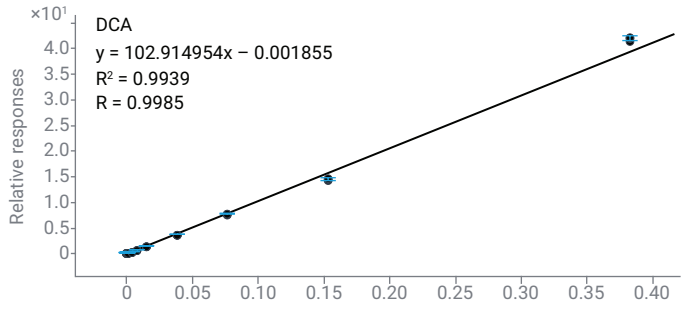
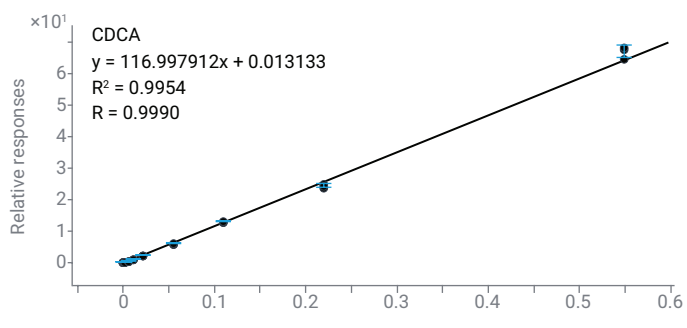
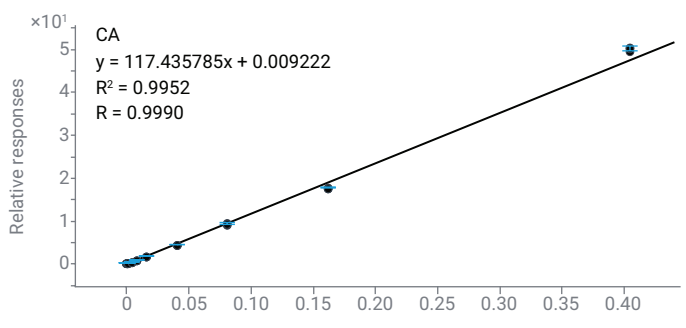
Bile Acid Splash Lipidomix를 아세트니트릴과 0.1% 포름산에 100배 희석하여 혈장 추출 용매를 만들었습니다. d-BA 농도는

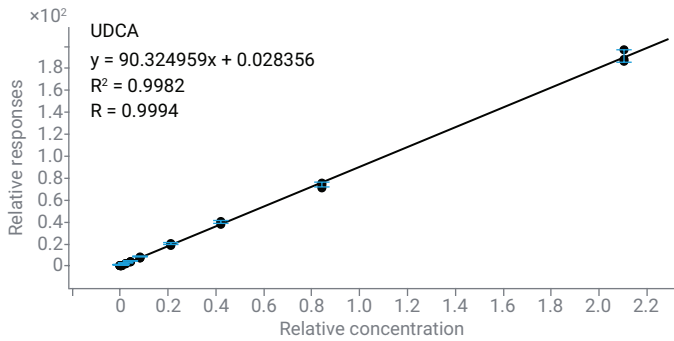
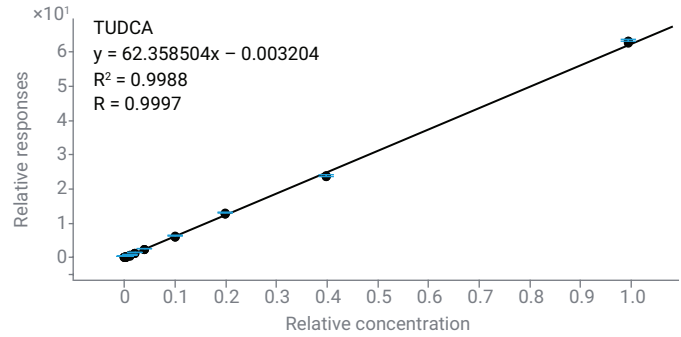
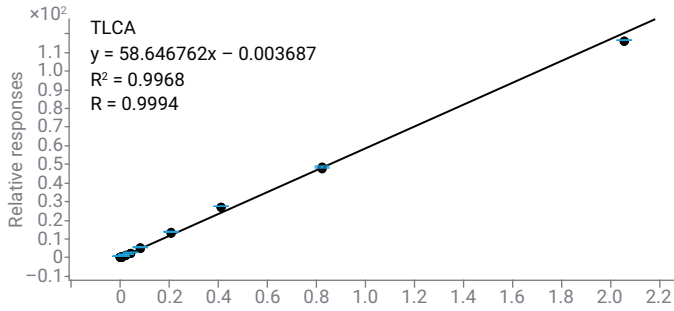
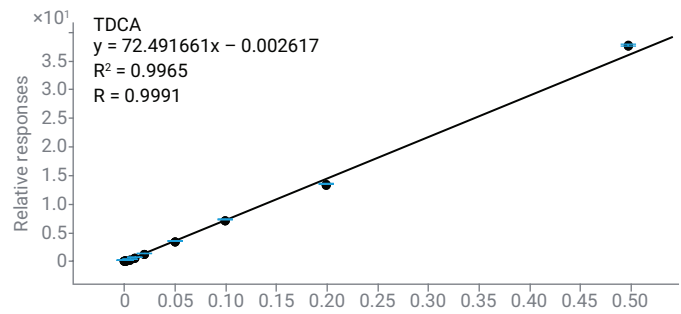
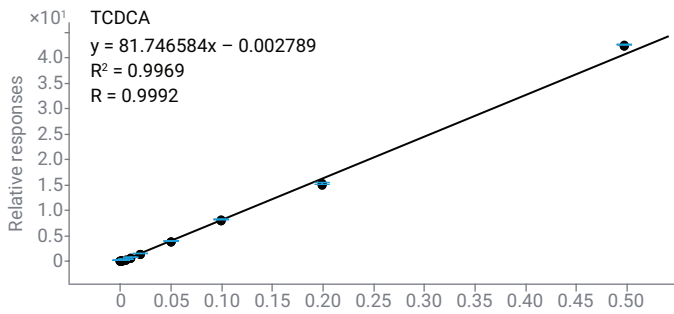
표 4에 나와 있습니다. 정량 분석은 순수한 표준물질로부터 얻은 외부 검량선을 통해 수행했습니다. 12종의 검량 표준물질을 사용하였고, 각 표준물질에 d-BA 혼합물을 첨가하여 혈장 시료와 동일한 농도를 얻었습니다.

검량선 범위는 0.1-2,500ng/mL였습니다.  $R^2 > 0.99$ 인 선형 반응이 확인되었습니다. MassHunter Quantitative Analysis 12.0에서 한눈에 볼 수 있는 검량선을 생성해 주므로 모든 검량선을 빠르게 처리하고 모든 보기와 화합물 하위 집합에 맞게 시각화를 사용자 정의할 수 있습니다(그림 3).

표 4. Avanti d<sub>4</sub>-BA SPLASH 조성.

이름	약어	Avanti SPLASH 표준 혼합물의 농도(nM)	절대 정량화에 사용 여부
Cholic Acid-d <sub>4</sub>	CA-d4	1,150	사용됨
Taurocholic Acid-d <sub>4</sub> , Sodium Salt	TCA-d4	1,000	사용됨
Glycocholic Acid-d <sub>4</sub>	GCA-d4	1,150	사용됨
Deoxycholic Acid-d <sub>4</sub>	DCA-d4	1,650	사용됨
Taurodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub> , Sodium Salt	TDCA-d4	1,000	사용됨
Glycodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub>	GDCA-d4	1,275	사용됨
Chenodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub>	CDCA-d4	1,150	사용됨
Taurochenodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub> , Sodium Salt	TCDC-d4	1,000	사용됨
Glycochenodeoxycholic-d <sub>4</sub> Acid	GCDCA-d4	3,800	사용됨
Tauroursodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub> , Sodium Salt	TUDCA-d4	500	사용됨
Glycoursodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub>	GUDCA-d4	600	사용됨
3β,5α,6β-trihydroxycholanoic Acid-d <sub>4</sub>	THCA-d4	250	사용되지 않음
Lithocholic Acid-d <sub>4</sub>	LCA-d4	250	사용됨
Tauroolithocholic Acid-d <sub>4</sub> , Sodium Salt	TLCA-d4	250	사용됨
Glycolithocholic Acid-d <sub>4</sub>	GLCA-d4	250	사용됨
Ursodeoxycholic Acid-d <sub>4</sub>	UDCA-d4	300	사용됨
Cholenic Acid-d <sub>4</sub>	Cholenic-d4	250	사용되지 않음





담즙산(BA)	R <sup>2</sup>	Fit	가중치
CA	0.995	선형	1/x
CDCA	0.995	선형	1/x
DCA	0.994	선형	1/x
GCA	0.993	선형	1/x
GCDCA	0.993	선형	1/x
GDCA	0.993	선형	1/x
GLCA	0.997	선형	1/x
GUDCA	0.995	선형	1/x

담즙산(BA)	R <sup>2</sup>	Fit	가중치
LCA	0.993	선형	1/x
TCA	0.998	선형	1/x
TCDCA	0.997	선형	1/x
TDCA	0.997	선형	1/x
TLCA	0.997	선형	1/x
TUDCA	0.999	선형	1/x
UDCA	0.998	선형	1/x

그림 3. BA의 검량선.

### 분석법의 견고성과 재현성

LC/MS 수집 방법의 성능과 재현성을 평가하기 위해 엄격한 스트레스 테스트를 수행했습니다. 10마리의 수컷과 10마리의 암컷 마우스로부터 동일한 부피(50 $\mu$ L)의 혈장을 혼합하여 풀링된 혈장 시료를 준비했습니다(BioIVT). BA는 이전에 설명한 혈장에서의 최적화된 추출 절차에 따라 Avanti d-BA Splash 혼합물이 첨가된 산성 아세토니트릴을 사용해 분리했습니다. 용매를 제거한 후, 시료를 50% 메탄올로 재용해하고, 완전히 혼합한 다음, 총 96시간(4일) 동안 6495D LC/MS 시스템에 250회 연속 주입했습니다.

이 광범위한 일련의 주입은 장기간의 고처리량 분석 워크플로를 시뮬레이션하는 조건에서 이 분석법의 견고성을 평가하도록 설계되었습니다. 15종의 서로 다른 d-BA에 해당하는 피크 면적을 MassHunter Quantitative Analysis 12.0 소프트웨어로 적분하여 시간에 따른 신호 응답과 머무름 시간 재현성을 평가했습니다. 분석 기간이 길었음에도 불구하고 이 분석법은 우수한 성능을 보였습니다. 250회 주입에 걸친 피크 면적 측정의 평균 변동 계수(%CV)는 5% 이하였으며, 머무름 시간(RT) 재현성에 상대적인 %CV는 0.15%였습니다(그림 4). 이러한 결과는 이 분석법이 장기간 사용해도 일관된 신호 강도와 데이터 품질을 유지할 수 있음을 입증시켜 주었습니다.

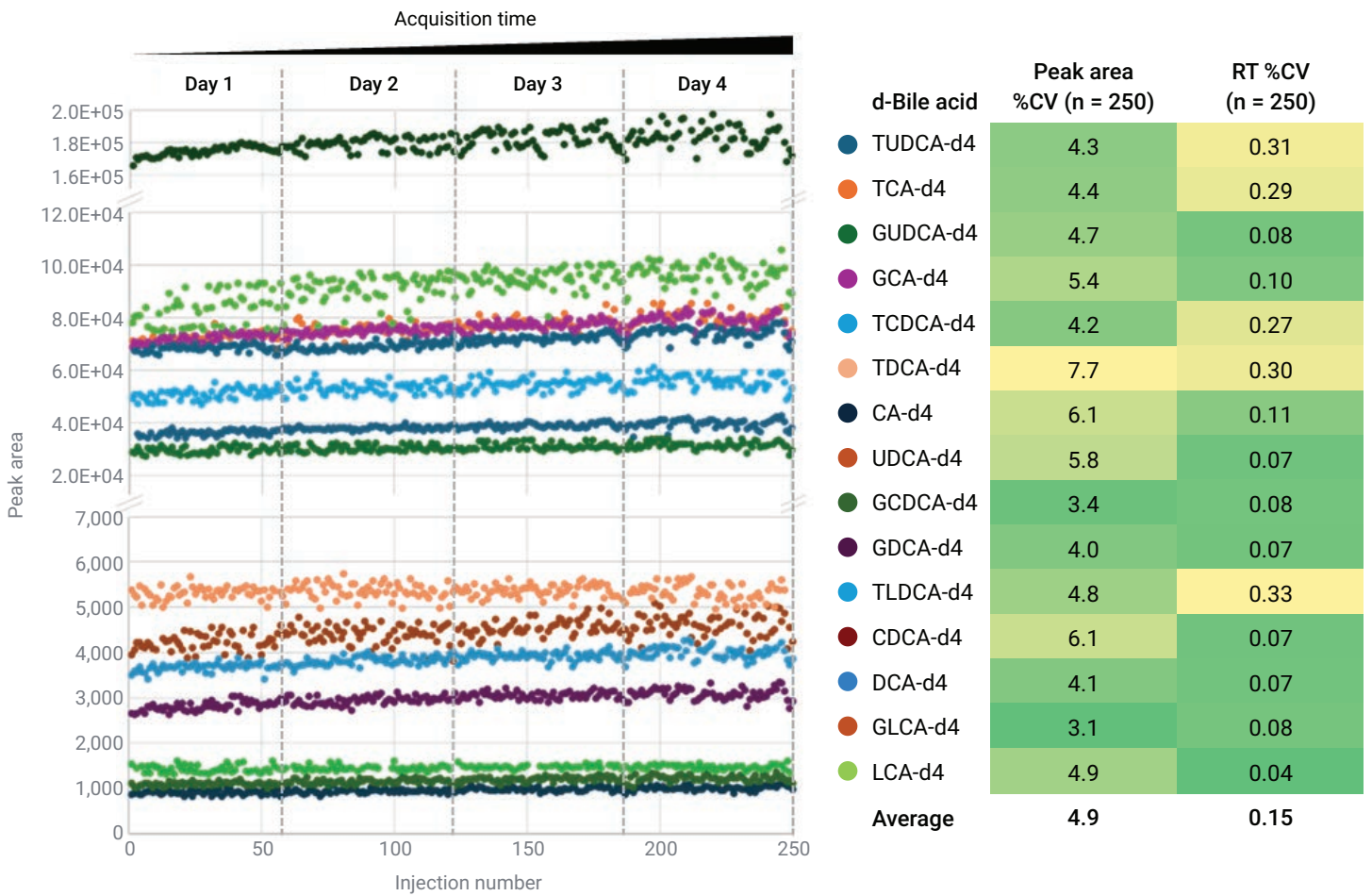


그림 4. 4일간의 데이터 수집 기간 동안 풀링된 혈장 시료를 250회 연속 주입한 후의 분석법 재현성.

## 시료 분석

LC/MS/MS 분석법이 생물학적 매트릭스에 적용 가능한지 평가하기 위해 일련의 대표적인 혈장과 분변 시료에서 BA 양을 측정했습니다. BA는 10마리의 수컷 및 10마리의 암컷 마우스와 쥐(BioIVT 제공)로부터 각각 100 $\mu$ L의 혈장에서 추출되었습니다. 추출된 마우스와 쥐의 혈장을 혼합하여 준비한 풀링된 QC 시료는 시료 분석 전에 컬럼을 매트릭스에 맞게 조절하고 데이터 수집 전반에 걸쳐 기기 반응을 모니터링하기 위해 주입되었습니다. 모든 설치류 혈장 시료를 종별 블록으로 나누어 각 블록 내에 무작위 순서로 주입했습니다. 이러한 접근 방식은 기기 반응 변동의 균일한 분포를 보장하여 시료 그룹 간의 비교를 더욱 정확하게 할 수 있게 해줍니다.

LC/MS/MS 분석 후, raw 데이터는 MassHunter Quantitative Analysis 12.0 소프트웨어를 사용하여 처리했습니다. BA 신호 존재비(피크 면적)를 사용하여 MassHunter 정량 보고서를 생성하였고, 이를 통해 후속 화학계량 분석을 위해 데이터를 MPP로 가져왔습니다. 또는 적분된 피크 면적을 MassHunter Quantitative Analysis 12.0 소프트웨어에서 Microsoft Excel 표로 내보내고, 일반 가져오기 옵션을 통해 MPP에 로드할 수 있습니다. 이러한 유연성 덕분에 Skyline과 같은 외부 소프트웨어를 사용하여 raw LC/MS/MS 데이터 세트를 처리하는 경우에도 통계 분석에 MPP를 사용할 수 있습니다.

건강한 사람과 다양한 기저 질환이 있는 사람의 기증자 집단에서 채취한 분변 시료에서 추출한 BA 추출물(1 $\mu$ L)을 MPP를 사용하여 분석, 처리 및 평가했습니다(Medix Biochemica). 1차 BA 외에도 많은 관련 2차 BA가 혈장과 분변 시료에서 검출되었습니다.

시료 그룹 간 차이점을 평가하기 위해 MPP에서 데이터 세트의 다변량 분석을 실시했습니다. 계층적 군집 분석(HCA)과 주성분 분석(PCA)을 통해 혈장 시료에서 서로 다른 BA 조성이 확인되었습니다. PCA는 설치류의 생물학적 반복 실험에서 적절한 시료 그룹화를 입증했으며, 주성분 1을 따라 동물 종에 따른 뚜렷한 분리(PC1, 49%)와 주성분 2를 따라 성별에 따른 보다 완만한 분리(PC2, 9%)를 보였습니다(그림 5A). 이와 대조적으로, 분변 시료 그룹 간에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았습니다(데이터는 제공되지 않음).

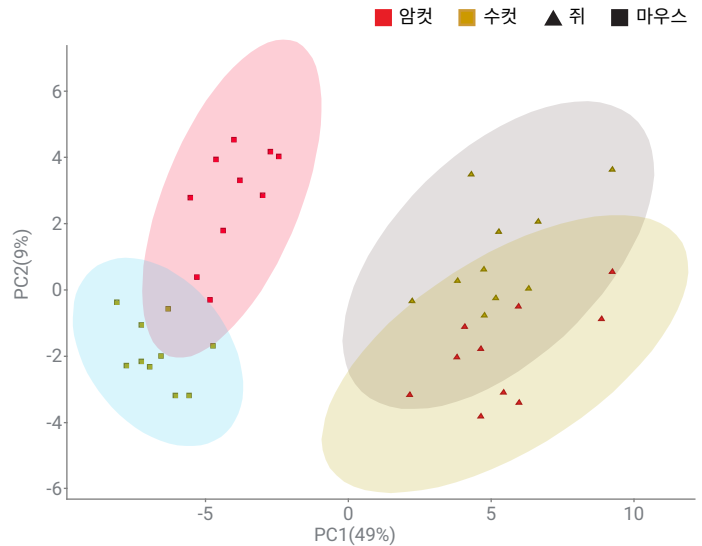


그림 5A. 주성분 분석(PCA) 결과, 표본 그룹 간 BA 분포에 차이가 있는 것으로 나타났습니다.

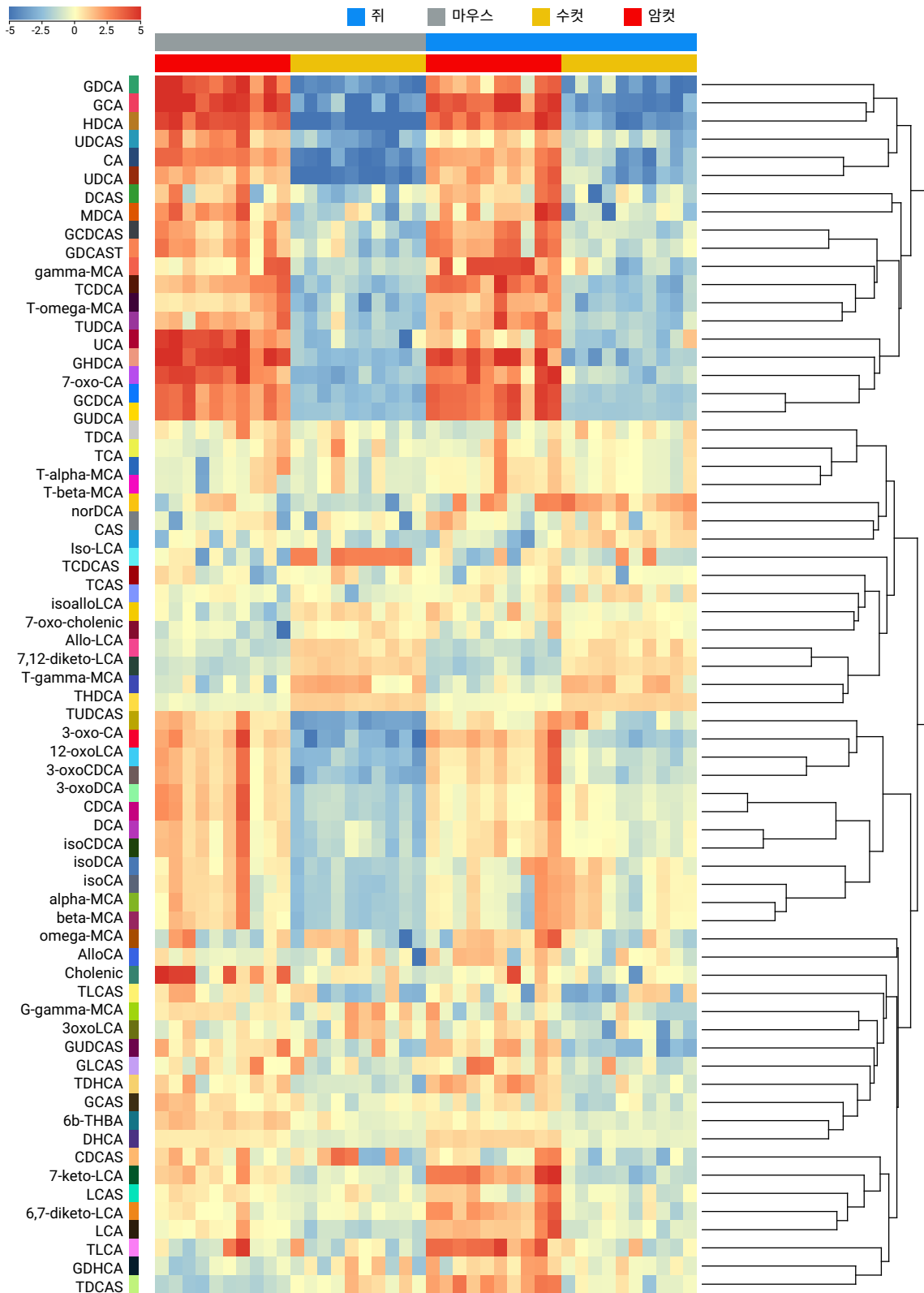


그림 5B. 계층적 군집 분석은 시료 그룹 간 BA 분포에 차이가 있음을 보여주었습니다.

## 결론

BA 분석을 위한 견고하고 표준화된 표적형 동적 MRM LC/MS/MS 분석법이 Agilent 6495D QQQ/LC 플랫폼에서 개발되었습니다. 혈장 및 분변 시료에서 BA를 추출하는 최적의 조건을 LC/MS 조건과 함께 확립했으며, 이를 통해 단일 크로마토그래피 실행으로 많은 BA 패널을 측정할 수 있었습니다. 이 분석법은 활용성이 매우 넓고 혈장/혈청 및 분변 시료 모두에 적용 가능하며, 전신 및 장 특정 담즙산 특성에 대한 귀중한 통찰력을 제공합니다. 이는 혈장에서 순환 BA를 평가하는 신뢰할 수 있는 수단을 제공하는데, 이는 간 기능, 대사 건강, 질병 상태를 나타내는 주요 지표입니다. 분변 시료에서 이 분석법을 사용하면 장내 미생물 상호작용과 장 건강에 관여하는 BA의 특성을 상세히 평가하여 소화와 장간 순환 역학에 대한 정보를 얻을 수 있습니다.

## 참고 자료

1. Sartain, M.; *et al.* A Refined LC/MS/MS Method Targeting Bile Acids from the Gut Microbiome, *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-4956EN, **2023**.
2. Van de Bittner, G. C.; *et al.* An Automated Dual Metabolite + Lipid Sample Preparation Workflow for Mammalian Cell Samples, *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5994 5065EN, **2022**.
3. Sartain, M.; *et al.* Enabling Automated, Low-Volume Plasma Metabolite Extraction with the Agilent Bravo Platform, *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-2156EN, **2020**.
4. 표준화된 LC/TQ 플랫폼을 사용한 표적 오믹스를 위한 고도로 선별된 워크플로, *Agilent Technologies 홍보물*, 발행 번호 5994-7447KO, **2024**.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

RA250421.245

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025  
2025년 7월 8일, 한국에서 인쇄  
5994-8263KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
DF타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)