

ステロイドのトレースキャラクタリゼーションを指向したLC-ESI-MS用誘導体化法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26898

氏名	西尾 忠
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙321号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	ステロイドのトレースキャラクタリゼーションを指向したLC-ESI-MS用誘導体化法の開発(Trace Characterization of Steroids Oriented Development of Derivatization Procedure for LC-ESI-MS)
論文審査委員(主査)	東 達也(自然科学研究科・准教授)
論文審査委員(副査)	島田 和武(自然科学研究科・教授), 早川 和一(自然科学研究科・教授), 中垣 良一(自然科学研究科・教授), 藤井 洋一(北陸大学・教授)

Summary

The following two subjects concerning steroid analyses using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) have been done.

The first one is the development of the ESI-active derivatization (charged derivatization) reagents, 1-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-4-methylpiperazine (PPZ), and 4-(4-methyl-1-piperazyl)-3-nitrobenzoyl azide (APZ), for hydroxysteroids. PPZ selectively reacted with a phenolic hydroxy group in estrogens. After quaternarization of PPZ-estrogens with methyl iodide, the resulting derivatives provided more than 2000-fold higher sensitivity compared to the intact estrogens. After derivatization of steroids having an alcoholic hydroxy group (5-ene or 5-reduced steroids) with APZ followed by methylation, their detection responses increased more than 500 times. These derivatization procedures coupled with LC-ESI-MS/MS were successfully used for the determination of estrogens in the pregnant serum and prostatic 5 α -dihydrotestosterone, respectively.

The second one is alternative procedure to enhance the detection responses of steroids that charged derivatization is not suitable for. 2-Hydrazinopyridine or isonicotinoyl azide was very effective for the sensitive detection of dioxosteroid or dihydroxysteroid, respectively, and the detection limits of the resulting derivatives were as low as 2 fmol.

はじめに

ステロイドは生命機能維持に必要な不可欠な生体分子であり、その消長を的確に把握することは臨床診断や生命科学研究上極めて重要である。

ステロイドの定量法には種々のものが知られているが、プロフィール分析可能なクロマトグラフ法、特にHPLCはGCでは不可能な抱合体などの高極性化合物を水解することなく直接定量できることからステロイド定量法選択のファーストチョイスと考えられる。またGC-MS, LC-MSに代表されるハイファネイテッドテクニックは、クロマトグラフ法の高分離能とMSの豊富な情報量、高感度性を併せ有する信頼性に優れる分析法である。GC-MSがすでに完成されたものであるのに対し、LC-MSも実用化の段階から完成のそれに入り、特に大気圧化学イオン化法 (APCI) やエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) などの優れたイオン化法の開発は、本法を現在最も信頼できる超高感度分析法にまで成長させた。LC-MSの特長は適用範囲の広さと高感度分析が可能な点にあるが、採取量に制限のあるヒト体液(血液、唾液など)及び各種組織などの複雑なマトリックス中に超微量 (ng-fg/mL又はng-fg/fg tissueレベル) で存在するステロイドの分析は容易でない場合も多い。一方化学構造上、APCI, ESIのいずれのイオン化法でも十分な感度の得られないステロイドのあることも知られている。この感度面における問題解決の一つの手段としてAPCI又はESI-MSに高感度に応答する分子構造を測定対象に導入させる誘導体化法がある。

先に著者はAPCIの中でも特に電子捕獲APCIの特長に着目し、有用な誘導体化法を開発し

た。しかし本法は適用可能な機種が限定されるなどの欠点を有していた。そこで現在市販されているLC-MS装置に標準装備されているESI-MSに着目し、普遍性の高いLC-ESI-MS用誘導体化試薬の開発を行い、この問題の克服を目指した。

1. LC-positive ESI-MS用charged derivatizationの開発

ESI-MSはグルクロニド、サルフェートといったイオン性官能基を有するステロイドやプロトンが付加した際、電荷の非局在化による安定化効果を受ける3-オキソ-4-エンステロイドに高感度に応答する。これに対しエストロゲン、5-エン及び5位還元型ステロイドはプロトン親和性が低いため、イオン化効率が悪く実用的な感度が得られない場合がある。このような背景から著者はフェノール性水酸基 (エストロゲン) 又はアルコール性水酸基 (5-エン及び5位還元型ステロイド) と容易に反応し、それらの高感度検出を可能とするLC-positive ESI-MS用誘導体化試薬の設計及び合成を行った。そして、エストロゲン用試薬として、ESIに高感度に応答する4級アンモニウム構造へと変換可能なアミノ基と、フェノール性水酸基に対する反応活性基として2,4-ジニトロフルオロベンゼン構造を併せ有するN'-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-N,N-dimethyl-1,2-ethanediamine (PED) 及び1-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-4-methylpiperazine (PPZ) を1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeneから、いずれも安定な結晶として得た (Chart 1)。両試薬はエストロン (E₁) 及びエストラジオール (E₂) と炭酸水素ナトリウム存在下、アセトン中60℃、1 h加熱することで選択的かつ定量的に反応し、さらにヨウ化メチルによる分子内アミノ基の4級化 (charged derivatization) が容易に可能であった。得られた誘導体をLC-ESI-MS (Applied Biosystems API 2000, 流速0.2 mL/min; 以下同じ) に付したところ、これらはいずれも分子イオン[M]⁺を基準ピークイオンとして与え、フラグメントイオンは殆ど生じなかった。また、より高感度化に優れるPPZを用いて得られた誘導体 (E₁-MPPZ, E₂-MPPZ) の検出限界を選択イオン検出 (SIM, S/N=5) で求めたところ、ステロイド量に換算して共に0.15 pgであり、誘導体化前のE₁及びE₂と比較して、それぞれ2300, 4000倍と飛躍的な感度上昇が見られた。次にPPZを用いて胎児胎盤系機能診断上重要な妊婦血清中E₁及びE₂の同時定量を行った。健常妊婦血清 (10又は20 µL) に [²H₅]-E₁ (IS) を添加、除蛋白、固相抽出後、上記誘導体化反応に付した。LC-ESI-MS/MS [YMC-Pack C8 (5 µm, 150×2 mm i.d.), MeCN-MeOH-10 mM HCOONH₄ (4:1:5, v/v/v), 選択反応検出 (SRM): E₁-MPPZ m/z 549.3→502.4, E₂-MPPZ m/z 551.3→504.3及び [²H₅]-E₁-MPPZ m/z 554.3→506.4] で分析したところ、検量線は0.5–25 ng/mLの範囲で良好な直線性を示し、同時再現性も良好であった。この場合、SRMによる選択性の向上と、それに伴うバックグラウンドノイズの低下が高感度分析に有用であった (Fig. 1)。これらを踏まえPPZが市販される予定である。

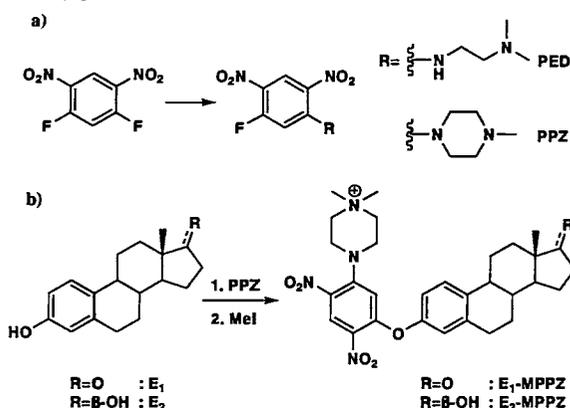


Chart 1. Syntheses of PED and PPZ (a) and Conversion of Estrogens to Their MPPZ-derivatives.

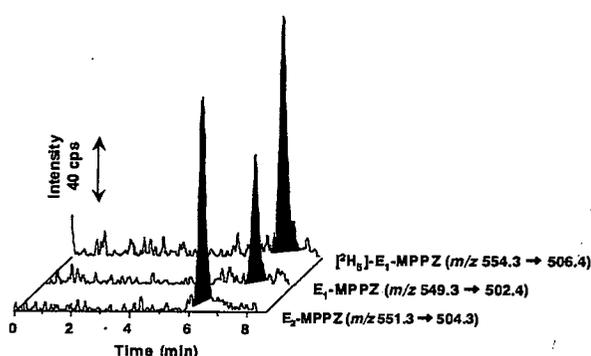


Fig. 1. Chromatograms of Derivatized E₁, E₂ and IS from Sera of Pregnant Woman (21 weeks). Measured concentrations of E₁ and E₂ were 1.84 ng/mL and 3.43 ng/mL, respectively.

一方、5-エン及び5位還元型ステロイドのアルコール性水酸基に対する反応活性基として酸アジド基を有する4-(N,N-dimethylethylenediamino)-3-nitrobenzoyl azide (AED) 及び4-(4-methyl-1-piperazyl)-3-nitrobenzoyl azide (APZ)を4-fluoro-3-nitrobenzoic acidからそれぞれ4工程を経て合成した (Chart 2)。これらはベンゼン中、80℃で加熱するのみで定量的に水酸

基と反応し対応する誘導体を与えた。中でもAPZを用いた場合、本誘導体化とヨウ化メチルによるアミノ基の4級化を施すことで誘導体化前より500倍以上の感度上昇が確認された (SIM)。次にAPZを、前立腺癌との関係が示唆されている5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) の前立腺組織中濃度測定に適用した。組織 (10 mg) に $^2\text{H}_3$ -DHT (IS) を添加、前処理後、上記誘導体化反応に付し、LC-ESI-MS/MS [YMC-Pack Pro C18 RS (5 μm , 150 \times 2 mm i.d.), MeCN-10 mM HCOONH₄ (7:8, v/v), SRM: DHT-MAPZ m/z 567.2 \rightarrow 567.2 及び $^2\text{H}_3$ -DHT-MAPZ m/z 570.2 \rightarrow 570.2] で分析したところ、検量線は1.0–20 ng/g tissueの範囲で良好な直線性を示し、同時再現性も良好であった。

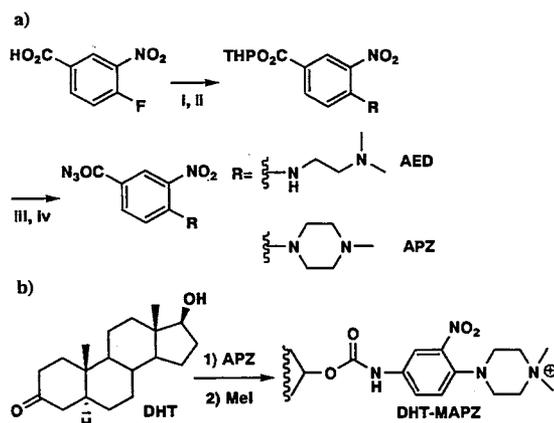


Chart 2. Syntheses of AED and APZ (a) and Conversion of DHT to MAPZ-derivative (b). (i) 3,4-Dihydro-2H-pyran; (ii) *N,N*-Dimethylethylenediamine or *N*-methylpiperazine; (iii) 6 M HCl; (iv) Diphenylphosphoryl azide.

2. Charged derivatization補完法の開発

Charged derivatizationを同一官能基 (オキソ基又は水酸基) を複数有するステロイドに適用した場合、生成する誘導体の気相における安定性の低さから、多数のフラグメントイオンが生じ、飛躍的な感度上昇は期待できない。そこで、これを補完する誘導体化法を開発した。その結果、いずれもピリジル基をESIに応答する原子団として有する他、ヒドラジノ基又は酸アジド基を反応活性基とする2-hydrazinopyridine (HP) 及びisonicotinoyl azide (INA) が各々ジオキソステロイド又はジヒドロキシステロイドの分析に有効なことを明らかとした (Fig. 2)。これらはいずれも既知物質であるが、得られた誘導体は強度の強いプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ を与え、charged derivatizationを適用した場合と比較して最大200倍、誘導体化前と比較して最大600倍感度が上昇した (SIM)。さらに実試料分析への適用例としてINAを用いるラット脳内5 α -アンドロスタン-3 α ,17 β -ジオール (3 α ,5 α -Adiol) の定量を行い、その有用性を明らかとした。ラット脳抽出液 (100 mg tissueに相当) に $^2\text{H}_3$ -3 α ,5 α -Adiol (IS) を添加、2段階の固相抽出による精製後、INAで誘導体化し、LC-ESI-MS/MS [YMC-Pack Pro C18 RS, MeCN-MeOH-10 mM HCOONH₄ (1:2:1, v/v/v), SRM: 3 α ,5 α -Adiol-bisINA m/z 533.3 \rightarrow 139.0及び $^2\text{H}_3$ -3 α ,5 α -Adiol-bisINA m/z 536.3 \rightarrow 139.0] で分析したところ、検量線は0.1–2.0 ng/g tissueの範囲で良好な直線性を示し、精度、正確度共に優れるものであった。3 α ,5 α -Adiolを高用量で動物に投与すると、抗不安作用が発現するとの報告があるが、その作用メカニズムは解明されておらず、本ステロイドの分析法の開発がその生理的意義解明の一助になるものと期待される。

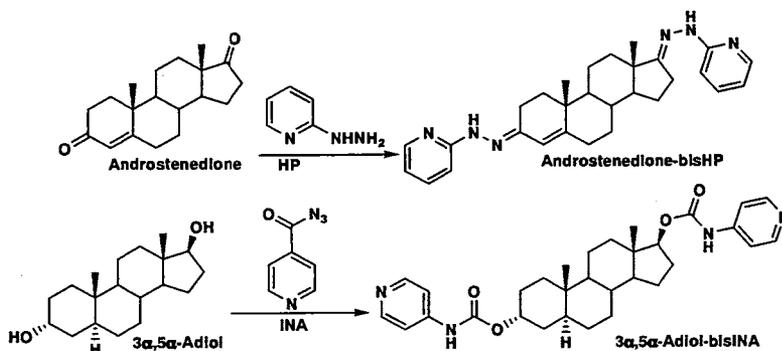


Fig. 2. Derivatization of Dioxo- and Dihydroxy-steroids.

3. Negative ESI-MS用誘導体化試薬の検討

以上はいずれもpositive ESI-MS用誘導体化試薬であるが、よりノイズレベルが低いと予測されるnegative ESI-MS用のそれについても検討した。これまでにnegative ESI-MS用誘導体化法として、測定対象に硫酸基を導入した報告があるが、本法は得られる誘導体が極めて高極性となるため、生体試料分析の際、逆相HPLCにおける内因性夾雑物との分離が問題であった。そこで、適度な脂溶性を有し、かつnegative ESI-MSに高感度に応答する試薬を探索した。この結果、オキソステロイドと反応した際、生成するヒドラゾンのプロトンが二

トロ基の高い電子吸引力でもって脱離されやすいと考えられるニトロフェニルヒドラジン (NPH) 及びその関連化合物に着目し、その性能を評価した。この結果、期待通りいずれの NPH 誘導体も、ESI-MS においてその分子内のヒドラゾンの脱プロトン化により生じた [M-H] を強く与えた。これらの中で、4-NPH 誘導体では誘導体化前のステロイドと比較して 1000 倍の感度上昇が認められ期待されたが、MS/MS の際、SRM に有効なプロダクトイオンが得られず、実試料分析には適用困難であった。しかし、本研究により NPH 誘導体は適度な脂溶性を有するため、逆相カラムにおいて保持され易いこと、ならびに高感度検出に最適なニトロ基の置換位置の予測が可能であることなど 今後の試薬開発において有益な知見が得られた。

以上のように著者は、ESI-MS 用誘導体化による超高感度化とそれに基づく選択性の向上 (SRM) により生体内超微量ステロイドの分析を可能とした。開発した方法はステロイドのみならず、他の生理活性物質の分析へも適用可能であり今後が期待される。

学位論文審査結果の要旨

内因性ステロイドの分析は臨床診断、生命科学研究上極めて重要であり、その方法論として LC-MS が必要不可欠な手段となっているが、汎用されているエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) ではイオン化され難い構造を有するステロイドも少なくない。提出者はこの点の克服を目指して誘導体化を導入し以下のような成果を得た。

エストロゲンを対象としたフェノール性水酸基用試薬として 1-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-4-methylpiperazine (PPZ ; 市販予定) を開発した。本試薬はフェノール性水酸基と容易、かつ選択的に反応し、さらにヨウ化メチルで 4 級化 (charged derivatization) でき、得られた誘導体は誘導体化前の 2000 倍以上の高感度な応答を示した。また水酸基用には 4-(4-methyl-1-piperazyl)-3-nitrobenzoyl azide を開発し、その有用性を実証した。さらに、これらの方法では十分でないステロイド用誘導体化試薬を開発しその有用性を実証した。

以上のように申請者の研究は、LC-ESI-MS の有用性を一段と引き出せるように工夫されたものであり、分析化学の進歩に寄与するものと思われる。論文の審査は副査による事前の面接、公聴会における口頭試問を経て行われ博士 (薬学) に相当するものと判断された。