

総合論文

## 電子捕獲大気圧化学イオン化を利用する生理活性ステロイド の高速液体クロマトグラフィー/質量分析

東 達也<sup>®1</sup>, 島田 和武<sup>1</sup>

### High-performance liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric determination of biologically active steroids

Tatsuya HIGASHI<sup>1</sup> and Kazutake SHIMADA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

(Received 6 January 2004, Accepted 8 March 2004)

Steroids are essential bio-molecules for the maintenance of life. Kinetic and functional analyses of steroids are necessary to elucidate the nature of the many endocrine disease processes, and thus be useful for diagnosis and treatment. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) has recently been used for steroid analysis due to its specificity and versatility. However, conventional LC/MS sometimes does not demonstrate the required sensitivity for the trace analysis of steroids in biological samples, because the ionization efficiencies of most steroids are relatively low for electrospray ionization and usual atmospheric pressure chemical ionization (APCI). On the other hand, electron-affinitive compounds are efficiently ionized by the electron capture reaction in APCI in the negative-ion mode (electron capture APCI). Therefore, in this mode, a high sensitivity can be obtained by tagging steroids with electron-affinitive (electron capturing) moieties. On this basis, we have developed detection-oriented derivatization methods for the LC/electron capture APCI-MS analysis of steroids and applied these methods to the determination of vitamin D<sub>3</sub> metabolites in human plasma and to the analysis of changes in rat brain neurosteroid levels by acute stress.

**Keywords** : high-performance liquid chromatography/mass spectrometry; electron capture atmospheric pressure chemical ionization; detection-oriented derivatization; vitamin D<sub>3</sub> metabolite; neurosteroid.

### 1 緒 言

ステロイドはパーヒドロ-1,2-シクロペンテノフェナントレン (perhydro-1,2-cyclopentenophenanthrene) を基本骨格とする生体分子であり, 17 位側鎖の種類や核間メチル基の有無などの化学構造からエストラン (estrane, C<sub>18</sub>), アンドロスタン (androstane, C<sub>19</sub>), プレゲナン (pregnane, C<sub>21</sub>), コラン (cholane, C<sub>24</sub>) 及びコレスタン

(cholestane, C<sub>27</sub>) などに分類される。しかし, 女性ホルモン (エストロゲン), 男性ホルモン (アンドロゲン), 糖質コルチコイド, 鉱質コルチコイドや胆汁酸など多岐にわたる作用別に分類されることもあり, これらのほか, 強心性ステロイドなども知られている。

いわゆるクラシカルなステロイドホルモン (女性ホルモンや男性ホルモンなど) は, pM から nM レベルの極微量脂溶性シグナル分子 (リガンド) として核内の特異受容体を介して標的遺伝子群の発現を制御し, その作用を発揮する。ビタミン D もステロイド骨格の B 環が開裂したセコ

<sup>1</sup> 金沢大学大学院自然科学研究科薬学系: 920-1192 石川県金沢市角間町

ステロイドであり、活性型代謝物は核内受容体を經由してカルシウムの恒常性維持に働くホルモンの一種である。また最近、胆汁酸<sup>1)</sup>やオキシステロール<sup>2)</sup>までもが、オーファン受容体のリガンドとして脂質や生体異物の代謝にかかわることが明らかとされた。一方で、プレグネノロン (PREG) に代表されるオキシステロイドが中枢組織において、膜受容体と相互作用して記憶や学習に関与することが明らかにされ、神経ステロイドとして注目されている<sup>3)</sup>。このようにステロイドは生命機能維持に重要な役割を果たしており、その生体内レベルは各種疾患と強く関係している。このため、超微量の生理活性ステロイドの動態及び機能の解明は、生命科学における重要課題の一つであり、臨床診断、病態解析そして最終的には新薬開発とも強く関係している。

現在はん用されているステロイド分析法を大別すると、イムノアッセイに代表される結合タンパクを用いる方法と、ガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に代表されるクロマトグラフィーとなる。結合タンパクを用いる方法は高感度で検体処理能力に優れるが、結合タンパクの調製が容易でない上にプロファイル分析に適さない欠点や共存物質との交差反応の問題などを有する。一方、クロマトグラフィーでは、GCは豊富な構造情報を提供し高感度な応答を示す質量分析 (MS) と組み合わせられ (GC/MS)、特に遊離型ステロイドの研究に大きな役割を果たしてきた。また、HPLCはGCでは不可能な高極性、不揮発性化合物にも適用可能なことから、ステロイド分析上のファーストチョイスとされている。しかし、測定対象が多岐にわたるようになり、より微量化、複雑化する中でステロイド分析の主力はこれらの方法から大気圧イオン化 (atmospheric pressure ionization, API) を用いた LC/MS へと移行しつつある。すなわち、LC/MSはGC/MSより適用範囲が広いことに加え、HPLCよりも得られる情報量が圧倒的に多いことから、他の様々な生体分子や薬物の測定と同様、ステロイド分析においても強力な手法に発展してきた<sup>4)5)</sup>。

しかし、LC/MSも決して万能ではなく、実際にはステロイド分析への適用は限られたものとなっている。ステロイドの LC/MS 分析における最大の問題は感度不足である。すなわち、ステロイドのエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) や大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) に対するイオン化効率が必ずしも高くなく、複雑な生体試料中の微量のステロイド分析には実用的な感度が得られない場合も多い。タンデム質量分析計 (MS/MS) を検出部とする LC/MS/MS を用いて選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) を行うとバックグラウンドノイズが低減し、この問題が解決できる場合もある。しか

し、多くの場合それ以上の感度上昇が要求され、ステロイドの絶対的なイオン化効率を向上させる必要に迫られる。この問題の解決には、大気圧光イオン化 (atmospheric pressure photoionization) の導入<sup>6)</sup>やコーディネーションイオンスプレーの工夫<sup>7)</sup>もなされているが、いずれも十分ではない。これに対して著者らは測定対象を各種イオン化に適し、効率的にイオン化される化学構造への変換、いわゆる検出指向誘導体化の導入を企てた。中でもバックグラウンドノイズの低い負イオンモードで操作可能な電子捕獲 APCI (electron capture APCI, ECAPCI) 用誘導体化は有用と期待される。本稿では、著者らの ECAPCI を利用した生理活性ステロイドの LC/MS 分析法の開発と応用について紹介したい。

## 2 LC/MS におけるステロイドの検出指向誘導体化

ECAPCI-MS 用検出指向誘導体化について述べる前に一般的な LC/MS、すなわち、ESI や APCI におけるそれについて概説する。LC/MS における検出指向誘導体化の目的は、およそ次のようになる。まず、誘導体化により測定対象をイオン化されやすい化学構造に変換すると同時に、分子量を増加させる。後者は妨害物質と対象との分子量を違わせるためでもあるが、一般に LC/MS では高質量領域でのバックグラウンドノイズが低く、高感度化が可能な点でも有利である。また、誘導体化によりフラグメンテーションを抑えて、強度の強い特徴的なイオンを生成できれば、一層の高感度化が達成される。更にクロマトグラム上測定対象と妨害物質の分離が容易になる場合は、より選択的な検出が可能となり、結果としてシグナル/ノイズ (S/N) の向上を図ることができる。

LC/MS 用検出指向誘導体化試薬は、各種イオン化 MS に応答する原子団と測定対象の官能基に対する反応活性基から成る。一般にステロイドは水酸基やオキシ基を有するものが多く、これらの官能基を利用して各種イオン化 MS に適した原子団を導入することができる。ビタミン D 化合物に対しては、その *s*-シス-ジエンも利用可能である。

ESI-MS はイオン性化合物の分析に威力を発揮することから、その検出指向誘導体化のコンセプトは明快で、測定対象にイオン性官能基を導入することになる。例えば、正イオン検出では、4級ピリジニウム塩<sup>8)~10)</sup>や強塩基性を示すアミノ基の導入<sup>11)12)</sup>による高感度化が報告されており、負イオンモードでは硫酸基<sup>13)</sup>やカルボキシル基<sup>14)</sup>の導入が有効とされる。一般に質量分析においては、負イオンモードはバックグラウンドノイズの低さから高感度が得やすいとされるが、ESI-MS のそれでは、キャピラリー先端での正、負のイオン分離が不完全で、安定なテイラーコーンが形成されにくいいため、期待したほどの高感度は得られておらず<sup>15)</sup>、このため、ESI-MS の誘導体化は正イオン検出を

利用するものが多い。なお, ESI-MS ではマトリックス中の共存物質による測定対象のイオン化抑制 (ion suppression) の問題が起こりやすいという欠点を有している<sup>16)</sup>。

もう一つの代表的な API である APCI は, ステロイドのような中性低分子化合物に適している上に, イオン化抑制の問題が少ないという大きな利点を有している。APCI の主なイオン化の機構は反応イオンと測定対象間のプロトンの授受, すなわちイオン-分子反応であるため, 正イオン検出では, プロトン付加が容易に行われる化合物ほど高感度に検出される。このため, 窒素や酸素などのプロトン親和性原子に富む化学構造を測定対象に導入すれば, そのイオン化効率が向上し, 高感度化が達成される<sup>17)</sup>。しかし, APCI は強いイオン性化合物や高極性化合物には適さないため, 測定対象の極性を上げることなく, プロトン親和性原子を導入することが重要である。一方, バックグラウンドノイズの低さを考慮すると, 負イオンモードの使用が高感度化には有利である。しかし, 通常負イオン検出 APCI は適用可能な化合物が極めて少なく, 比較的高感度に測定できるものは, フェノール性水酸基を有する化合物程度であり, 新手法の開発が切望されていた。なお, LC/MS におけるステロイドの検出指向誘導体化の詳細については, 著者らの総説を参照していただきたい<sup>18)19)</sup>。

### 3 ECAPCI-MS について

GC/MS の化学イオン化では, まず試薬ガスと高エネルギー電子が反応し, 試薬ガスカチオンと低エネルギー電子 (low-energy electron, Le) が生成する。試料分子がその構造内に電子親和性原子団を有する場合, 試薬ガスイオンと試料分子間のイオン-分子反応よりも, 試料分子自身による Le の捕獲反応が優先し分子アニオン ( $[M]^-$ ) が生成する。すなわち, 電子親和性原子団を有する化合物は効率的に  $[M]^-$  に変換され, その結果, 負イオンモードにて超高感度に検出される。一方, Horning らは APCI インターフェースにおいても, コロナ放電より生じた高エネルギー電子がシースガスとして用いられる窒素と反応し, 窒素ラジカルカチオンと Le を発生させることを報告している<sup>20)21)</sup>。したがって, この Le を利用すれば, GC/MS における電子捕獲化学イオン化と同様に通常の APCI インターフェースにおいても, 電子親和性原子団を有する化合物の電子捕獲イオン化が可能と考えられる。実際に 2,4,6-トリニトロトルエンでは, 負イオンモードの APCI-MS において,  $[M]^-$  が基準イオンとして検出される<sup>22)</sup>。以上を総合すると, ステロイドは一般に電子親和性原子団を持たないが, 誘導体化により電子親和性原子団を導入し, APCI インターフェースを負イオンモードで操作すれば, バックグラウンドノイズの低さとともに電子捕獲による効率的なイオン化がなされ, LC/MS においても超高感度に検出さ

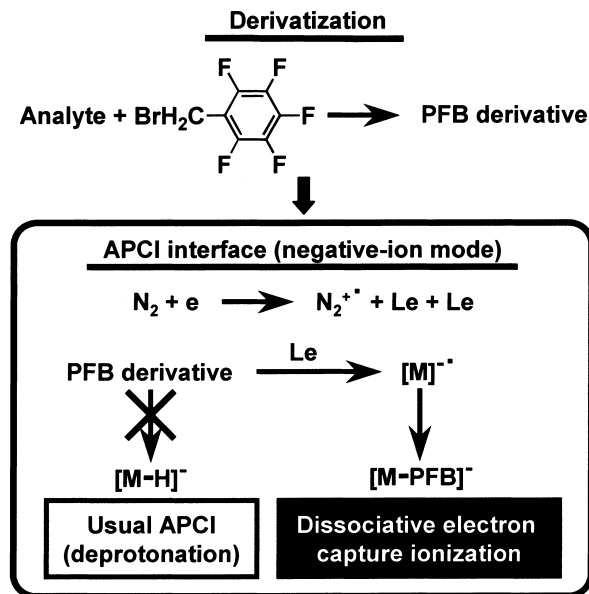


Fig. 1 ECAPCI-MS reported by Singh *et al.*<sup>23)</sup>

れるものと期待される。

LC/MS のイオン化として電子捕獲を本格的に利用したのは Singh らが初めてである<sup>23)</sup>。Singh らは, エストロゲン, プロスタグランジンやアミノ酸など種々の生体分子をペンタフルオロベンジル (PFB) 誘導体とし, 負イオン検出 APCI 条件の LC/MS で分析したところ, いずれの誘導体においても解離性電子捕獲が認められ,  $[M-PFB]^-$  が基準イオンとして観察されることを見いだした。すなわち, 脱プロトン化分子イオン ( $[M-H]^-$ ) が生成するのではなく, 電子捕獲により一時的に  $[M]^-$  ラジカルが生成し, その後 PFB 基が脱離して  $[M-PFB]^-$  が効率的に生成することを見だし, 本手法を ECAPCI と命名した (Fig. 1)。また, 本法を利用するとき, 各 PFB 誘導体の検出限界 ( $S/N=6$ ) は amol オーダーであり, 誘導体化前と比較して 25~100 倍の高感度化が可能であった。更に電子捕獲 APCI はプロトンの授受によるイオン化 (通常の APCI) と異なり, 移動相として水などのプロトン供与体あるいは受容体を必要としない。このため, 本法は順相系 LC を用いても高感度に分析でき, 各種異性体の分離にキラルカラムが使用できるという大きな利点を有している。最近, 同じ研究グループは PFB 誘導体化-LC/ECAPCI-MS を用いて, アラキドン酸カスケードにより生成する細胞内の生理活性脂質の網羅的解析法 (lipidomics) を開発した<sup>24)</sup>。プロスタグランジン及びモノヒドロキシエイコサテトラエン酸などの過酸化脂質は, 数多くの異性体が存在するため, キラルカラムを用いた順相系 LC を使用しているが, 立体異性体を含め 14 種類の脂質の一斉分析に成功している。

GC/MS の誘導体化では測定対象の検出器への応答性を

向上させるとともに揮発性を増大させることも重要である。そのため電子捕獲イオン化用の誘導体化においては、様々な電子親和性原子団の中でフッ素原子を多く有するものがはん用される。一方、LC/MSでは測定対象の揮発性についてはあまり考慮する必要がない。このため、著者らはニトロ基の強い電子親和性に着目して、それを有するECAPCI-MS用誘導体化試薬の開発を試みた。なお、著者らの研究とはほぼ時を同じくして、Hayenらはニトロ芳香族化合物のLC/ECAPCI-MSを発表している<sup>25)26)</sup>。彼らの研究は主にECAPCIの機構に関するものであるが、脱プロトン化(通常のAPCI)と電子捕獲は競合反応であることを報告している。例えば、1級アミンのニトロベンゾフラザン誘導体では、 $\alpha$ -プロトンが存在するため、その脱離によるイオン化(通常のAPCI)が優先するのに対し、2級アミンのそれにはそのようなプロトンが存在しないため電子捕獲が起き、 $[M]^-$ が観察される。また、2,4-ジニトロベンゼンは非解離性電子捕獲によりイオン化されるが、2,4-ジニトロフェニルアジドでは、 $N_2$ の脱離を伴う解離性電子捕獲のみが認められることも報告されている。

#### 4 LC/ECAPCI-MSによる生理活性ステロイドの分析

##### 4.1 装置及び試薬

LC/MS分析にはイオントラップ(IT)型LC/MS<sup>n</sup>, ThermoQuest LCQにJasco PU-980クロマトグラフを接続して使用した。カラムはYMC J'sphere ODS H-80(150×4.6 mm i.d.)を流量1 ml min<sup>-1</sup>で用いた。ステロイド標準品はすべて市販されているものを用い、誘導体化試薬及び重水素標識体はすべて当研究室で合成したが、詳細についてはそれぞれの文献を参照していただきたい。また、溶媒類やその他の試薬類は市販特級品を用いた。

##### 4.2 ビタミンD<sub>3</sub>代謝物分析法の開発と応用

**4.2.1 Cookson型ECAPCI-MS用誘導体化試薬の開発と応用** ビタミンDには側鎖構造の異なるD<sub>2</sub>からD<sub>7</sub>までが存在するが、ヒトにおいて主要な役割を果たしているものはビタミンD<sub>3</sub>(D<sub>3</sub>)である。D<sub>3</sub>は肝で25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>[25(OH)D<sub>3</sub>]に代謝されて体内を循環し、その後、血中のカルシウム濃度に応じてじん(腎)でその1 $\alpha$ 位又は24R位に水酸化を受け、1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>{1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 活性型D<sub>3</sub>}あるいは24,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>[24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]に代謝される。血中25(OH)D<sub>3</sub>の測定はビタミンDの供給状態の指標として、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のそれは、ビタミンD代謝異常を伴う各種疾患の鑑別診断上重要である。また24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は新規骨疾患治療薬としてその体内動態の解明が新薬開発上重要な課題となっている。これらD<sub>3</sub>代謝物の血中レベルは著しく低い上(ng~pg ml<sup>-1</sup>オーダー)、各構造は互

いに酷似しており、その分析には極めて高い感度と選択性が要求される。その方法論としてLC/MSが有望視されるが、D<sub>3</sub>代謝物の各種イオン化法に対するイオン化効率が低く、十分な感度が得られない。そこでD<sub>3</sub>代謝物の特徴的構造であるs-シス-ジエンと選択的かつ定量的に反応するCookson型試薬(4置換-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン)を用いた誘導体化による高感度化が試みられている。すなわち、4位置換基として種々のイオン化MSに対して応答しやすい官能基を導入し、感度の向上を図るものである。これまでESIや正イオン検出APCI-MS用の誘導体化法が開発され、検出感度の向上に大きく寄与した例もあり、この点に関しては著者らの総説を参照していただきたい<sup>18)27)</sup>。一方、ECAPCI-MSを利用すれば、バックグラウンドノイズの低さから、更なる高感度化が可能と期待される。そこで、著者らは4-(4-ニトロフェニル)-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン{4-(4-nitrophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione, NPTAD}を用いる25(OH)D<sub>3</sub>のLC/ECAPCI-MS分析法の開発を試みた<sup>28)</sup>。

NPTADは既知法により合成し<sup>29)</sup>、その酢酸エチル溶液を誘導体化に使用したが、室温にて25(OH)D<sub>3</sub>と定量的に反応し、安定なDiels-Alder付加体を与えた(Fig. 2)。本誘導体は、負イオンモードのAPCI-MSにおいて、期待どおり電子捕獲によりイオン化され、 $[M]^-$ を基準イオンとして与えた。検出感度に対する本誘導体化の効果を吟味したところ、誘導体化前と比べて30倍の高感度化が達成され、25(OH)D<sub>3</sub>に換算すると、4 pgが検出可能であった(S/N=3)。また、25-ヒドロキシビタミンD<sub>4</sub>(非内因性ビタミンD)を内標準物質(IS)として検量線を作成したところ、試験管当たり0.05~1 ngの範囲で良好な直線性が得られた。血しょう(20  $\mu$ l)をアセトニトリルによる除タンパク後、得られた上澄みを酢酸エチルに希釈、水洗し、その後溶媒を留去して誘導体化反応に付した。20  $\mu$ lの血しょうを用いるとき本法の定量限界は、3 ng ml<sup>-1</sup>と、ビタミンDの供給状態(健康人レベル: 10~40 ng ml<sup>-1</sup>)の評価に十分な感度を有しており、市販の<sup>125</sup>I-ラジオリオノアッセイキットのそれ(50  $\mu$ lの試料を用いるとき、2.8 ng ml<sup>-1</sup>)をもしのぐものであった。更に本法で得られた定量値は、4{2-(6,7-ジメトキシ-4-メチル-3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリル)エチル}-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン[4{2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl}-1,2,4-triazoline-3,5-dione, DMEQTAD]を用いたLC/正イオン検出APCI-MS<sup>30)</sup>でのそれと高い相関を示し、信頼性の点でも満足し得るものであった。なお、DMEQTADはプロトン親和性原子に富み、これによる誘導体化は正イオン検出LC/APCI-MSにおけるビタミンD化合物の検出感度向上に極めて有用である<sup>31)32)</sup>。

##### 4.2.2 ビシナールジオール基を有する化合物の

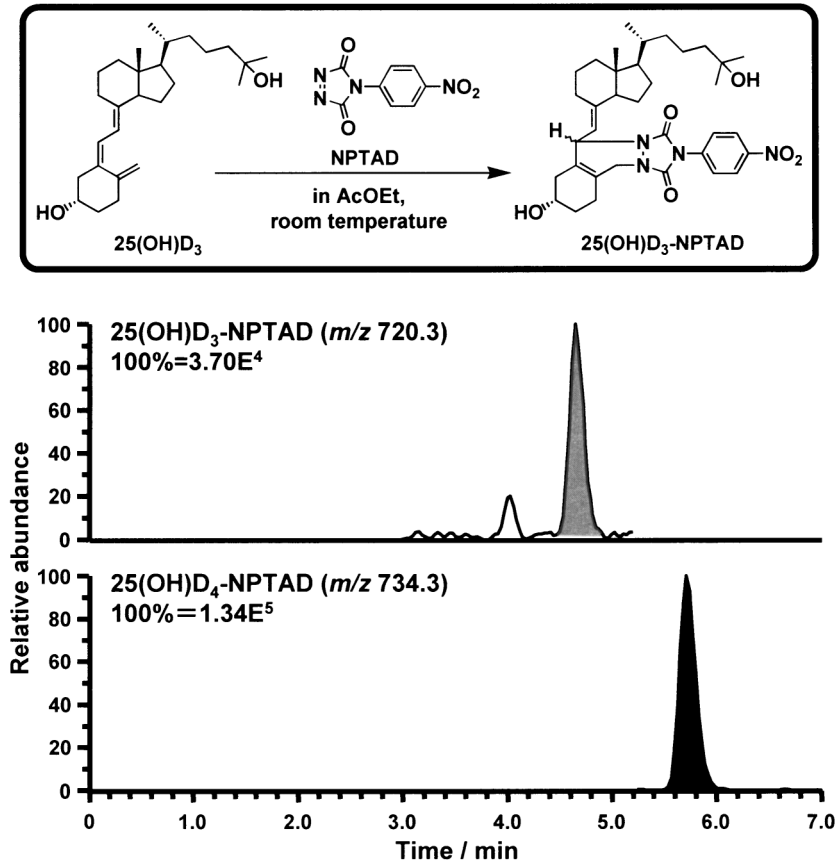


Fig. 2 Determination of 25(OH)D<sub>3</sub> in human plasma as NPTAD derivative using LC/ECAPCI-MS

**ECAPCI-MS 用誘導体化試薬の開発と応用** 上述のように, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> は新規骨疾患治療薬として期待される内因性の D<sub>3</sub> 代謝物の一つであるが, 24, 25 位にビシナルジオール基を有している. そこで著者らはこれと選択的に反応するボロン酸を反応活性基とする ECAPCI-MS 用誘導体化試薬の開発を試みた<sup>33)</sup>.

先の 25(OH)D<sub>3</sub> 分析ではニトロフェニル基を有する試薬を用い, これと ECAPCI-MS の組み合わせが高感度化に極めて有用であったが, ここでは更なる高感度化を目指し, 種々の電子親和性原子団を有するボロン酸誘導体をデザイン, 合成した. すなわち, ニトロ基の数や他の置換基との併用効果を検討し, また PFB 基との比較を行うため, 3-アミノフェニルボロン酸を出発物質に用いて Fig. 3 に示すボロン酸誘導体 (R-APB) を合成した. なお, これら試薬はいずれも固体として得られ, その構造は ESI-MS により確認した.

次に 20 pg の 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> にピリジン中, 5 μg のボロン酸誘導体を加え, 50°C で反応させたところ, 1 時間でほぼ定量的に誘導体が生成した. 溶媒留去後, アセトニトリルに溶解して LC/MS に付したが, 生成したボロネートはいずれも移動相にアセトニトリル系を用いるとき, 加水

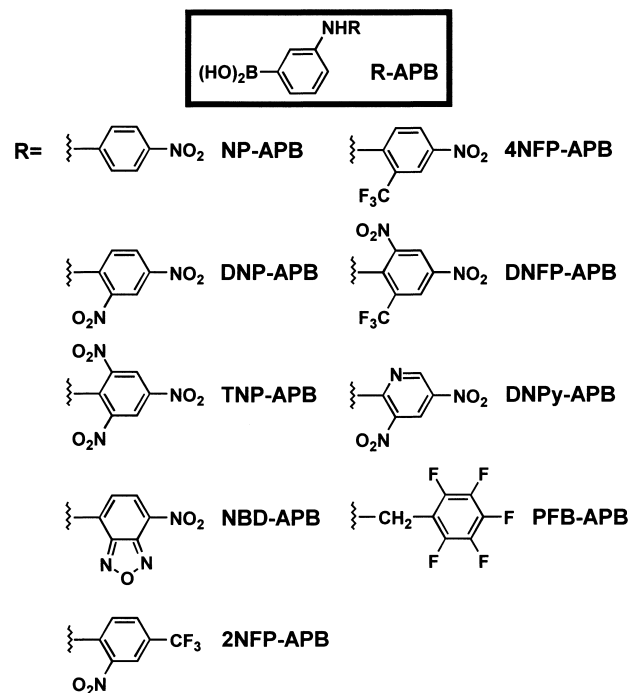


Fig. 3 Structures of boronic acid derivatives with electron affinitive moieties

Table 1 LC/MS conditions and limits of detection (LODs) of 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its boronates

Derivative	Mobile phase ( <i>t<sub>R</sub></i> : min)	Monitoring ion	LOD (S/N = 3)	Increasing sensitivity
Intact	MeOH-H <sub>2</sub> O, 9 : 2 (6.7)	Sum of 417.0 [M+H] <sup>+</sup> , 399.0 [417-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> and 381.0 [417-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	216 fmol (90 pg)	1
NP-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 97 : 3 (6.4)	638.3 [M] <sup>-</sup>	4.8 fmol	45
DNP-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 49 : 1 (6.2)	683.3 [M] <sup>-</sup>	1.7 fmol	129
TNP-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 23 : 2 (6.6)	728.3 [M] <sup>-</sup>	3.6 fmol	60
NBD-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 47 : 3 (6.2)	680.3 [M] <sup>-</sup>	3.8 fmol	56
2NFP-APB	MeCN-MeOH, 93 : 7 (6.9)	706.3 [M] <sup>-</sup>	0.96 fmol	225
4NFP-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 99 : 1 (6.7)	706.3 [M] <sup>-</sup>	6.0 fmol	36
DNFP-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 47 : 3 (6.5)	751.1 [M] <sup>-</sup>	1.9 fmol	112
DNPy-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 24 : 1 (6.1)	684.3 [M] <sup>-</sup>	1.9 fmol	112
PFB-APB	MeCN-H <sub>2</sub> O, 99 : 1 (6.3)	709.1 [M+O <sub>2</sub> -HF] <sup>-</sup>	6.7 fmol	32

分解は認められなかった。次いで各誘導体の負イオンモードにおける APCI-MS スペクトルを測定したところ、PFB 基を有するそれ以外の誘導体は、いずれも [M]<sup>-</sup>のみを与え、非解離性電子捕獲によってイオン化されることが確認された。一方、PFB 基を有する誘導体は *m/z* 709 に基準イオンを与えたが、これは本誘導体にまず、大気中の酸素から生成した [O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>が付加し、その後 HF が脱離した [M+O<sub>2</sub>-HF]<sup>-</sup>と推測された。

検出感度については、各誘導体の保持時間が 6~7 分となる LC 条件下で検討したが、PFB 基を有する誘導体で誘導体化前より 32 倍の高感度が得られた (Table 1)。一方、ニトロ基を含む誘導体はいずれもそれ以上の応答を示し、ECAPCI-MS におけるニトロ基の有用性が改めて示された。特に 2-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェニル (2NFP) 基を有する誘導体は、極めて高感度な応答を示し、0.96 fmol, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> に換算して 0.4 pg が検出可能であり、誘導体化前と比べて 225 倍もの高感度化が達成できた。なお、ニトロ基のみを有する誘導体間では、ジニトロ誘導体がモノニトロ誘導体よりも高感度な応答を示したが、トリニトロ誘導体はジニトロ誘導体よりも検出感度は低く、一概にニトロ基の導入数のみで検出感度が向上するものではないことが明らかとなった。このことは 2NFP 誘導体が 2,4-ジニトロ-6-トリフルオロメチルフェニル基を有する誘導体よりも感度が優れることから明らかである。また、同じ種類の置換基でも 2NFP 誘導体と 4NFP 誘導体で感度が異なり、用いる移動相などが検出感度に影響することが示唆された。

続いて 2NFP-APB をヒト血しょう中 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 測定 (健常人レベル: 0.5~4 ng ml<sup>-1</sup>) に適用した (Fig. 4)。血しょうを除タンパク及び逆相系の固相カートリッジにより精製し、誘導体化反応後、LC/MS に付した。その結果、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 誘導体に対応するピークが明りょうに観察され、重水素標識体を IS に用いることで定量も可能であった。なお、Fig. 4 に認められるように、重水素標識体の

*t<sub>R</sub>* が同位体効果により測定対象のそれと若干異なったが、定量には問題なかった (後述する Fig. 7 及び 8 についても同様である)。本研究では 50 μl の血しょうを用いたが、これはこれまでに開発された 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 分析法中で最少量である。

#### 4.3 神経ステロイド分析法の開発と応用

近年、注目される脳内生理活性物質の一つに神経ステロイドがある。神経ステロイドは、クラシカルなステロイドホルモンとは異なり、中枢組織内で独自に生合成される上、核内受容体のシグナル分子としてではなく、γ-アミノ酪酸 (GABA<sub>A</sub>) 受容体や *N*-メチルアスパラギン酸受容体など膜受容体に作用して神経細胞間の情報伝達効率を制御する。その結果、神経ステロイドは記憶や学習に関与し、第 4 世代の情報伝達物質として注目されている<sup>3)</sup>。また、神経ステロイドは遊離型のほか、サルフェートや脂肪酸エステルなど多様な形態で脳内に存在することが知られている<sup>34)</sup>。これらは生理状態や環境に応じて、直接的に、あるいは代謝、変換されて作用を発揮するものと考えられるが、それぞれの動態や相互関係などは十分には明らかにされていない。

現在、脳内神経ステロイドは主にイムノアッセイにより測定されているが、用いる抗体の特異性が低いことから共存物質の影響を受けやすく、定量値の信頼性は低い。すなわち、アッセイ間や研究者間で定量値が大きく異なり、このことが神経ステロイドの生理的役割や精神疾患との関連性をあいまいなものとしている。このような背景から、脳内神経ステロイド分析においても LC/MS が分析手法として有効と考えられ、その存在が超微量であることや脳が極めて複雑なマトリックスであることも考慮すると、高感度でバックグラウンドノイズの低い ECAPCI-MS が有用と考えられる。

そこでまず、4.2.2 での結果を基に、ECAPCI-MS に応答する構造として 2NFP 基を、ステロイドのオキソ基に対

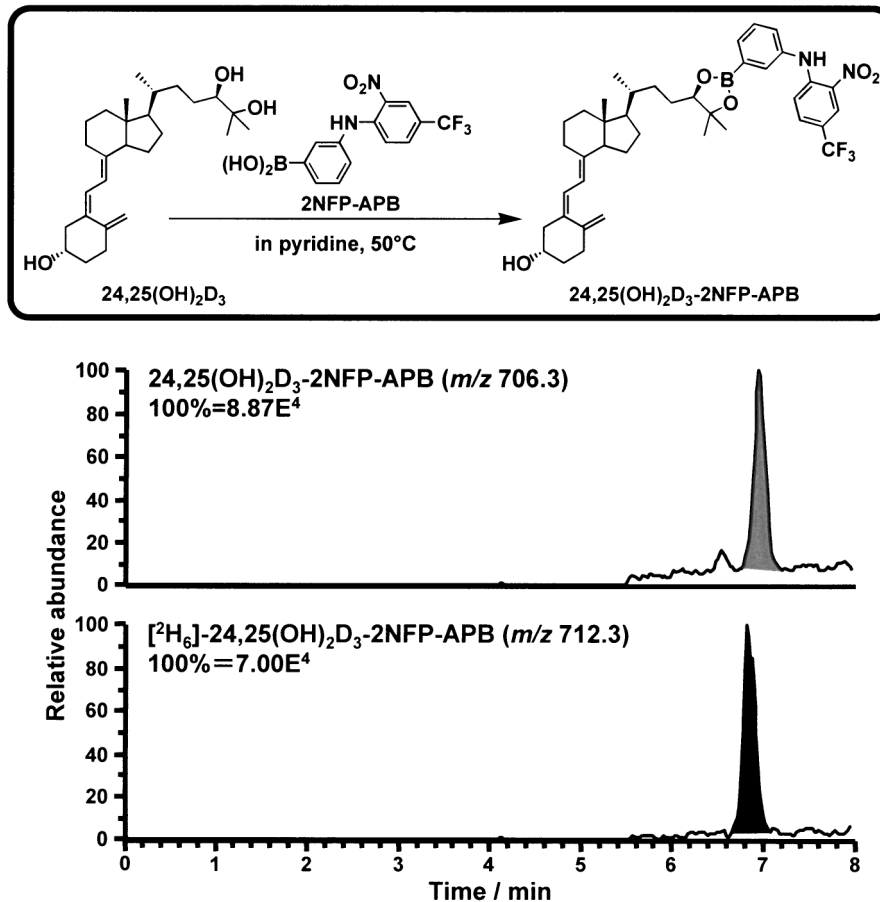


Fig. 4 Determination of 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in human plasma as 2NFP-APB derivative using LC/ECAPCI-MS

する反応活性基としてヒドラジンを選択し、神経ステロイド用誘導体化試薬として 2NFP-ヒドラジン (2NFPH) を開発した (Fig. 5)<sup>33)</sup>. 誘導体化は 2NFPH (5 μg) を 0.5% トリクロロ酢酸を含むアセトニトリル中、加温することなく 1.5 時間超音波処理することにより行った. 本条件下、2NFPH はステロイドの 3 位、17 位及び 20 位のオキシ基に対し、ほぼ定量的に反応した. なお、加温により反応時間は短縮可能であるが、後述する重水素標識体 (IS として使用) で重水素と水素の交換反応が認められた. 続いて代表的な神経ステロイドである PREG 及びプロゲステロン (PROG) を用いて 2NFPH を用いた誘導体化による効果を吟味したところ、いずれの誘導体も負イオンモードの APCI-MS において [M]<sup>-</sup>のみを与え、効率的なイオン化により誘導体化前と比べてそれぞれ検出限界が 20 倍及び 30 倍改善された (PREG 及び PROG に換算してそれぞれ 6 及び 1 pg).

次に本法のラット脳内神経ステロイド分析への適応性を検討した. 脳組織のホモジネートを遠心分離し、必要量の上澄みを逆相、順相の 2 段階の固相カートリッジで精製し、誘導体化反応に付した. まず、比較的脳内存在量が多

いとされる PREG を例に精査したが、Fig. 6 に示すように、誘導体化を行わずに通常の LC/正イオン検出 APCI-MS で分析すると、非常にノイズの多いクロマトグラムしか得られないのに対し、2NFPH を用いた LC/ECAPCI-MS ではノイズはほとんど認められなかった. また、試料量に関しても本誘導体化を導入することで 5 分の 1 に減少させることが可能で、開発した方法が期待どおりイオン化効率の向上とバックグラウンドノイズの低減の両面から高感度化に大きな効果があることが明らかとなった.

ところで、強いストレスは記憶障害を引き起こし、また、うつ病に代表される精神疾患の原因ともなる. 従来からこれは、ストレスにより副腎での糖質コルチコイド合成が活性化され、それが血液脳関門を通過して脳に到達し、糖質コルチコイド受容体を介して作用する結果と考えられている. しかし、最近では、脳内で生合成される神経ステロイドがこれらの障害及び疾患に関与することが示唆されている. そこで開発した方法による拘束ストレスによるラット脳内 PREG 及び PROG レベルの変動解析を試みた<sup>35)36)</sup>.

まず、PREG 及び PROG の重水素標識体をアルカリ条件下での交換反応により合成し、それぞれを IS として

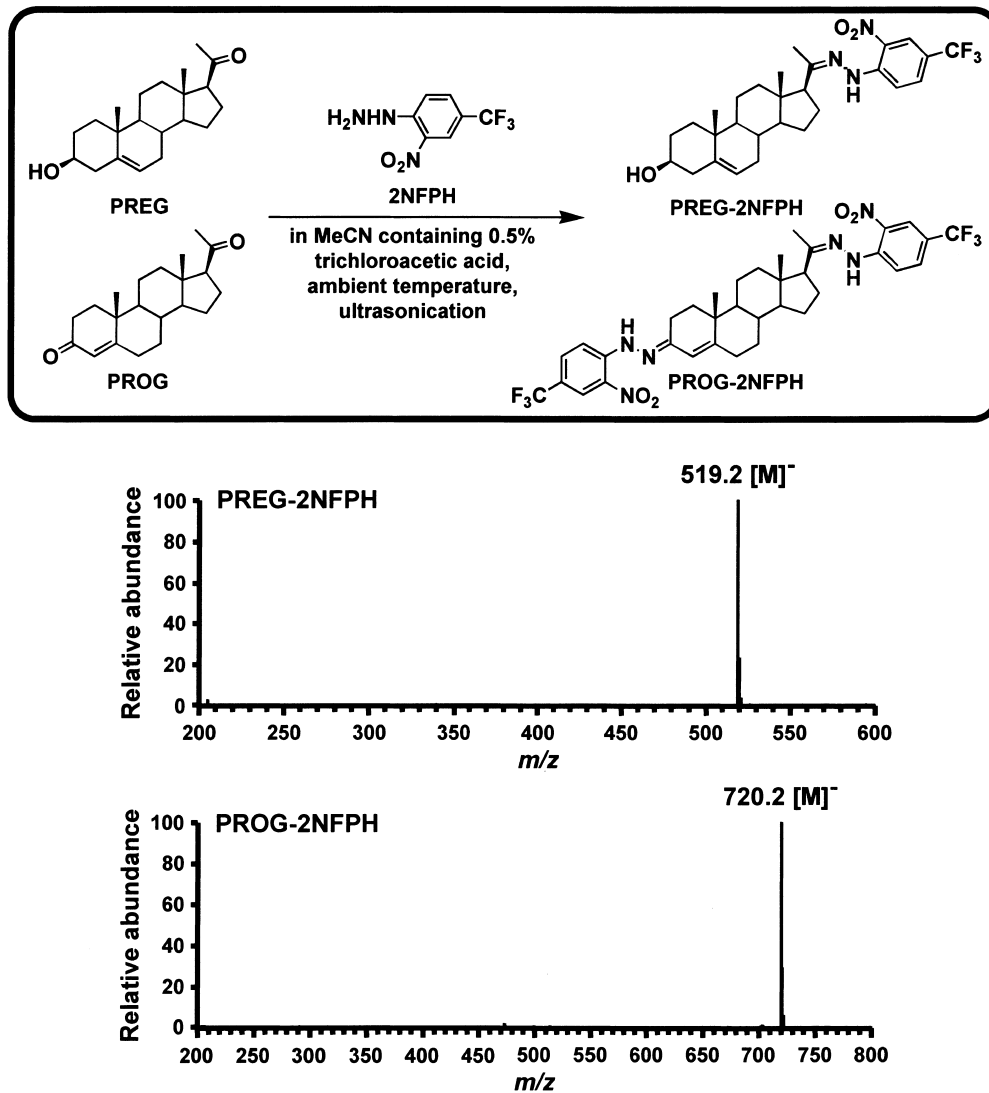


Fig. 5 ECAPCI-MS spectra of 2NFPH derivatives of PREG and PROG

PREG 及び PROG に対して検量線を作成した { $x$ : 試験管当たりのステロイド量 (pg),  $y$ : 面積比 (ステロイド/IS)}. PROG の場合は, 試験管当たり 50 から 500 pg の範囲で良好な直線性 ( $y = 0.00442x - 0.113$ ,  $r^2 = 0.999$ ,  $n = 3$ ) が得られたが, PREG の場合には曲線 ( $y = 0.0000176x^2 - 0.000774x + 0.0300$ ,  $r^2 = 0.999$ ,  $n = 7$ ) を与えた. この原因として, IT 型質量分離装置特有の PREG と IS の相互に対するイオン化抑制が考えられるが, 十分には解明されていない. この結果, PREG 分析では検量線が直線の場合と比べて定量値の変動が大きくなり, 脳内レベルのわずかな差を把握することは困難となった. しかし, 各ポイントにおける  $y$  値の変動係数は 10% 以下と再現性は十分であったことから, 脳内レベルが大きく変動する場合の解析には十分適用可能と判断し, 以下の実験に用いた.

ラットはコントロール群とストレス負荷群に分け, 共に

約 2 時間静かな場所で自由にさせた後, 前者では直ちに脳を採取した. 一方, ストレス負荷ラットはその後, 20 分間固定板に背部を下にして固定し, その 30 分後に脳を採取した. 脳は上述の前処理操作により精製し, 誘導体化後, LC/MS で分析した.

まず, PREG レベルの変動を観察した (Fig. 7). コントロール及びストレス負荷ラット共に PREG 誘導体に対応するピークが観察されたが, ストレスによりその脳内レベルが大きく変動した (Table 2). すなわち, コントロールラットの脳内レベルが  $5 \sim 10 \text{ ng g}^{-1} \text{ tissue}$  であるのに対し, ストレス負荷ラットでは  $40 \sim 70 \text{ ng g}^{-1} \text{ tissue}$  と大きな増加が観察された. 上述のように, 神経ステロイドは遊離型のほか, 種々の抱合体として存在することが知られている<sup>34</sup>. 先に著者らは, ラット脳内に PREG の脂肪酸エステル, 例えばステアレートなどが高濃度で存在し, ストレスによりそのレベルが大きく減少することを見いだしてい



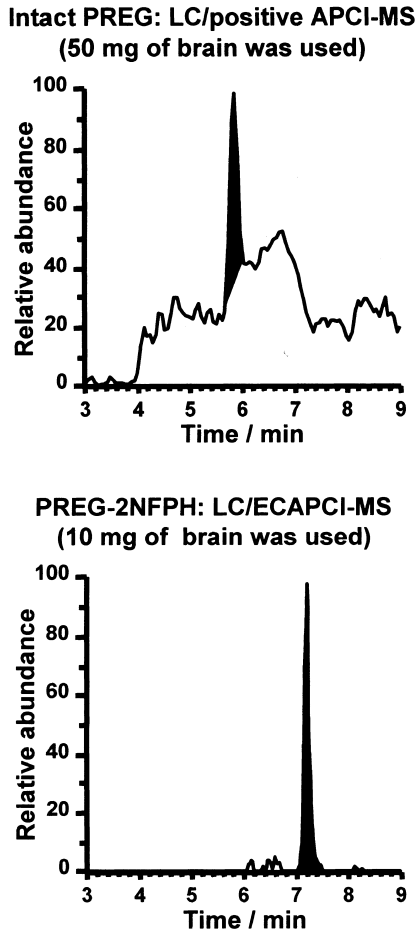


Fig. 6 Effect of 2NFPH-derivatization and ECAPCI-MS in brain sample analysis

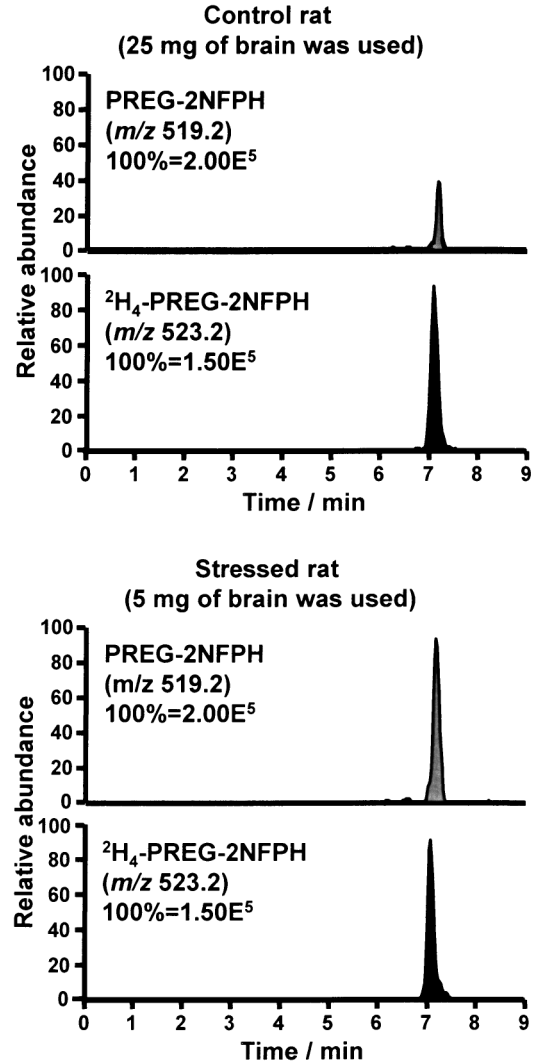


Fig. 7 Determination of PREG in rat brains as 2NFPH derivative

る<sup>37)</sup>。一方、サルフェート (PREGS) も脳内に遊離型と同等のレベルで存在することが報告されているが、脱抱合を伴う間接的方法によるものや、特異性の低い抗体を用いた実験結果である<sup>38)39)</sup>。著者らは脱抱合操作を含まない LC/ESI-MS<sup>40)</sup> や特異抗体を用いる ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)<sup>41)42)</sup> を開発し、検討した結果、PREGS はラット脳内に極めてわずかしかな存在しないことを明らかにしている。更にごく最近、他の研究グループも LC/ESI-MS を用いてラット脳内 PREGS の直接的分析法を開発し、著者らの結果を支持する報告をしている<sup>43)</sup>。また、磷脂質との抱合体の存在も示唆されているが<sup>34)</sup>、確たる証明はなされていない。以上を総合すると、今回のストレスによる PREG レベルの上昇は、主として脂肪酸エステルからの供給によるものと考えられる。一方で、PREG は脳内で様々なステロイドに代謝されるが、先に著者らは GC/MS を用いてデヒドロエピアンドロステロンレベルは拘束ストレスにより変化しないことを報告している<sup>44)</sup>。そこで今回は PREG から 3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水酵素により生成する PROG の変動を観察した。

Fig. 8 に脳内 PROG を分析したクロマトグラムを示した。PROG の誘導体化反応では、3 位の E 及び Z 異性体が生成し、その挙動が異なるため LC/MS クロマトグラム上ショルダーを有するピークが観察された。脳内 PROG レベルは、ストレス負荷により先の PREG に増して劇的な変化が観察された。すなわち、コントロールラットでは PROG 誘導体のピークがほとんど検出されないのに対して、ストレス負荷ラットではコントロールラットの 4 分の 1 の試料量でも大きなピークとして現れ、ストレスによりその脳内レベルが大きく増加することが明らかとなった (Table 2)。PREG から生成した PROG は更に脳内で 5 $\alpha$ -還元酵素及び 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水酵素の働きにより、最終的にアロプレグナノロン (AP) にまで代謝される。この AP は GABA<sub>A</sub> 受容体を介して麻酔作用、抗不安作用を発揮することが知られている<sup>45)46)</sup>。したがって、今回の拘束ストレスによる PREG 及び PROG レ

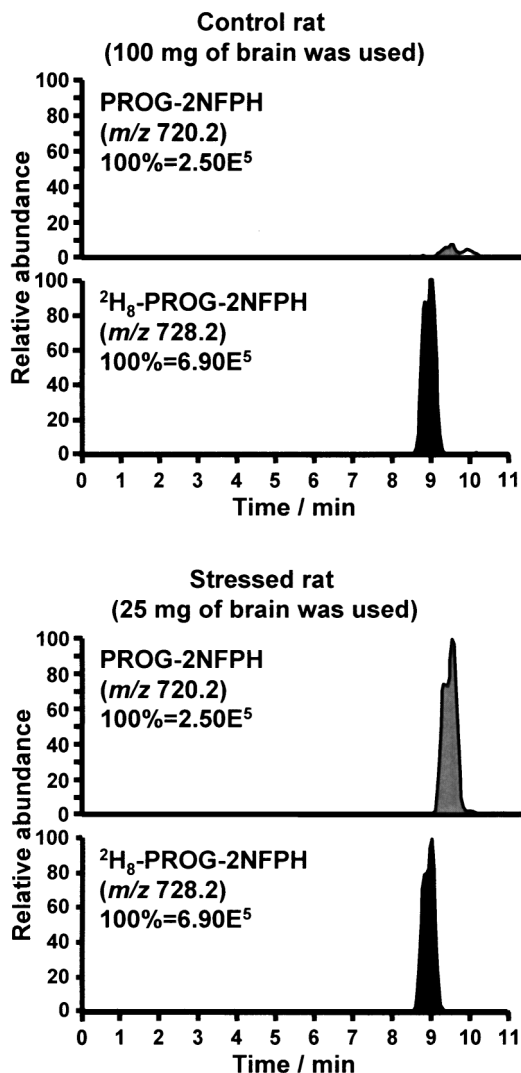


Fig. 8 Determination of PROG in rat brains as 2NFPH derivative

Table 2 Brain levels of PREG and PROG

Entry	PREG/ng g <sup>-1</sup> tissue		PROG/ng g <sup>-1</sup> tissue	
	Control rat	Stressed rat	Control rat	Stressed rat
1	8.80	59.7	<LOQ <sup>a)</sup>	5.85
2	9.74	68.9	<LOQ	22.3
3	5.91	39.1	<LOQ	5.95
4	6.84	64.6	ND <sup>b)</sup>	17.0
5	5.51	71.0	ND	14.6
Mean	7.36	60.7	<LOQ	13.1
Standard deviation	1.84	12.8	—	7.17

a) Less than limit of quantitation (0.5 ng g<sup>-1</sup> tissue); b) Not detected

ベルの上昇は、ストレスから脳組織を保護するためにAPの生合成を促進するためと推測される。

## 6 結 語

今日の生命科学分野における LC/MS の有用性は言うまでもない。しかし、より複雑なマトリックス中、あるいは局所部位での超微量物質の動態及び機能解析を達成するためには、一層高選択的で高感度な検出法の開発が重要となる。LC/MS の装置面での進歩は著しく、化合物によっては fg オーダーが分析可能な機器も既に市販されている。しかし、すべての化合物がこのような高感度な応答を示すことはなく、むしろ全く実用的な感度が得られない場合が多い。ECAPCI-MS は対象が電子親和性原子団を有する化合物に限定されるものの、バックグラウンドノイズが低いことに加え、通常の APCI インターフェースを負イオンモードで操作するだけの簡便さやキラル分離に有利な順相系 LC が使用できるなどの多くの長を有する。ニトロ基やハロゲンを含む誘導体化試薬も数多く市販されており、各種化合物に適した ECAPCI-MS 用誘導体化法の開発がなされれば、通常の LC/MS では分析困難な化合物に対しても、本法がその解決策となるものと期待される。なお、最後に ESI や APCI において高感度の得られにくい低極性化合物の LC/MS に関する総説を付記しておく<sup>47)</sup>。

著者らの研究は文部科学省科学研究費 | 基盤研究 (C) (2) No. 14572030 | 及び金沢大学重点化経費を受けて行われたものである。

## 文 献

- 1) D. J. Peet, B. A. Janowski, D. J. Mangelsdorf: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 571 (1998).
- 2) H. Tu, A. Y. Okamoto, B. Shan: *Trends Cardiovasc. Med.*, **10**, 30 (2000).
- 3) E.-E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher: *Int. Rev. Neurobiol.*, **46**, 1 (2001).
- 4) 三田村邦子, 島田和武: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **48**, 401 (1999).
- 5) K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi: *J. Chromatogr. A*, **935**, 141 (2001).
- 6) J.-F. Alary, A. Berthemy, A. Tuong, M.-F. Uzabiaga: Abstract of 50th ASMS conference (<http://www.inmerge.com/asms02pdf/1477.pdf>).
- 7) C. Rentel, P. Gfrorer, E. Bayer: *Electrophoresis*, **20**, 2329 (1999).
- 8) J. M. E. Quirke, C. L. Adams, G. J. Van Berkel: *Anal. Chem.*, **66**, 1302 (1994).
- 9) C.-C. Lai, C.-H. Tsai, F.-J. Tsai, C.-C. Lee, W.-D. Lin: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 2145 (2001).
- 10) W. J. Griffiths, S. Liu, G. Alvelius, J. Sjövall: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 924 (2003).
- 11) S. Liu, J. Sjövall, J. Griffiths: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 390 (2000).
- 12) M. R. Anari, R. Bakhtiar, B. Zhu, S. Huskey, R. B. Franklin, D. C. Evans: *Anal. Chem.*, **74**, 4136 (2002).
- 13) K. Chatman, T. Hollenbeck, L. Hagey, M. Vallee, R. Purdy, F. Weiss, G. Siuzdak: *Anal. Chem.*, **71**, 2358 (1999).
- 14) 杉 和人, 井津源市, 橋本 豊: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 57 (1998).

- 15) K. Hiraoka, I. Kudaka: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 265 (1992).
- 16) J. Schuhmacher, D. Zimmer, F. Tesche, V. Pickard: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1950 (2003).
- 17) K. Shimada, Y. Mukai, K. Yago: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **21**, 765 (1988).
- 18) 三田村邦子, 島田和武: 薬学雑誌, **118**, 206 (1998).
- 19) T. Higashi, K. Shimada: *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 875 (2004).
- 20) E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. G. Horning, R. N. Stillwell: *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 725 (1974).
- 21) D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele, E. C. Horning: *Anal. Chem.*, **47**, 2369 (1975).
- 22) C. S. Evans, R. Sleeman, J. Like, B. J. Keely: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1883 (2002).
- 23) G. Singh, A. Gutierrez, K. Xu, I. A. Blair: *Anal. Chem.*, **72**, 3007 (2000).
- 24) S. H. Lee, M. V. Williams, R. N. DuBois, I. A. Blair: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2168 (2003).
- 25) H. Hayen, N. Jachmann, M. Vogel, U. Karst: *Analyst (London)*, **127**, 1027 (2002).
- 26) H. Hayen, N. Jachmann, M. Vogel, U. Karst: *Analyst (London)*, **128**, 1365 (2003).
- 27) 東 達也, 島田和武: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 487 (2002).
- 28) T. Higashi, A. Yamauchi, K. Shimada: *Anal. Sci.*, **19**, 941 (2003).
- 29) R. C. Cookson, S. S. Gupte, I. D. R. Stevens, C. T. Watts: *Org. Synth.*, **51**, 121 (1971).
- 30) T. Higashi, D. Awada, K. Shimada: *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 738 (2001).
- 31) T. Higashi, D. Awada, K. Shimada: *J. Chromatogr. B*, **772**, 229 (2002).
- 32) T. Higashi, S. Homma, H. Iwata, K. Shimada: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 947 (2002).
- 33) T. Higashi, N. Takido, A. Yamauchi, K. Shimada: *Anal. Sci.*, **18**, 1301 (2002).
- 34) C. Mathur, V. V. K. Prasad, V. S. Raju, M. Welch, S. Lieberman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 85 (1993).
- 35) T. Higashi, N. Takido, K. Shimada: *Analyst (London)*, **128**, 130 (2003).
- 36) T. Higashi, N. Takido, K. Shimada: *Steroids*, submitted.
- 37) K. Shimada, Y. Mukai: *J. Chromatogr. B*, **714**, 153 (1998).
- 38) P. Liere, Y. Akwa, S. Weill-Engerer, B. Eychenne, A. Pianos, P. Robel, J. Sjövall, M. Schumacher, E.-E. Baulieu: *J. Chromatogr. B*, **739**, 301 (2000).
- 39) C. Corpéchet, M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjövall, R. Vihko, E.-E. Baulieu, P. Robel: *Brain Res.*, **270**, 119 (1983).
- 40) K. Mitamura, M. Yatera, K. Shimada: *Anal. Sci.*, **15**, 951 (1999).
- 41) T. Higashi, Y. Daifu, T. Ikeshima, T. Yagi, K. Shimada: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1907 (2003).
- 42) T. Higashi, H. Sugitani, T. Yagi, K. Shimada: *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 709 (2003).
- 43) S. Liu, J. Sjövall, W. J. Griffiths: *Anal. Chem.*, **75**, 5835 (2003).
- 44) K. Shimada, K. Yago: *J. Chromatogr. Sci.*, **38**, 6 (2000).
- 45) M. L. Barbaccia, M. Serra, R. H. Purdy, G. Biggio: *Int. Rev. Neurobiol.*, **46**, 243 (2001).
- 46) S. R. Engel, K. A. Grant: *Int. Rev. Neurobiol.*, **46**, 321 (2001).
- 47) H. Hayen, U. Karst: *J. Chromatogr. A*, **1000**, 549 (2003).

## 要 旨

ステロイドは生命機能維持に不可欠な生体分子であり, その生体内動態及び機能の解析は, 臨床診断や新薬開発上極めて重要である. その方法論として液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) が有用と考えられるが, ステロイドのエレクトロスプレーイオン化や大気圧化学イオン化 (APCI) に対するイオン化効率が必ずしも高くなく, 複雑な生体試料中の微量分析では実用的な感度が得られない場合も多い. 一方, 電子親和性原子団を有する化合物は, APCI インターフェースにおいて電子を捕獲して効率的にイオン化され (電子捕獲 APCI), また本条件下ではバックグラウンドノイズが低いことから高感度な応答が得られる. そこで著者らは, 各種ステロイドの電子捕獲 APCI-MS 用検出指向誘導体化法を開発し, 生体試料分析に適用した. すなわち, ヒト血しょう中ビタミン D<sub>3</sub> 代謝物及びラット脳内神経ステロイド定量法を開発し, 後者についてはストレスによる脳内レベルの変動解析に応用した.