

分析化学総説

ステロイドの高速液体クロマトグラフィー/質量分析

三田村邦子*, 島田 和武®*

High-performance liquid chromatography/mass spectrometry of
steroids (Review)

Kuniko MITAMURA and Kazutake SHIMADA*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa 920-0934

(Received 21 August 1998)

An overview of high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) of steroids is presented according to groups of steroids. LC/MS is now considered to be the most promising analytical method for the determination of steroids (especially the conjugated type) in biological fluids without derivatization. However, due to its low sensitivity compared with gas chromatography/MS, some skilful techniques, including derivatization, are necessary to overcome this problem. An overview of the ionization methods of LC/MS is also presented.

Keywords : high-performance liquid chromatography/mass spectrometry; ionization; steroid; conjugate; derivatization.

1 緒 言

ステロイドは広く生物界に分布する有機化合物であり、強い生理作用を発現するものが多い。ステロイドの化学的研究は前世紀から行われているが、本格的に取り上げられたのは今世紀の初めからである。すなわち、1903年に始まる Windaus 一門のコレステロール、1912年以後の Wieland 一派の胆汁酸 (bile acid) の研究を中心に、多くの化学者の努力によって 1932年の後半に至ってその化学構造が確定されることとなった。ステロイドは 17 位側鎖の種類及び核間メチル基の有無などの化学構造上から、ゴナン (gonane, C₁₇)、エストラン (estrane, C₁₈)、アンドロスタン (androstane, C₁₉)、プレグナン (pregnane, C₂₁)、コラン (cholane, C₂₄) などに分類される (Fig. 1)。しかし、女性ホルモン

(エストロゲンなど)、男性ホルモン (アンドロゲン)、鉱質コルチコイド、糖質コルチコイド、胆汁酸などの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やビタミン D なども知られている¹⁾²⁾。

ステロイドの分析法には化学的手法を含めて種々のものが知られているが、現在は用されているものを大別するとラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA)、酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) 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)、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になる。結合タンパクを用いる分析法は、抗体などの結合タンパクの諸性質が分析法の良否を決め、プロフィール分析に適さない欠点を有するが、高感度、高選択的な上に多数の検体の同時処理が可能など多くの利点を有している。

GC がステロイドの研究上で果たした役割は大きく、

* 金沢大学薬学部: 920-0934 石川県金沢市宝町 13-1

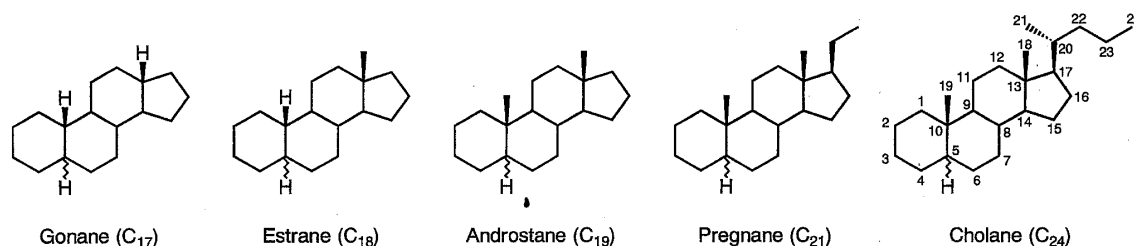


Fig. 1 Structures of steroids

特に誘導体化などの工夫によりその適用範囲は拡大された。しかし、GCでは不可能な不揮発性、熱に不安定な抱合体などの分析も可能なHPLCは、1960年代後半より爆発的な勢いで発展し、ステロイド分析上のファーストチョイスとされている。この点に関しては多数の総説^{3)~6)}、成書²⁾があるので参照していただきたい。ところで、GC/質量分析(MS)、LC/MSに代表されるhyphenated techniqueは、クロマトグラフィーの高分離能とMSの構造解析能、高感度な応答性を組み合わせたものであり、豊富な情報量を有する信頼性に優れた分析法である。GC/MSは既に完成されたものであるのに対し、LC/MSもいよいよ実用化の時代に入り、特に優れたイオン化法の開発は高極性化合物、高分子化合物の分析を可能とし、医学、薬学、化学工業、環境科学など広範囲な分野において有効な分析手段として威力を発揮しつつあり、その潜在能力を含めて高く評価されている。しかし、LC/MSはGC/MSと比較し、イオン化効率の低い場合が多いこと、イオン化部からMSへの試料の導入率が低いこと、液体の高粘性のため安定なベースラインが得にくいことから、注入量の問題(GC/MSはLC/MSの1/10程度)を考慮しても、その感度は1/10~1/50と言われている。これを解決するために、セミマイクロカラムの使用やタンデム質量分析計(MS/MS)を検出部とするLC/MS/MS〔イオントラップ方式の場合はLC/(MS)⁷⁾〕が開発され、特に後者はselected reaction monitoring (SRM)モードで使用することから、高い選択性とGC/MSに匹敵する高感度化が達成されている。しかし、前者の場合には改善されたとは言え、コンベンショナルカラムに比べ分離能が劣る場合のあること、後者の場合はGC/MS/MS〔又はGC/(MS)⁷⁾〕に比べると、やはり感度が落ちるなど十分とは言えない。また、LC/MSの分離能がキャピラリーGC/MSのそれに比べて劣る問題があり、現在のところキャピラリーGCほどの分離能を有するカラムを作製するのは難しいとされている。さらに、イオン化機構との関係からGC/MS

に比べて構造に関して得られる情報量が少ない点も見逃せない。このような問題点はあるものの、LC/MSは現在ステロイドの分析上最も注目される方法論の一つであり、本総説では各ステロイド別に詳説したい。なお、用いられているLCがほとんどが逆相系であることから、順相系のみその旨記した。また、内径が1 mm未満のカラムを使用した場合にmicro-LCと記載した。

生体内ステロイド分析法の詳細に関しては総説⁷⁾、成書²⁾を参照していただきたい。

2 LC/MSにおけるイオン化法について

LC/MSによる分析の成否はその心臓部に相当するイオン化法の使い分けに基づくと言っても過言ではない。そのイオン化はLCとMSとのインターフェースの役割を兼ねる場合が多く、GC/MSのそれとは若干異なる。LC/MSの進歩はイオン化法の進歩そのものであり、30年近い歴史と、実用的なものとして10種近いイオン化法が知られているが、すべての化合物に有効なものは現在のところ見られない。したがって、測定対象を効率良くイオン化するには、それぞれの特徴を理解し目的に応じたイオン化法の選択が必要である。そこで、まずイオン化法について概説するが、詳細は成書を参照していただきたい^{8)~10)}。

大気圧化学イオン化法(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)では、LCからの溶出液を加熱噴霧によりまず微粒化し、生成した液滴を更に加熱して微細化する。それを、高電圧の印加により針電極の先端に生成したコロナ放電領域に導入して溶媒分子をイオン化し、続いて溶質分子とのイオン分子反応により目的の試料分子をイオン化する。比較的低分子(<mw 1000)で、低極性~中極性化合物の分析に適している。化学イオン化法という名前から分かるように、LCの移動相がイオン化されて反応イオンとして働くことから、添加する塩(揮発性を有するAcONH₄など)の影響も大きい。

エレクトロスプレーイオン化法(electrospray ioniza-

tion, ESI)におけるイオン生成過程は, 大気圧下で静電噴霧現象により生成した帯電液滴が, 溶媒分子の脱離などにより更に微細化され, 生じた高電荷を有する微細液滴から, 気相のイオンが飛び出すイオン蒸発に基づいている。ESIに適当な移動相流量は数十 $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度であるが, キャピラリーの周囲から窒素ガスを吹き付けることによって, 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度までの流量も使用可能であり, これをイオンスプレーイオン化 (ion spray ionization, ISP) と呼ぶこともある。ESIは不揮発性で熱に不安定な化合物の分析に有利な上, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ などの多価イオンを生成するのが特徴で, これにより分子量 200~数十万のペプチドやタンパク質までの高極性物質の測定が可能である。液量に基づく問題からセミマイクロカラムがはん用されているが, コンベンショナルカラムに比べての分離能の低下が懸念される。

サーモスプレーイオン化法 (thermospray ionization, TSP) のイオン生成過程は以下のとおりである。LCからの溶出液を, AcONH_4 などの電解質と共に加熱キャピラリーから数 Torr の減圧下に噴霧すると電解質イオン (NH_4^+ や AcO^-) が生成し, これを反応イオンとするイオン分子反応に基づき目的の試料分子をイオン化するものである。一種の化学イオン化法であり, 比較的疎水性の化合物に有利とされているが, 熱に不安定な化合物の分解を伴う場合もあり注意を要する。

フリット-高速原子衝撃法 (frit-fast atom bombardment, frit-FAB) は, MSにおいてははん用されている FAB を LC/MS 用に開発したものである。マトリックス (グリセロールなど) を含む LC からの溶出液を, 金属フリットを通して MS 系の高真空中に連続的ににじみ出させ, フリット表面上のマトリックス層を加速した Ar や Xe などの希ガス原子で衝撃するものである。本法は熱に不安定, 高極性, 難揮発性の高分子化合物など多彩な化合物をイオン化することができるが, LC からの溶出液量は数 $\mu\text{l}/\text{min}$ に制限される。これに伴い, LC からの導入にスプリットを要する上, マトリックスのイオン源などへの付着も無視できない。

パーティクルビーム法 (particle beam, PB) は, 大量のヘリウムガスを LC の溶出液の出口に吹き付けエアロゾルを作り, ジェットセパレーターに導いて試料を濃縮し, その後電子衝撃イオン化法 (electron ionization, EI) や化学イオン化法 (chemical ionization, CI) でイオン化を行うものである。本法は, イオン化法が EI 又は CI のため構造に関して豊富な情報の得られる場合もあるが, 高極性, 高分子化合物の分析には適さない。

以上のイオン化法のなかで特にはん用されているのは, APCI, ESI, TSP, frit-FAB などであるが, 正イオン検出又は負イオン検出の使い分けも大切である。特に, 負イオン検出はノイズが小さく高感度の得やすい場合も多いが, あくまでも測定対象との兼ね合いによる。その他, タンパク質など高分子物質の分析に注目されているマトリックス支援レーザー脱離イオン化法と LC とのオンライン化¹¹⁾, 加熱を要しないソニックスプレーイオン化法¹²⁾, 感度の向上を目指した直交スプレー法 (従来のは同軸スプレー法) など日進月歩の開発が進んでいる。

3 ステロイド全般に関するもの

ステロイドに限らず薬物は, 一般に生体内で第一相反応 (水酸化など) 後, グルクロニデーション, サルフェーションなどの第二相反応を受けて排せつされる。これら第二相反応生成物は高極性で水溶性も高く, GC などによる分離精製が容易でないことから, 水解前後のゲニン部を定量し, その差異より定量する場合が多い。LC/MS の特長を生かすのに GC/MS では不可能な不揮発性, 熱安定性に欠ける化合物を対象とする場合が多い。これには抱合体が最適であり, ステロイドの分野でも早くから研究対象とされている。その利点は水解することなく分析することで抱合に関する情報が得られること, 水解に伴う回収率などの問題を考慮しなくても済むことなどである。以上の背景を基に, ここでは抱合体を含む標品各種ステロイドを用いた LC/MS の測定例をイオン化法ごとに紹介する。

Watson らは, 各種ステロイド (アンドロゲン, プレグナン, エストロゲン, 胆汁酸) のモノ硫酸塩, 二硫酸塩 (計 34 種) を LC/TSP-MS (負イオン検出) で検討し, selected ion monitoring (SIM) で 100 pg が検出可能と報告している¹³⁾。この場合, 塩を添加しない移動相でいずれも分子イオンが見られるが, 他のイオンの生成は噴霧器温度に左右される。彼らは同様に各種ステロイドグルクロニド (計 18 種) についても検討を加え同様の知見を得ている¹⁴⁾。なお, 移動相に塩を添加していないことから分離は CH_3CN を organic modifier とするグラジエント溶出により行われている。これに対して移動相に AcONH_4 を添加した研究が Liberato らにより行われ, $[\text{M}-\text{H}]^-$ や $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ イオンの生成, 特に前者はほぼ単一イオンとして観察されている¹⁵⁾。なお, この論文では遊離型ステロイドにも検討を加えており, ジヒドロキシアセトン側鎖を有するコルチコイドでは噴霧器温度により分解の見られることが報告されている。

Kobayashiらは、60種にも及ぶ遊離型ステロイドのAPCI-MS（フローインジェクション）を検討し以下の知見を得ている¹⁶⁾。すなわち、ドリフト電圧、ネブライザー温度が分子イオンの生成を左右すること、4エン-3オン構造を有するステロイドでは $[M+H]^+$ イオンが、3位に水酸基を有するそれでは $[M+H-H_2O]^+$ 又は $[M+H-2H_2O]^+$ が主に生成することなどである。

イオン化法のところでも述べたようにESI、ISPによるLC/MSでは流量が制限されることから、セミマイクロ又はキャピラリーカラムを用いてなされている。Bruinsらは、エストロゲン硫酸塩へLC/ISP-MSを適用すると多価イオン（負イオン検出）が検出されること、また、衝突誘起解離（collision-induced dissociation, CID）反応により HSO_4^- などのフラグメントイオン（プロダクトイオン）の生成が見られることを報告している¹⁷⁾。Shackletonは、高血圧、鉍質コルチコイド研究と関連して尿中ステロイドの分析をGC/MS、LC/ESI-MSで行い、前者の遊離型ステロイドへのはん用性、高感度性を認めつつ、後者の場合も抱合体のそれにおいて15 pgの測定が可能としている¹⁸⁾。Murrayらは、32種に及ぶステロイドモノ硫酸塩、二硫酸塩のESI-MS（フローインジェクション、LC）を検討し分子陰イオン又は dianion が主に生成すること、CIDにより生成するプロダクトイオン（ HSO_4^- ）が硫酸塩の結合位置により異なり、芳香環に結合している場合は見られないとの知見を得ている¹⁹⁾。Bowers, Sanaullahは、テストステロン3-グルクロニド、-硫酸塩などについて検討し、micro-LC/ESI-MS/MS（正イオン検出）で豊富な構造情報が得られるが、負イオン検出では検出限界は低下するものの構造に関する情報は得難いと報告している²⁰⁾。

4 アンドロスタン、プレグナン系ステロイド

アンドロスタン、プレグナン系ステロイドは前述のとおり各々 C_{19} 、 C_{21} ステロイドの総称であり、前者はアンドロゲン作用、後者は黄体ホルモン作用を有するもの（プロゲステゲン）が主である。これらの体液中濃度の測定は、ステロイドホルモン産生臓器の機能や各種関連酵素活性の指標として臨床化学上重要である。

現在、尿中に排せつされるアンドロスタン系ステロイドの大部分を占める17-オキソステロイドは、Zimmermann反応による吸光光度法により定量されているが、総量を求めるものであり、各ステロイド別の知見は得られない。RIA、GC/MSによる測定もなされているが、RIAでは抗体の差異に伴い測定値が大きく変動することが問題とされている。また、これらは硫酸塩、グルクロ

ニドなどの抱合体として排せつされることから、GC/MSによる測定では、遊離型代謝物と分離後、脱抱合、更に誘導体化するという煩雑な操作が必要である上、抱合に関する情報が喪失される。その点、LC/MSは簡便で信頼性の高い分析法として期待され注目されてきた。標品を用いた基礎検討については前述したが、実試料への最初の適用例として、LC/moving belt CI-MSによる血清中プロゲステロンの定量がある²¹⁾。Moving belt法では使用履歴によるバックグラウンドの上昇がしばしば問題となるが、ベルトを不活性化することにより解決し、検出限界4 ng/mlと報告している。Shackletonらは、 $[7,7-^2H_2]$ -デヒドロエピアンドロステロン3-硫酸塩を内標準物質（IS）として用いるLC/TSP-MS（負イオン検出）により、血清中デヒドロエピアンドロステロン3-硫酸塩及びそのアナログ（アンドロステロン3-硫酸塩、エピアンドロステロン3-硫酸塩、アンドロステンジオール3-硫酸塩）の定量法を開発し、RIAとの相関について論じている²²⁾。その結果、RIAではLC/MSの約2倍高値を示し、交差反応性が懸念されるのに対し、LC/MSでは高選択的な分析が達成されたとしている。また、中島らはデヒドロエピアンドロステロン3-硫酸塩のLC/APCI-MSによる定量法を報告しているが、カラムスイッチング法を導入した本法は血清（100 μ l）の直接注入が可能で簡便なものである²³⁾。

以上のような内因性のものとは別に、合成アンドロゲン、プロゲステゲンが各々タンパク同化剤、経口避妊薬としてはん用されている。前者のドーピング検査に代表されるように、その体内動態を把握することは内因性のそれと同様に重要である。なお、ドーピング検査で内因性ステロイドホルモンの使用が疑われる場合には、尿中のテストステロン/エピテストステロンを用いて識別している。従来法では抱合体を加水分解後GC/MSにより分析するものであるが、Bean, Henionは、LC/ISP-MS/MS（負イオン検出、SRM）を用い、同位体希釈法による両者の硫酸塩及びグルクロニドの直接定量法を報告している²⁴⁾。これとは別に、いずれも尿を測定試料としたものであるが、オンライン固相抽出LC/PB-EI-MSによる遊離型アンドロゲン（28種）²⁵⁾、ESI-MS/MSによるノルアンドロステロン（遊離型及び抱合型；フローインジェクション）²⁶⁾、LC/APCI-MS/MS（酵素水解後測定；正イオン検出）又はLC/ISP-MS/MS（抱合型；負イオン検出）によるスタノゾロール（合成アンドロゲン）²⁷⁾、LC/APCI-MSによるフルオキシムステロン（合成アンドロゲン）及びその16-ヒドロキシ体などの同定例²⁸⁾、LC/ISP-MSによる遊離型及び抱合型ボルデノン

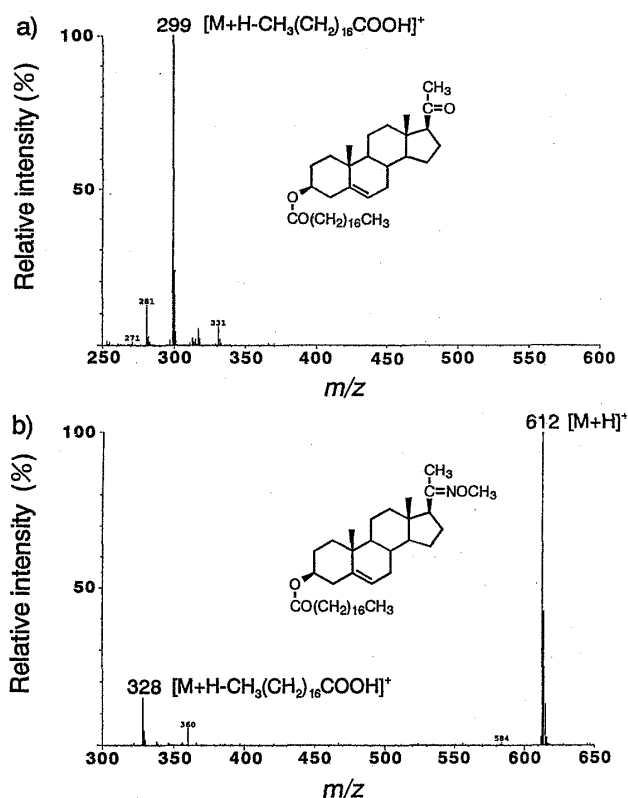


Fig. 2 LC/APCI-MS spectra of pregnenolone 3-stearate (a) and its methyloxime derivative (b)
Mobile phase: a) MeOH, b) MeOH containing AcONH₄ (10 mM)

(合成アンドロゲン)の定量例²⁹⁾が報告されている。また、経口避妊薬として使用される合成プロゲステゲン、レボノルゲストレルの胆汁中代謝物の同定手段の一つとしてLC/APCI-MSが使用されている³⁰⁾。

ところで近年、プレグネノロン、デヒドロエピアンドロステロンに代表されるオキソステロイドのは乳類の脳内における存在が明らかとなり(ニューロステロイド)、脳機能との関連から注目されている³¹⁾。最近著者らはLC/APCI-MSによりラット脳を検索し、プレグネノロン及びデヒドロエピアンドロステロンの3-ステアレート、-パルミテート、-硫酸塩を同定した³²⁾³³⁾。この際、メチルオキシムへの誘導体化が分子イオンピーク又は関連ピークの検出を容易にするとともに(Fig. 2)、感度も上昇させることを見いだした。更に、本法をプレグネノロン及びプレグネノロン3-ステアレートの定量に適用し、ストレスとの関連を示す注目すべき知見を得た³⁴⁾。LC/MSにおける誘導体化の有用性は、杉らによっても報告されている。すなわち、非極性物質であるアンドロステンジオンをモデル化合物として、極性物質のカルボ

キシメチルオキシム誘導体に導き検討した結果、LC/ESI-MS(負イオン検出)でS/Nが5倍に向上し、2.5~100 ng/mlの定量(血中)が可能であったと報告している³⁵⁾。

5 コルチコイド

副じん(腎)皮質ホルモンは、副腎皮質の球状帯より分泌され鉱質代謝に関係する鉱質コルチコイドと、束状帯より分泌され糖質代謝、消炎作用に関係する糖質コルチコイド、網状層より分泌される副腎性アンドロゲンに大別される。コルチコイドとは前二者及び類似の作用を有する化学合成物質の総称である。鉱質コルチコイドには11-デスオキシコルチコステロン、アルドステロン、11-デヒドロコルチコステロン、コルチコステロンが、糖質コルチコイドにはコルチゾール、コルチゾンがある。このほか合成ステロイド剤としてプレドニゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、フルメタゾンなど多くのものが開発されている。血中コルチコイドの測定(1~10 ng/血清 100~200 µl)は薬物投与計画だけでなく副腎皮質機能の診断上重要であり、HPLC、GC、GC/MS、各種結合タンパクを用いる分析法などにより行われている。なお、尿中のそれは(測定対象;17-ヒドロキシコルチコイド)、コルチゾールの分泌状態を反映することからPorter-Silber反応による比色定量により行われている。コルチコイドはジヒドロキシアセトン側鎖を有するものが多く、化学的に安定とは言えないことから、GC及びGC/MSのように分析上高温を必要とする場合には、揮発性の向上ばかりでなく安定化を目的として誘導体化を導入する場合が多い。このようにコルチコイドは臨床化学上の要求性が高いこと、熱に対して不安定なこと、多数の化合物が知られていることから、LC/MSによる測定対象として早くより取り上げられている。当初はLC/MSの開発上のモデル化合物とされていたが^{36)~39)}、その後LC/TSP-MSによる実用面への試みが多数なされている^{40)~47)}。例えば最近Shibasakiらは⁴⁷⁾、ヒト血中のコルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾンの定量法(正イオン検出;SIM, $[M+H]^+$)を開発した。前処理は固相抽出による簡単な方法であるが、特に重水素化ISの保持挙動について検討し、同位体効果が見られないLCの系を選択している。しかし、ほかのコルチコイドの分離との兼ね合いもあって容易ではない。なお、検出限界は各化合物により異なるが、コルチゾールで250 pg (S/N=2.5)である。このようなヒト血清中のコルチゾールのほか⁴⁰⁾⁴²⁾、尿中⁴³⁾⁴⁵⁾、だ液中⁴⁴⁾のコルチコイドを対象としたものもあ

り、臨床化学上の適用範囲の広さを示している。その他、ラット副腎⁴¹⁾、妊馬尿⁴⁶⁾を対象としたものもあるが、いずれも TSP-MS を用いている。なお、本法の場合、噴霧器温度によりジヒドロキシアセトン側鎖の分解を伴う場合があることは以前に記した¹⁵⁾。その他のイオン化法によるものとしては、免疫アフィニティークロマトグラフィーを逆相系 LC/PB-MS と接続し、馬尿中のデキサメタゾン、フルメタゾンの定量を行った例がある⁴⁸⁾。

LC/MS では誘導体化を要せずに測定できるのが利点とされるが、コルチゾールの 21 位の水酸基をアセチル化 (Ac_2O /トリエチルアミン, 15 min, 室温) することで、分子量関連イオンが基準ピークとなること、誘導体化前に比べて S/N が約 4 倍増大 (LC/TSP-MS, $[\text{M}+\text{H}]^+$, 検出限界 0.24 pmol/injection) することが報告され、感度的には GC/MS に匹敵するものだとされている⁴⁵⁾。誘導体化条件は緩和であり有用と考えられる。

コルチゾールの LC/MS に関する総説も見られるので付記しておく⁴⁹⁾。

6 胆汁酸

胆汁酸は、肝においてコレステロールよりまずコール酸、ケノデオキシコール酸が生合成され、次いで腸内細菌の作用によりそれぞれデオキシコール酸、リトコール酸及びウルソデオキシコール酸に変換される。これらは 24 位カルボキシル基における抱合形式の差異により遊離型、グリシン抱合型及びタウリン抱合型に分類される。以上の 15 種が健常人体液中における主胆汁酸であるが、更にステロイド骨格上の水酸基がサルフェーションあるいはグルクロニド化を受け、結果として数多くの化合物が存在することになる。尿中及び血中におけるこれら胆汁酸の濃度、組成、抱合形式は各種肝胆道疾患時に変動し、更に脳けん(髄)性黄色しゅ(腫)症、Zellweger 症候群などの先天性疾患時に異常胆汁酸の出現も明らかとされている。したがって、胆汁酸の質的、量的変動を的確に把握することは病態の解析上重要であり、主として免疫測定法、酵素法、クロマトグラフィーにより測定されている。前二者はそれぞれ個々の胆汁酸量、あるいは総胆汁酸量を簡便に測定できる点が特徴とされ、HPLC、GC/MS に代表されるクロマトグラフィーは胆汁酸相互の量的関係を同時に知ることができ、プロファイル分析に有利である。このうち HPLC では、胆汁酸の UV 検出器に対する応答性が低いため蛍光誘導体化などの工夫を必要とする。一方、GC/MS では抱合体を加水分解後揮発性誘導体に変換するという煩雑な操作を必要とする。このように、抱合形式、抱合位置に関す

る生体の情報を失うことなく、簡便かつ高感度に一斉分析することは容易ではない。LC/MS はこうした抱合体の測定に威力を発揮することから注目され、frit-FAB イオンフェースの開発時にもモデル化合物として取り上げられている⁵⁰⁾⁵¹⁾。その後、Evans らは、micro-LC/frit-FAB-MS による新生児尿中胆汁酸の同定を報告した⁵²⁾。また、Yang らは、micro-LC/frit-FAB-MS/MS (負イオン検出) ではカルボン酸のアミノスルホン化が構造解析上有用であるとしている⁵³⁾。LC/TSP-MS では、Setchell, Vestal が胆汁及び血清中胆汁酸分析を報告⁵⁴⁾、Ecker らは標品を用いて高分解能 MS、MS/MS における検出条件を精査している⁵⁵⁾⁵⁶⁾。また、LC/ISP-MS において、種々の移動相を用いた場合に生成するイオン種についても検討されている⁵⁷⁾。なお、以上のイオン化法において正イオン検出では $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-n\text{H}_2\text{O}]^+$ のほか、特に TSP、ISP では溶媒付加イオンが生成されるため、質量スペクトルは複雑になる。一方、負イオン検出では主に $[\text{M}-\text{H}]^-$ が生成されフラグメントイオンはほとんど見られず、定量には有利である。しかし、胆汁酸及びその抱合体はカルボン酸、スルホン酸を有することから、イオン性の高極性化合物の測定に威力を発揮する ESI-MS (負イオン検出) による分析が有用である。Roda らは、血清及び胆汁中の分析に適用し、micro-LC のプレカラムスプリットモードで検出限界が 5 pg であったと報告した⁵⁸⁾。Yang らは、micro-LC/ESI-MS と micro-LC/frit-FAB-MS により健常人及び催胆汁肝疾患罹患胎児尿中胆汁酸及び胆汁アルコールを同定したが、この際、ESI-MS は frit-FAB-MS (検出限界 90 fmol) に比べ 20~50 倍高感度であった⁵³⁾。また、Ikegawa らは、尿中 3-グルクロニド及び 3-硫酸塩抱合型胆汁酸分析に適用し、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ を用いる SIM 分析により、24 位抱合体を含む各々 15 種の一斉定量法を開発した^{59)~61)}。なお、これら抱合体は分子内に二つのイオン性官能基が存在しているが、 $[\text{M}-\text{H}]^-/[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ は官能基の $\text{p}K_a$ と移動相に用いる緩衝液のそれに依存していた。ところで、最近 Goto らは、各種胆汁酸の *in vitro* でのグルクロニド化を検討し、遊離型胆汁酸から 24-アシルグルクロニドが優先的に生成することを見いだした (Fig. 3)。この同定は、アセテートメチルエステルへ誘導体化後の LC/APCI-MS によってもなされたが、最終的には LC/ESI-MS による標品との直接比較に基づいている⁶²⁾⁶³⁾。アシルグルクロニドはカルボン酸を有する化合物に一般的に見られる抱合形式であるが、加水分解されやすく不安定なことから現在まで十分な分析法は見られなかった。今回、簡便な標品合成法の開発とともに⁶²⁾、

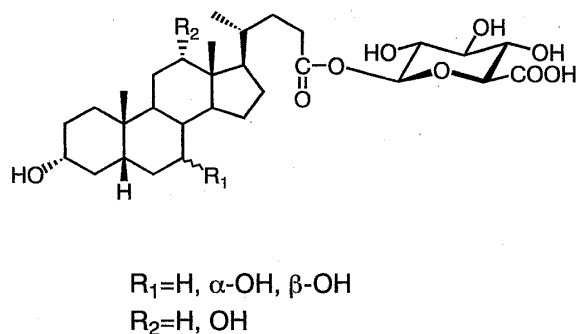


Fig. 3 Structures of bile acid 24-acyl glucuronides

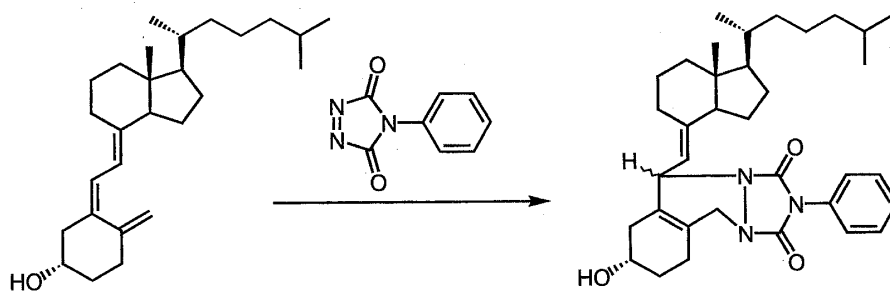
優れた分析法が確立された意義は大きく、 α -アシルプロピオン酸系抗炎症剤などへの応用が期待される。

7 ビタミン D

ビタミン D (D, 主に D_3 及び D_2) は抗くる病因子として発見された脂溶性ビタミンであるが、活性型代謝物は生体内カルシウム代謝を調節するステロイドホルモンとしてとらえられている。D は皮膚で生成あるいは摂取された後、肝で 25-ヒドロキシビタミン D [25(OH)D] に、次いで腎で活性型代謝物である $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$] や $24R,25$ -ジヒドロキシビタミン D [$24,25(\text{OH})_2\text{D}$] などに代謝される。血中 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度の測定は D の供給状態の指標として、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のそれは、D 代謝異常を伴う各種疾患の鑑別診断上重要である。さらに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及びその合成アナログは、D 代謝異常性骨疾患治療薬だけでなく免疫調節薬、抗がん剤などとして、また $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は新規骨粗しょう (鬆) 症薬として期待されており、その体内動態の解明が新薬の開発上重要な課題となっている。現在これらはラジオレセプターアッセイ、競合的プロテイン結合測定法、RIA, HPLC, GC/MS などを駆使して測定されているが、各代謝物の血中レベルが低い上 [$25(\text{OH})\text{D}_3$, 10~40 ng/ml; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 30~60 pg/ml; $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 1~4 ng/ml], 構造が相互に酷似していることなどから必ずしも容易ではない。また、D は熱に不安定で、GC/MS では熱異性を伴うため、LC/MS による分析が有用であると期待される。しかし本化合物は、種々のイオン化法による MS において十分なイオン量を与えないことから実用的な感度を得るには至っていない。Adachi らは、LC/APCI-MS によりマルチビタミン剤中 D_3 , D_2 を測定しているが、その検出限界は 0.5 ng ($S/N=2$) であった⁶⁴。また、上述の D 代謝物の測定例は、Watson ら⁶⁵, Vicchio ら⁶⁶により報告

されているが (いずれも LC/TSP-MS), 前者では多量の血しょう試料 (10 ml) を要し、また後者では比較的血中濃度の高い $25(\text{OH})\text{D}_3$ の測定に限局されている。一方、薬物動態研究, *in vitro*, *in vivo* での代謝研究には構造情報の得られる LC/MS が威力を発揮している。最近、Ishigai らは、二次性副甲状腺腺 (腺) 機能亢進 (亢) 進症治療薬として開発された 22-オキサカルチトリオール代謝物同定に LC/APCI-MS の適用を試みた⁶⁷。本法は GC/MS に比べフラグメントが少なく構造解析能には欠けるものの、 S/N は 10 倍にも改善されていた。彼らは LC/ESI-MS/MS (SRM) による血中濃度の定量法 (定量限界 20 pg/ml) も報告している⁶⁸。また、松崎らは LC/ESI-MS/MS (負イオン検出, SRM) による血中 $26,26,26,27,27,27\text{-F}_6\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 定量法を開発した⁶⁹。本法では定量限界 0.1 pg/ml と超高感度分析が可能と報告されているが、化合物自身が電気陰性度の高いフッ素原子を有していることも寄与しているものと考えられる。抱合型 D 代謝物分析にも脱抱合処理を伴うことなく分析可能な LC/MS が有用である。著者らは D 又は $25(\text{OH})\text{D}$ から *in vivo*⁷⁰, *in vitro*⁷¹ で生成した各々のグルクロニドを LC/APCI-MS により同定した。グルクロニドは APCI-MS の負イオン検出で検出できるが、メチルエステルに誘導体化することで正イオン検出のそれでも十分な応答を示し、未知グルクロニドの同定上有用と思われる⁷⁰。また、Shimoyamada らは、 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の *in vivo* 代謝物中に $23S,25$ -ジヒドロキシ-24-オキシビタミン D_3 23-グルクロニドが存在することを、メチルエステル化後の LC/frit-FAB-MS により明らかとした⁷²。

ところで、4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione, PTAD) 及びその 4 位アナログ (Cookson 型試薬) は D の *s-cis*-diene と選択的に反応し、安定な Diels-Alder 付加体を生成するが、最近、本試薬の LC/MS 用誘導体化剤としての有用性が注目を集めている (Fig. 4)。すなわち、Vreeken らは、 D_3 の PTAD 付加体は LC/TSP-MS で正負両イオンの検出が可能であり、感度も誘導体化前の 7~70 倍に上昇したと報告している⁷³。Yeung らは、micro-LC/frit-FAB-MS/MS⁷⁴ 又は micro-LC/ESI-MS/MS において D_3 代謝物の PTAD 付加体特徴的なプロダクトイオン (m/z 298, 1-ヒドロキシ代謝物では m/z 314) を生成することに着目し、抗白血病剤である $\Delta^{16}\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及びその代謝物の同定、定量 (SRM) に適用した⁷⁵。本法の定量限界は数十~数百 pg であるが、腎臓 (灌) 液中の分析に十分な感度を有している。著者らは D_3 3-

Fig. 4 Derivatization of D₃ with PTAD

脂肪酸エステルの分析に本誘導体化を試みたところ、APCI-MS（フローインジェクション）において誘導体化前は主に脱脂肪酸イオンが生成されるが、PTAD 付加体は分子量関連イオンの生成比が向上することを見いだした。また、CD 環が脱離した特徴的なフラグメントイオンが検出され、誘導体化が抱合体を含めた各種 D 代謝物の同定に有用であると考えられる⁷⁶⁾。また、LC/MS 用誘導体化試薬として、Na⁺ 包接による電荷の導入を目的としたクラウンエーテル（ESI 用）⁷⁷⁾や電子捕獲性官能基 {ペンタフルオロベンジル（pentafluorobenzyl, PFB）基} を有する Cookson 型試薬が開発されている。後者は順相系 LC/PB-電子捕獲負イオン化 MS において [M-PFB]⁻ イオンが生成するが、本イオンを用いる SIM により乾せん（癩）治療薬として開発された合成 D アナログの血中濃度測定が報告されている⁷⁸⁾。

8 その他のステロイド

生体内ステロイド生合成の源であるコレステロールの分析は、生化学的観点だけでなく病態との関連からも注目されるが、それ自身顕著な発色団を有していないことから、主として GC 又は GC/MS によりなされてきた。しかし、生体内では脂肪酸エステルや硫酸塩として存在しているものも多く、これらの分析は上記の方法では十分ではない。ステロール脂肪酸エステルの LC/MS による最初の分析例は Kuksis らによるもので⁷⁹⁾⁸⁰⁾、コレステロールを含む種々のステロールのエステルを分離し、四重極型 MS (CI) で検出している。しかし、分離したものの約 1% を MS へ導入する程度のシステムで十分なものではない。ヒト血しょう中のコレステロール 3-硫酸塩の定量に関しては、^[2H₆] コレステロール 3-硫酸塩又は ^[13C₂] コレステロール 3-硫酸塩を IS として LC/TSP-MS により検討されている。従来法に比べて水解を要しない利点があり、実試料へ適用し病態（recessive X-linked ichthyosis; 皮膚病の一種）により増加することを

指摘している⁸¹⁾。血清中遊離型コレステロールの同位体希釈法による定量は Takatsu, Nishi により LC/APCI-MS⁸²⁾、LC/TSP-MS⁸³⁾ を用いて開発され、満足すべき知見が得られている。また、Careri らにより標品のコレステロール、オキシコレステロールを用いて LC/PB-MS による検討（EI, CI や順相, 逆相系 LC）がなされている⁸⁴⁾。そのほかフローインジェクションによる検討では、Berkel らは、コレステロールをフェロセンとの誘導体とし ESI-MS で高感度検出可能としている⁸⁵⁾。フェロセンが電気化学的に活性な点に着目したユニークな研究である。

心不全の治療には用いられジゴキシニンに代表される強心配糖体は、その治療域と中毒域が近接している上に個人差が大きいことから、血中濃度のモニタリング（治療域; 0.8~2 ng/ml）を必要とする薬物である。現在、検査機関ではその測定を免疫学的測定法によっているが、用いる抗体の特異性から代謝物を同時に量り込んでいる場合が多い。特に、生体内にはジゴキシニン様免疫反応性物質の存在も示唆されており正しい値の把握は難しい。LC/MS によるジゴキシニン及び関連配糖体の定量の試みもなされている。すなわち、ISP-MS を用い移動相に HCOONH₄ を添加、[M+NH₄]⁺ イオンをモニタリングすることで 0.15 ng/ml の α-, β-アセチルジギトキシニンの検出が可能と報告されている⁸⁶⁾。本定量法は実試料（植物による中毒者血清）にも適用され、RIA に比べて感度の点では劣るものの抽出のみで測定可能なことから、選択性に優れるとされている。なお、IS としてはほかの強心配糖体を用いている。また、強心性ステロイドであるウワバゲニンを対象としてその水酸基を ω-シアノウンデカノイル化することで、LC/ISP-MS で約 100 倍の感度上昇が観測されているが、標品を用いての研究である⁸⁷⁾。

植物成長促進物質であるブラシノステロイドはピシナールジオール構造を有しているが、蒲生らはこの点に着

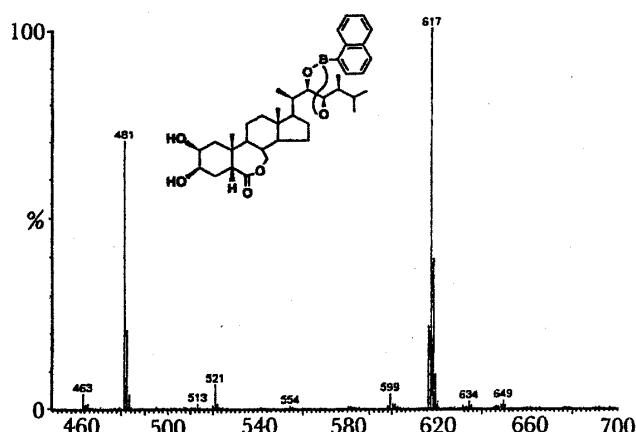


Fig. 5 Positive ion APCI-MS spectrum obtained from 4.8 ng of brassinolide naphthaleneboronate

目し, 標品を各種ボロネートに誘導し感度を比較検討した (Fig. 5)⁸⁸⁾. その結果, LC/ESI-MS においてナフタレンボロネートが有用であったが, GC/MS でもはん用されている誘導体化法であり, その安定性ととも注目される. 昆虫変態ホルモンであるエクジステロイドに関する LC/APCI-MS の報告もなされている⁸⁹⁾. 本法は SIM 分析において GC/MS に匹敵する感度を示しているが, 誘導体化を必要としないことを利点として挙げており, ブラシノステロイドの例と対比される.

なお, 代表的な女性ホルモンであるエストロゲンに関しては, 標品を用いた検討がなされている程度であるが (3 節参照), 著者らはラット脳内エストロンの検索へ適用し, LC/APCI-MS の負イオン検出及びメチルオキシム化が有用なことを明らかとしている⁹⁰⁾. エストロゲンは老人性痴ほう (呆) 薬としても注目されており, 今後の発展が期待される.

9 結 語

以上, ステロイドの LC/MS を紹介してきたが, 本法は遊離型の分析では感度面で GC/MS などに及ばないものの, 抱合体や熱に不安定なステロイドのそれでは威力を発揮しており, そのはん用性, 情報量の豊富さなどから今後ますます重要視されるであろう. 分析化学の研究上, 最先端の機器を有するか否かが研究の質を左右すると言っても過言ではなく, 比較的廉価な LC/MS の開発も進んでおり, 各研究室に常備される日も遠くないであろう. 本機器の今後の課題として GC/MS, キャピラリー GC に匹敵する高感度化, 高分離能, 高情報量の提供の達成などがあるが, 機器は研究者が使いこなして初めて価値が出るものであり, ハード面の進歩を待つだけで

はなく, イオン化法に適した誘導体化の工夫など分析化学者としてやるべきことは多い⁹¹⁾.

ステロイドが人類にいかに関与したかは, 数多くのステロイド系医薬品を見れば明らかである. さらに最近, ステロイドのアロマトラーゼ阻害剤⁹²⁾, 抗骨粗鬆症薬⁹³⁾, 抗老人性痴呆薬⁹⁴⁾としての可能性が示唆されており, 新しい分野として注目されている. しかし, すべての科学は「何が」, 「どこに」, 「どれだけ」が分かって初めてスタートする. これらが薬となるか否かも, LC/MS を含む各種の優れた分析法の開発にかかっているとんでも過言ではなく, ステロイドと LC/MS の研究がますます発展することを祈念して止まない.

なお最後に, 現在までに知られているステロイドの LC/MS に関する総説を付記しておく⁹⁵⁾.

本総説中, 著者らの研究は文部省科学研究費の補助を受けたものである.

文 献

- 1) L. F. Fieser, M. Fieser: "Steroids", (1959), (Reinhold Publishing Co., New York).
- 2) H. L. J. Makin, D. B. Gower, D. N. Kirk: "Steroid Analysis", (1995), (Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras).
- 3) S. Scalia: *J. Chromatogr. B*, **671**, 299 (1995).
- 4) P. Volin: *J. Chromatogr. B*, **671**, 319 (1995).
- 5) E. B. Hoving: *J. Chromatogr. B*, **671**, 341 (1995).
- 6) E. Venturelli, A. Cavalleri, G. Secreto: *J. Chromatogr. B*, **671**, 363 (1995).
- 7) 日本臨牀社編: "合成ステロイドホルモン", 日本臨牀, **52**, p. 642 (1994), (日本臨牀社).
- 8) 上野民夫, 平山和雄, 原田健一編: "現代化学増刊 31, バイオリジカルマスマスペクトロメトリー", p. 3 (1997), (東京化学同人).
- 9) 坂入 実: "LC/MS の実際, 天然物の分離と構造決定", 原田健一, 岡 尚男編, p. 57 (1996), (講談社).
- 10) J. R. Chapman: "有機質量分析法", 土屋正彦, 田島 進, 平岡賢三, 小林憲正訳, p. 75 (1995), (丸善).
- 11) R. M. Whittal, L. M. Russon, L. Li: *J. Chromatogr. A*, **794**, 367 (1998).
- 12) A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi: *Anal. Chem.*, **66**, 4557 (1994).
- 13) D. Watson, G. W. Taylor, S. Murray: *Biomed. Mass Spectrom.*, **12**, 610 (1985).
- 14) D. Watson, G. W. Taylor, S. Murray: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **13**, 65 (1986).
- 15) D. J. Liberato, A. L. Yergey, N. Esteban, C. E. Gomez-Sanchez, C. H. L. Shackleton: *J. Steroid Biochem.*, **27**, 61 (1987).
- 16) Y. Kobayashi, K. Saiki, F. Watanabe: *Biol. Pharm.*

- Bull.*, **16**, 1175 (1993).
- 17) A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion: *Anal. Chem.*, **59**, 2642 (1987).
 - 18) C. H. L. Shackleton: *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **45**, 127 (1993).
 - 19) S. Murray, N. B. Rendell, G. W. Taylor: *J. Chromatogr. A*, **738**, 191 (1996).
 - 20) L. D. Bowers, Sanaullah: *J. Chromatogr. B*, **687**, 61 (1996).
 - 21) J. van der Greef, A. C. Tas, M. A. H. Rijk, M. C. ten Nover de Brauw, M. Höhn, G. Meyerhoff, U. Rapp: *J. Chromatogr.*, **343**, 397 (1985).
 - 22) C. H. L. Shackleton, C. Kletke, S. Wudy, J. H. Pratt: *Steroids*, **55**, 472 (1990).
 - 23) 中島正晴, 若林広行, 大和 進, 嶋田健次: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 517 (1996).
 - 24) K. A. Bean, J. D. Henion: *J. Chromatogr. B*, **690**, 65 (1997).
 - 25) D. Barrón, J. Barbosa, J. A. Pascual, J. Segura: *J. Mass Spectrom.*, **31**, 309 (1996).
 - 26) Y. -S. Chang, J. -S. Jang, B. Chung: *Anal. Lett.*, **29**, 1389 (1996).
 - 27) W. M. Mück, J. D. Henion: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **19**, 37 (1990).
 - 28) S. M. R. Stanley, S. Kent, J. P. Rodgers: *J. Chromatogr. B*, **704**, 119 (1997).
 - 29) L. O. G. Weidolf, E. D. Lee, J. D. Henion: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **15**, 283 (1988).
 - 30) 湊 宏一, 竹川恵弘, 小泉直之, 塚本國雄, 本間誠次郎: 薬学雑誌, **113**, 781 (1993).
 - 31) 島田和武: 薬学雑誌, **117**, 681 (1997).
 - 32) K. Shimada, Y. Mukai, A. Nakajima, Y. Naka: *Anal. Commun.*, **34**, 145 (1997).
 - 33) K. Shimada, Y. Mukai, K. Yago: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **21**, 765 (1998).
 - 34) K. Shimada, Y. Mukai: *J. Chromatogr. B*, **714**, 153 (1998).
 - 35) 杉 和人, 井津源市, 橋本 豊: 質量分析, **46**, 57 (1998).
 - 36) E. Houghton, M. C. Dumasia, J. K. Wellby: *Biomed. Mass Spectrom.*, **8**, 558 (1981).
 - 37) J. A. Apffel, U. A. Th. Brinkman, R. W. Frei, E. A. I. M. Evers: *Anal. Chem.*, **55**, 2280 (1983).
 - 38) F. R. Sugnaux, D. S. Skrabalak, J. D. Henion: *J. Chromatogr.*, **264**, 357 (1983).
 - 39) C. Eckers, J. D. Henion, G. A. Maylin, D. S. Skrabalak, J. Vessman, A. M. Tivert, J. C. Greefield: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **46**, 205 (1983).
 - 40) S. J. Gaskell, K. Rollins, R. W. Smith, C. E. Parker: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **14**, 717 (1987).
 - 41) D. Watson, G. W. Taylor, S. Laird, G. P. Vinson: *Biochem. J.*, **242**, 109 (1987).
 - 42) N. V. Esteban, A. L. Yergey, D. J. Liberato, T. Loughlin, D. L. Loriaux: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **15**, 603 (1988).
 - 43) S. -J. Park, Y. -J. Kim, H. -S. Pyo, J. Park: *J. Anal. Toxicol.*, **14**, 102 (1990).
 - 44) N. Shindo, N. Yamauchi, K. Murayama, A. Fairbrother, S. Krolik: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 171 (1990).
 - 45) J. Paulson, C. Lindberg: *J. Chromatogr.*, **554**, 149 (1991).
 - 46) S. Steffenrud, G. Maylin: *J. Chromatogr.*, **577**, 221 (1992).
 - 47) H. Shibasaki, T. Furuta, Y. Kasuya: *J. Chromatogr. B*, **692**, 7 (1997).
 - 48) C. S. Creaser, S. J. Feely, E. Houghton, M. Seymour: *J. Chromatogr. A*, **794**, 37 (1998).
 - 49) N. V. Esteban, A. L. Yergey: *Steroids*, **55**, 152 (1990).
 - 50) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii, M. Goto: *J. Chromatogr.*, **346**, 161 (1985).
 - 51) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii, M. Goto, T. Mizuno: *J. Chromatogr.*, **358**, 201 (1986).
 - 52) J. E. Evans, A. Ghosh, B. A. Evans, M. R. Natowicz: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 331 (1993).
 - 53) Y. Yang, W. J. Griffiths, H. Nazer, J. Sjövall: *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 240 (1997).
 - 54) K. D. R. Setchell, C. H. Vestal: *J. Lipid Res.*, **30**, 1459 (1989).
 - 55) C. Eckers, N. J. Haskins, T. Large: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18**, 702 (1989).
 - 56) C. Eckers, P. B. East, N. J. Haskins: *Biol. Mass Spectrom.*, **20**, 731 (1991).
 - 57) B. M. Warrack, G. C. DiDonato: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 101 (1993).
 - 58) A. Roda, A. M. Gioacchini, C. Cerrè, M. Baraldini: *J. Chromatogr. B*, **665**, 281 (1995).
 - 59) S. Ikegawa, N. Murao, T. Motoyama, T. Yanagihara, T. Niwa, J. Goto: *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 313 (1996).
 - 60) S. Ikegawa, T. Yanagihara, N. Murao, H. Watanabe, J. Goto, T. Niwa: *J. Mass Spectrom.*, **32**, 401 (1997).
 - 61) 後藤順一, 村尾尚昭, 池川繁男: 臨床化学, **26**, 215 (1997).
 - 62) J. Goto, N. Murao, J. Oohashi, S. Ikegawa: *Steroids*, **63**, 180 (1998).
 - 63) J. Goto, N. Murao, C. Nakada, T. Motoyama, J. Oohashi, T. Yanagihara, T. Niwa, S. Ikegawa: *Steroids*, **63**, 186 (1998).
 - 64) T. Adachi, M. Nishio, N. Yunoki, Y. Ito, H. Hayashi: *Anal. Sci.*, **10**, 457 (1994).
 - 65) D. Watson, K. D. R. Setchell, R. Ross: *Biomed. Chromatogr.*, **5**, 153 (1991).
 - 66) D. Vicchio, A. Yergey, K. O'Brien, L. Allen, R. Ray, M. Holick: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 53 (1993).
 - 67) M. Ishigai, Y. Ishitani, K. Kumaki: *J. Chromatogr. B*, **704**, 11 (1997).
 - 68) M. Ishigai, Y. Asoh, K. Kumaki: *J. Chromatogr. B*, **706**, 261 (1998).
 - 69) 松崎和恵, 溝奥康夫, 鈴木 隆, 木村寛三: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 537 (1996).
 - 70) K. Shimada, K. Mitamura, I. Nakatani: *J. Chromatogr. B*, **690**, 348 (1997).

- 71) K. Shimada, Y. Kamezawa, K. Mitamura: *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 596 (1997).
- 72) A. Shimoyamada, S. Tomiyama, M. Shimizu, K. Yamamoto, S. Kunii, S. Yamada: *Biochim. Biophys. Acta*, **1346**, 147 (1997).
- 73) R. J. Vreeken, M. Honing, B. L. M. van Baar, R. T. Ghijzen, G. J. de Jong, U. A. Th. Brinkman: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 621 (1993).
- 74) B. Yeung, P. Vouros, G. S. Reddy: *J. Chromatogr.*, **645**, 115 (1993).
- 75) B. Yeung, P. Vouros, M. -L. Siu-Caldera, G. S. Reddy: *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1099 (1995).
- 76) K. Mitamura, Y. Nambu, M. Tanaka, A. Kawanishi, J. Kitahori, K. Shimada: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **22**, 367 (1999).
- 77) S. R. Wilson, Q. Lu, M. L. Tulchinsky, Y. Wu: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 664.
- 78) K. Wang, P. P. Davis, T. Crews, L. Gabriel, R. W. Edom: *Anal. Biochem.*, **243**, 28 (1996).
- 79) A. Kuksis, J. J. Myher, L. Marai, J. A. Little, R. G. McArthur, D. A. K. Roncari: *Lipids*, **21**, 371 (1986).
- 80) A. Kuksis, L. Marai, J. J. Myher: *Lipids*, **26**, 240 (1991).
- 81) C. H. L. Shackleton, S. Reid: *Clin. Chem.*, **35**, 1906 (1989).
- 82) A. Takatsu, S. Nishi: *Anal. Chem.*, **60**, 2237 (1988).
- 83) A. Takatsu, S. Nishi: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 247 (1993).
- 84) M. Careri, D. Ferretti, P. Manini, M. Musci: *J. Chromatogr. A*, **794**, 253 (1998).
- 85) G. J. van Berkel, J. M. E. Quirke, R. A. Tigani, A. S. Dilley, T. R. Covey: *Anal. Chem.*, **70**, 1544 (1998).
- 86) A. Tracqui, P. Kintz, B. Ludes, P. Mangin: *J. Chromatogr. B*, **692**, 101 (1997).
- 87) N. Zhao, J. -S. Guo, L. -C. Lo, N. Berova, K. Nakanishi, G. T. Hauptert, M. Warrack, A. A. Tymiak: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1997**, 43.
- 88) 蒲生啓司, M. C. Prescott, L. J. Goad, 高津戸秀: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 523 (1996).
- 89) G. Wainwright, M. C. Prescott, L. O. Lomas, S. G. Webster, H. H. Rees: *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **35**, 21 (1997).
- 90) 矢後謙一郎, 城山美穂, 三田村邦子, 島田和武: 日本薬学会第 118 年会講演要旨集 4, p. 69 (1998).
- 91) 三田村邦子, 島田和武: 薬学雑誌, **118**, 206 (1998).
- 92) 沼澤光輝: 薬学雑誌, **118**, 539 (1998).
- 93) 本庄英雄: “更年期・老年期外来マニュアル”, p. 24 (1993), (金芳堂).
- 94) 本庄英雄, 岩佐弘一, 卜部 諭: 産婦人科の実際, **46**, 1317 (1997).
- 95) 平林尚之, 松木容彦: 秦野研究所年報, **17**, 7 (1994).

要 旨

ステロイドの高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) について主なステロイド別に総説した。LC/MS は、誘導体化を要しない生体内ステロイド分析法として有望視されており、特に抱合体のそれでは威力を発揮している。しかし、遊離型ステロイドと比較すると、感度の面ではガスクロマトグラフィー/MS (GC/MS) より劣り、ハード面の進歩だけでなく誘導体化などの工夫を要する。主なイオン化法やステロイドの分析法についても概説した。