

ステロイド類の分析における 誘導体化手順と負イオン化学イオン化 GC/MS/MS 分析条件

アプリケーションノート

臨床化学

著者

Anthony Macherone, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road,
Wilmington, DE 19808
USA

概要

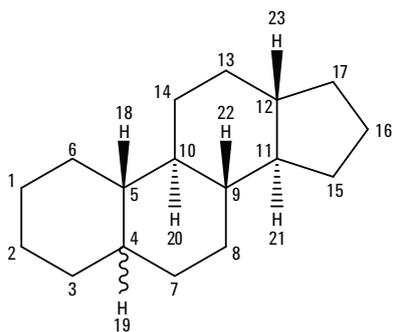
このアプリケーションノートでは、電子捕獲負イオン化学イオン化質量分析におけるステロイド類の測定を円滑化するのに必要な誘導体化手順と、感度および選択性の高い分析を実現するための GC/MS/MS 条件を紹介します。

はじめに

ステロイドは、動物や植物、菌類に幅広く存在し、エストロゲン、アンドロゲン、プレグナン、コラン、コレスタン、コルチコステロイド、鉱質コルチコイドといった少なくとも7種に分類されます。生物系において、ステロイドは、同化、代謝調節、免疫調節、性発達、妊娠制御などのホルモン活性および神経調節活性をもちます。ヒトの場合、ステロイドの生合成にあたっては、まず2つのファルネシルピロリン酸分子の NADPH 還元によりスクアレンが生成されたのち、2段階の酵素的還元によりステロイド前駆体のラノステロールが生成されます。数百種類にのぼる既知のステロイドのすべてが、基本となるパーヒドロシクロペンタフェナントレン骨格を中心に構築されたものです。ステロイドには、妊娠調節、成長促進、ホルモン補充療法など、医療的に認められた多くの用途があります。また、乳がんや高血圧におけるエストロゲン異常の調節など、疾病のバイオマーカーとしてモニタリングすることもできます (Macherone ほか、2010)。しかし、ステロイドの用途としては、人気スポーツでのドーピング管理での適用の方が、一般には広く知られています。このように、生物学上の天然物質としての重要性が高く、適切な用途と不適切な乱用が存在していることから、ステロイド類の分析には大きな関心が寄せられています。ステロイドに対する関心は、臨床的なものや法医学上のものから、新たな汚染物質や、環境、植物相および動物相に対するその影響まで、多岐にわたります。こうした多様な研究分野にまたがる幅広い関心を受け、このアプリケーションノートでは、負イオン化学イオン化ガスクロマトグラフ/トリプル四重極質量分析による複数のエストロゲンおよびアンドロゲンの分析に求められている誘導体化手順と機器条件を紹介します。



Agilent Technologies



(8*S*,9*R*,10*S*,13*S*,14*R*)-ヘキサデカヒドロ-1*H*-シクロペンタ[*a*]フェナントレン

図 1. ステロイドのパーヒドロシクロペンタフェナントレン骨格

実験手法

背景

エストロゲンとアンドロゲンの違いは、ステロイド骨格の炭素 2、16、17 における官能基と、各成分に固有の炭素原子数です。これらの誘導体化をおこなうためには、分析手法を考慮する必要があります。たとえば、電子イオン化と化学イオン化質量分析のどちらを用いたガスクロマトグラフィーマETHODを開発すべきか、どのモードの質量分析 (シングル四重極での SIM や

SIS などのシングルステージか、トリプル四重極の SRM か) を用いるべきか、といった点が考慮点となります。このアプリケーションノートでは、負イオン化学イオン化ガスクロマトグラフ/トリプル四重極質量分析 (NCI-GC/MS/MS) を用いた分析を説明するため、負イオン化学イオン化の主要メカニズムである電子捕捉に対応できる誘導体化物を合成する必要があります。分析対象物の基本的な化学構造にフッ素などの電気陰性度の高い原子を付加する選択的手順を用いれば、そうした誘導体化分析が可能です。

エストロゲンは 18 個の炭素で構成され、炭素 2 がフェノール性水酸基、炭素 16 および 17 が水酸基かケトン基、または他の基により置換されています。アンドロゲンは 19 個の炭素で構成され、炭素 2 がケトン基、炭素 17 が水酸基またはケトン基に置換されています。合成化学的な観点から見ると、アルコールとフェノールはエステル化に対応するのに対して、ケトンは安定したオキシムを容易に形成します。エステル化またはオキシム化によりフッ素を分子に添加するための試薬としては、それぞれペンタフルオロベンゾイルクロリド (PFBCl) とペンタフルオロベンゾイルヒドロキシルアミン塩酸塩 (PFBHA) が市販されています。これらの試薬を用いた誘導体化生成物の代表例を図 2 に示しています。

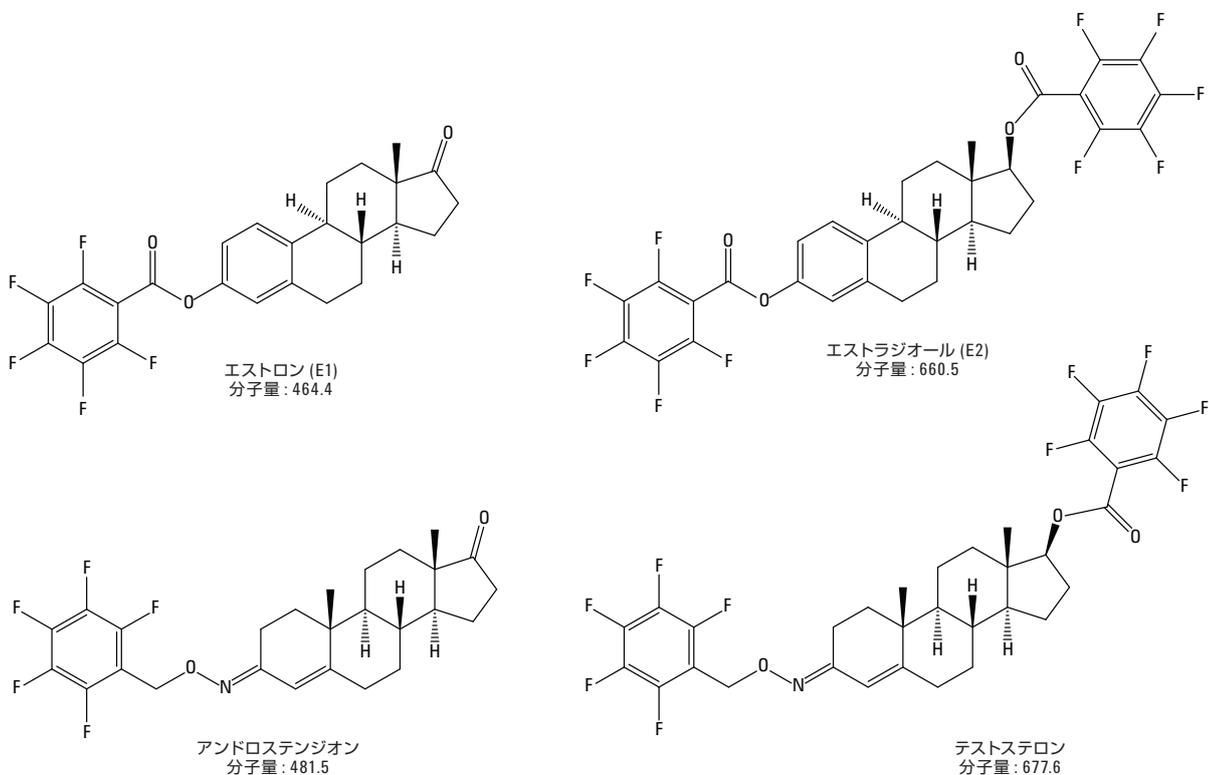


図 2. 誘導体化生成物の代表例

誘導体化手順

酸塩化物を用いたフェノールとアルコールのエステル化は、求核アシル置換反応メカニズムにより生じます。反応を効率的にするためには、溶媒の特性と、離脱基の塩基性という2点を考慮する必要があります。酸塩化物は、水の存在の影響を強く受けます。そのため、無水性、極性かつ非プロトン性の溶媒を使用すると同時に、三級アミンの塩基により、塩化物イオンを取り除き、平衡反応を誘導体化生成物が生成するように促進させることが必要となります。

ケトンのオキシム化は、もっと複雑なイミン型のメカニズムにより進行します。反応速度は pH を調整することにより最適化することができます。一般的なメカニズムでは、まずペンタフルオロベンゾイルヒドロキシアミンの窒素をケトンに求核的に付加したのち、プロトン化と脱水によりオキシムを生成します。極性のある非プロトン性溶媒により、荷電した中間物質を安定化させることができます。また、PFBHA を完全に溶解させるために、濃縮した三級アミンの塩基を使用します。

上述の点を考慮し、以下の誘導体化手順を開発しました。

1. 抽出物を乾燥させるために、ペンタフルオロベンゾイルクロリド/無水酢酸エチル (1 %; v/v) 1.0 mL を添加
2. 無水ピリジン 100 μ L を添加
3. 60 °C で 30 分間インキュベーション
4. 0.5 M NaHCO₃ 溶液 0.5 mL を添加し、攪拌
5. 5 分間遠心分離
6. 有機層をアジレントのサンブラバイアル (p/n 5183-2073) に移す
9. 50 °C の窒素気流下で蒸発させる
10. 部分的に誘導体化したサンプルを乾燥させるために、ピリジン中 0.1 % (wt/v) ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン HCl 100 μ L を添加
11. 60 °C で 30 分間インキュベーション
12. 50 °C の窒素気流下で乾燥させる
13. ドデカンまたはイソオクタン 50 μ L で各試験管のサンプルを再溶解し、30 秒間攪拌

GC/MS/MS 分析

すべての分析は、Agilent 7890A ガスクロマトグラフと Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MS システムを用いておこないました。Agilent 7890A GC には、15 m Agilent J&W DB-17ht にパージ付きユニオンと呼ばれる圧力制御モジュール (PCT) を備えたものです。接続カラムには、1 m Agilent J&W DB-17ht を装着しました。このカラム構成により、分析開始後 9 分から、分析中にバックフラッシュすることができます。これには、以下のような利点があります。

- 分析後にキャリアガスをカラムの逆流させることにより、重いマトリックスを効率的に除去
- リテンションタイムおよびカラム分離精度が大きく向上
- カラム寿命を延ばし、長期にわたってイオン源をクリーンに維持

Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MS は、負イオン化学イオン化 (NCI) モードで使用しました。すべての分析対象物について、選択反応モニタリング (SRM) の測定時試薬ガスとしてメタンを使用しました。SRM トランジションは参照標準から実験的に開発し、各分析で最適なプリカーサ/プロダクトイオンを特定しました。コリジョンセルエネルギーは、最高のイオン強度が得られるように、それぞれの分析で固有の SRM トランジションに応じて最適化しました。GC/MS/MS 条件を表 1 に、この条件下における誘導体化物質のリテンションタイムを表 2 に示しています。各分析対象物について最適化した SRM トランジションを表 3 に示しています。

表 1. GC/MS/MS 条件
条件

GC 分析条件	
カラム	カラム 1: Agilent J&W DB-17ht 0.18 mm x 1 m, 0.1 μ m カラム 2: Agilent J&W DB-17ht 0.18 mm x 15 m, 0.1 μ m キャピラリー・フロー・テクノロジー (CFT) デバイス: Purged Ultimate Union
注入モード	バルストスプリットレス、40 psi、0.9 分
注入温度	280 °C
プログラム	
注入量	2 μ L
キャリアガス	カラム 1: ヘリウム、コンスタントフローモード、1.0 mL/min、9 分、その後 99 mL/min ~ -15.05 mL/min (2 psi、オープン 295 °C) カラム 2: ヘリウム、コンスタントフローモード、1.2 mL/min
オープンプログラム	205 °C で 1 分 その後 10 °C/min で 295 °C まで、0 分 その後 2.5 °C/min で 305 °C まで、0 分
トランスファーライン温度	290 °C
MS 条件	
チューン	オートチューン
ゲインファクター	100
化学試薬ガス	メタン、40 % (2.0 mL/min)
採取パラメータ	負イオン化学イオン化、 選択反応モニタリング (SRM)
コリジョンガス	窒素、1.5 mL/min、 ヘリウムクエンチガス 2.25 mL/min
MS 温度	イオン源 150 °C、四重極 150 °C

結果と考察

生体内では、エストラジオール (E2) はきわめて低濃度で存在しており、特に閉経後の女性ではさらに濃度が低くなります。一般に、定量下限は 1 pg/mL または 1 fg/μL です。そのため、E2 の分析には最高の分析感度が求められ、メソッド全体の感度の指標としても利用できます。この目的で、10-pg/mL の E2 標準を 8 回繰り返し注入し、シグナルの高さとエストラジオールデータ採取チャンネルにおける 0.2 分以上のノイズをもとに、根二乗平均 (RMS) のアルゴリズムを用いて、441 という平均シグナル/ノイズ比 (S/N) を算出しました。また、10-pg/mL の E2 標準を 8 回繰り返し注入し、絶対面積カウンットの % 相対標準偏差 (RSD) として、3.7 % という値を算出しました。さらに、面積カウンットの % 相対標準偏差 (RSD) として、3.0 % という値を算出しました。以上のことから、機器検出下限は、以下の方程式で算出できます [3]。

方程式 1. IDL

$$IDL = (t_{\alpha})(\%RSD)(標準の量)/100$$

t_{α} : スチューデント t 分布表に見られる統計的信頼係数

99 % の信頼度の場合、自由度 $r-1$ の t_{α} 値は 2.998 になります。これを方程式 1 に代入すると、次のようになります。

$$(2.998)(3.7\%)(10 \text{ pg/mL})/100 = 1.1 \text{ pg/mL}$$

表 4 に、IDL 測定の未処理データを示しています。

図 3 は、8 回繰り返し注入の絶対面積カウンットと、RMS シグナル/ノイズ比 (S/N) を示しています。ノイズ領域は 10.85 分から 11.35 分までです。図 4 は、0.5 pg/mL から 250 pg/mL までの検量線を示しています。決定係数は 0.998 です。

表 2. 分析対象物とリテンションタイム

化合物名	リテンションタイム
エストロン	8.960
アンドロステンジオン	9.179
DHT 異性体 1	11.353
DHT 異性体 2	11.493
エストラジオール	11.831
テストステロン	11.978

表 3. 時間区分、SRM トランジション、ドウェルタイム、衝突エネルギー

時間区分 (TS)	TS 開始 時間	化合物名	プリカーサク	プロダクト	ドウェル	CE
1	8.62	エストロン	464	400	250	10
2	9.08	アンドロステンジオン	461	431	250	10
3	11.07	DHT 異性体 1	679	659	125	10
		DHT 異性体 2	679	629	125	10
4	11.45	エストラジオール	660	596	250	10
5	11.90	テストステロン	677	657	125	8
		テストステロン	677	627	125	7

表 4. IDL 測定の未処理 E2 データ

エストラジオール	
注入回数	面積
1	22263
2	22194
3	21101
4	20603
5	22590
6	22988
7	21420
8	21634
平均	21849
標準偏差	800
% RSD	3.7

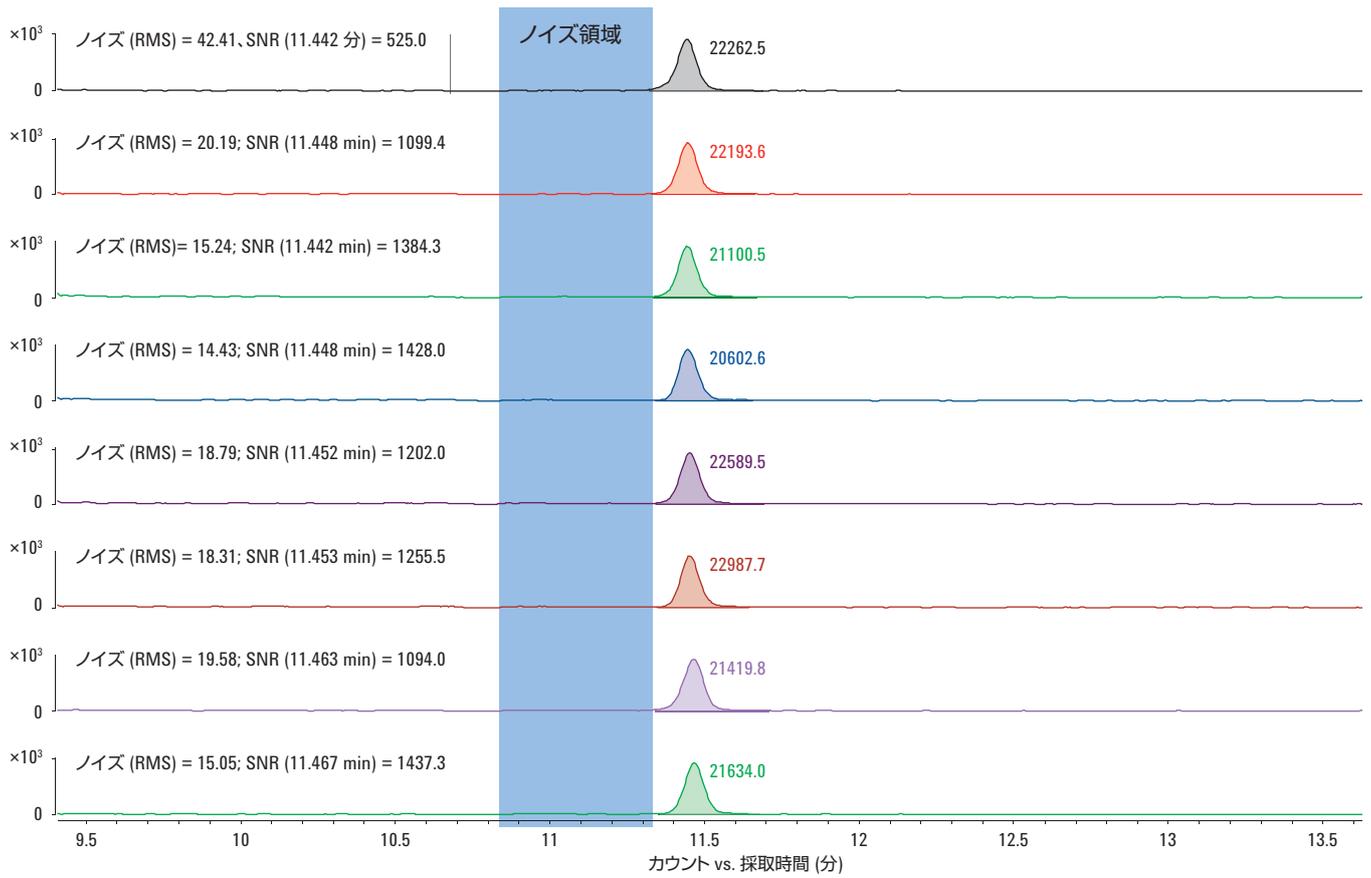


図 3.8 回繰り返し注入のクロマトグラム

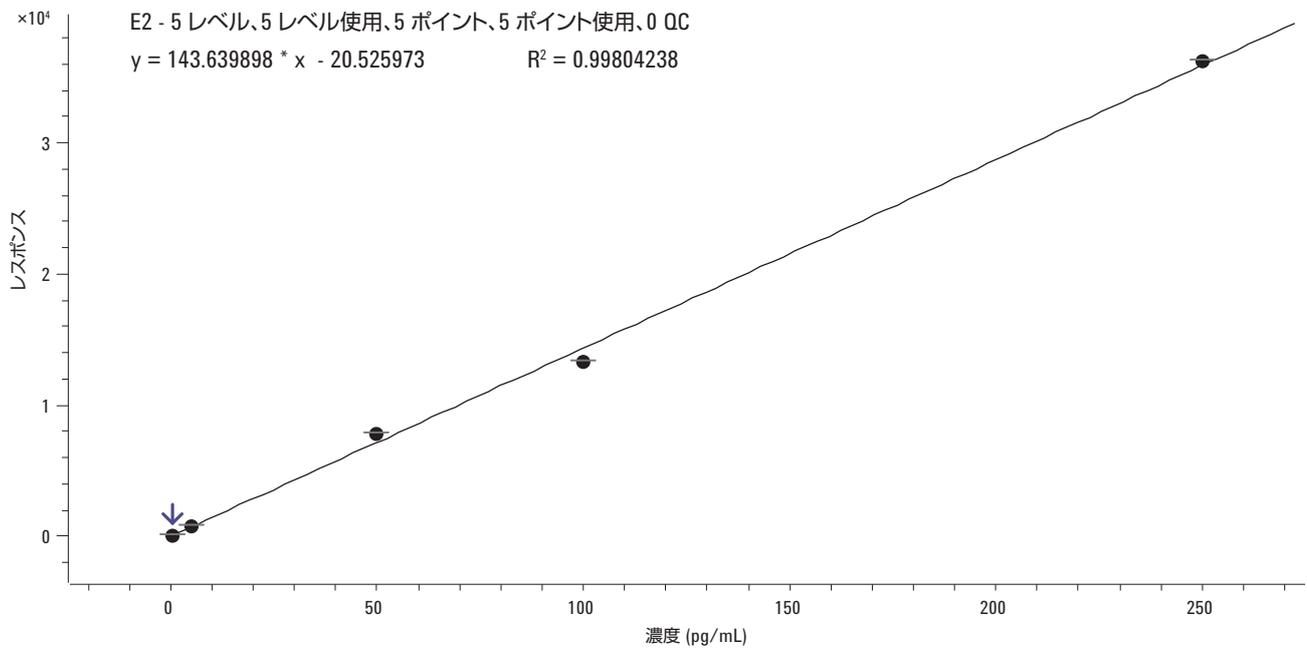


図 4. エストラジオールの検量線

まとめ

各種のマトリクスに含まれるステロイド類の正確かつ高感度の測定は、疾病のバイオマーカーとしてのこれらの化合物の特性や、生体内外での帰結や移動を理解するうえできわめて重要となります。このアプリケーションノートでは、電子捕獲負イオン化学イオン化メカニズムに対応できる形にステロイド類を修飾するための誘導体化手順を紹介しています。また、1 pg/mL以下のIDLで高感度かつ堅牢な分析をおこなうのに必要なGC/MS/MS条件も提示しています。ここで紹介する誘導体化手順は、血清や血漿以外のマトリクスにも対応できるため、廃水、土壌、生物固体などの環境分析にも拡大することができます (Churley ほか、2011)。このGC/MS/MS分析メソッドは、分析物の由来や研究者の習熟度にかかわらず、さまざまなサンプルに適用することが可能です。

参考文献

1. M. Churley, A. Macherone, and R. White, "Analysis of estrone and 17 β -estradiol in ground water by GC-NCI-MS/MS", 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO June 5 – June 8, 2011.
2. A. Macherone, M. Churley, and R. White, "Ultra-low Detection of Estrogenic Compounds by GC-NCI/MS/MS", (2010) LC/GC Special Issues, Advanstar Communications, Inc.
3. G. Wells and H. Prest, 「シグナルノイズ比は質量分析計の性能指標として合理的か?」, (2011) アジレント資料 5990-8341JAJP, Agilent Technologies, Santa Clara, CA.

詳細情報

本書に記載のデータは一般的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan

May 22, 2012

5990-9478JAJP



Agilent Technologies