

質量分析法を基盤とする Targeted Steroidomics 解析法

山下 幸和

Targeted Steroidomics Analysis Based on the Use of Mass Spectrometry

Kouwa YAMASHITA

(Received November 20, 2010)

はじめに

ヒトゲノムの完全解析を期に, ゲノムから派生するトランスクリプトームやプロテオームのように RNA や翻訳タンパクの網羅的解析が試みられてきた. タンパクの分析は, 核酸のように増幅できるわけではないが, 構成アミノ酸は約 20 種で, タンパク質間の存在する量のレンジは大きいものの, 質量分析法の進歩に伴って, タンパク質をそのまま MS に導入して解析する方法と, タンパク質をペプチドに断片化した後, MS に導入して配列解析を行う, いわゆるショットガンプロテオミクスで分析されている.^{1,2)} 分析結果を, タンパクのリン

酸化などの翻訳後修飾は別としても, ゲノム情報に基づくアミノ酸配列の情報データベースと照合しながら解析可能となってきた.

近年, ステロイド, プロスタノイド, アシルグリセリド, リン脂質, 糖脂質, 遊離脂肪酸など一連の脂質についても, metabolomics 解析の対象として注目され, 特にステロイドでは steroidomics 解析の重要性が提唱されている.^{3,4)} しかしながら, 脂質関連の物質は, 極めて分子多様性に富むことから, 質量分析によるプロテオーム解析の基本となるペプチド配列分析のような, 画一的な手法を構築することは困難であるため, 各分子種ごと, それらが

Table 1. Diagnostic ratios for differential diagnosis of inborn errors of steroidogenesis and steroid metabolism (ref. 19, 一部改変)

Enzyme defect (<i>Gene</i>)	Diagnostic ratio
21-Hydroxylase deficiency (<i>CYP21A2</i>)	17OHP / (THE + THF + 5 α THF) PT / (THE + THF + 5 α THF) PTONE / (THE + THF + 5 α THF)
11 β -Hydroxylase deficiency (<i>CYP11B1</i>)	THS / (THE + THF + 5 α THF)
17 β -Hydroxylase deficiency (<i>CYP17A1</i>)	(THA + 5 α THA + THB + 5 α THB) / (THE + THF + 5 α THF) (THA + 5 α THA + THB + 5 α THB) / (A + Et)
3 β -Hydroxylase deficiency (<i>HSB3B2</i>)	DHEA / (THE + THF + 5 α THF) 5PT / (THE + THF + 5 α THF)
P450 oxidoreductase deficiency (<i>POR</i>)	(17OHP + PT) / (A + Et) (17OHP + PT) / (THE + THF + 5 α THF) PD / (THE + THF + 5 α THF) 5PD / (THE + THF + 5 α THF) (THA + 5 α THA + THB + 5 α THB) / (THE + THF + 5 α THF)
Apparent mineral corticoid excess (<i>HSD11B2</i>)	F/E (THF + 5 α THF) / THE Cortols/cortolones (F + E) / (THE + THF + 5 α THF)
Apparent cortisone reductase deficiency (ACRD) (<i>H6PDH</i>)	THE / (THF + 5 α THF) Cortolones/cortols
5 α -Reductase deficiency (<i>SRD5A2</i>)	Et/A THB/5 α THB THF/5 α THF
17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency (<i>HSD17B3</i>)	(A + Et) / (THE + THF + 5 α THF)

Abbreviations: A: androsterone, Et: etiocholanolone, DHEA: dehydroepiandrosterone, F: cortisol, E: cortisone, 5PT: pregnenetriol (Δ^5), 5PD: pregnenediol (Δ^5), PT: pregnanetriol, PD: pregnenediol, PTONE: pregnanetriolone, 17OHP: 17 α -hydroxyprogesterone, THA: tetrahydro-A, THB: tetrahydro-B, 5 α THA: allotetrahydro-A, 5 α THB: allotetrahydro-B, THE: tetrahydro-E, THF: tetrahydro-F, 5 α THF: allotetrahydro-F, THS: terahydro-S

属するグループの化学構造にふさわしい抽出、分析手段と解析法の構築が必要である。また、各グループ内では、病態や生理機能に直接関与する分子種のみならず、その分子種が位置する上流や下流の代謝物を網羅的に精査することも、生体機能の病態の状況を探る目的で重要となっている。ステロイドの分野におけるマーカーの一例を Table 1 に示した。⁵⁾

個々のステロイド分子の生体濃度のレンジは広く、かつ微量であるため、これらの網羅的分析にはガスクロマトグラフィー-質量分析 (gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) 法が用いられてきた。⁶⁻¹¹⁾ GC-MS 法でステロイド分子の微量定量を行う場合、固有の官能基を揮発性、熱安定性に優れた誘導体に導く必要があり、誘導体の選択の良否が、分析の特異性と迅速性を大きく左右する。特に、水酸基に揮発性と熱安定性を付与する目的で、trimethylsilylimidazole や N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide のシリル化剤として用い、トリメチルシリル (TMS) エーテル誘導体化が EI-イオン化法を用いた GC-MS 法によるステロイド分析において一般的である。しかしながら、TMS エーテル誘導体は、化学的に安定性に乏しく、また電子衝撃 (EI)-マススペクトル法において、分子イオンから TMS 分子が脱離した断片イオンが低質量域に出現するケースが多い。ステロイドにおいて選択イオン検出 (selected ion monitoring: SIM) 法を高感度で定量を行うためには、相対強度の大きいイオンを分子イオン近傍の高質量域に存在するような誘導体を選択することが望ましく、種々の誘導体が開発され、¹²⁻¹⁸⁾ ステロイドの代謝マッピングの作成や先天性代謝異常の診断に貢献してきており、現在その有用性が新たに見直されている。¹⁹⁾ 一方、GC-MS 法では、カラムに高い温度がかかるため、誘導体化を工夫しても、熱分解等によって検出できない分子種も多数あると推定される。

また、1990 年代後半から、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) や大気圧化学イオン化 (APCI)、大気圧光イオン化 (APPI) プロブの開発と高感度化により、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)-MS も実用化段階に入り、揮発性に乏しく、熱に不安定なステロイドを含めて、GC-MS と同等な感度で測定できるようになってきた。しかし、ステロイド分子の骨格、官能基等の違いによって、検出感度は各々異なり、十分な感度が得られない場合も少なくなく、近年では、HPLC-MS を用いてステロ

イド分子を高感度で測定するための手段として、誘導体調製が積極的に取り入れられつつあり、²⁰⁻²²⁾ ステロイド分子の HPLC-MS 分析による高感度分析において、新たな展開がなされようとしている。ここでは水酸化ステロイドを中心に、targeted steroidomics 解析法構築への鍵を握る誘導体化研究の現状と、質量分析法、特に HPLC-MS を基盤とした非抱合型のエストロゲン、アンドロゲン、C₂₁-ステロイドならびにステロール関連代謝物の steroidomics 研究の基本となるプロファイル分析への応用について解説する。

HPLC-MS 用誘導体開発の戦略

非抱合型のステロイド類を網羅的に定量する targeted steroidomics 研究において、ステロイド類を酵素等で脱抱合後、揮発性誘導体に導いた後 GC-MS あるいは GC-タンデム質量分析 (MS/MS) で定量する従来の方法に加え、HPLC-MS/MS (ESI-あるいは APCI) 法が極めて有効な手段となりつつある。HPLC-MS 法は、試料注入から質量分析 (選択反応検出: selected reaction monitoring; SRM) までの工程の全自動化が可能で、かつ HPLC の溶離液を直接分析可能であり、本来、誘導体化を必要としない high throughput な手法である。しかしながら非抱合型ステロイド分子は、タンパクやペプチドなどの極性分子とは異なり、HPLC-MS/MS (SRM) を直接用いても、代謝経路の概略 (Fig. 1, 4, 6, 8) に示されるよう、化学構造の多様性から、プロテオミクス解析で得られる peptide sequence のような画一的な結果が容易に得られないのが現状である。

ステロイド分子の中には、HPLC-ESI-MS/MS や HPLC-APCI-MS/MS で直接、満足できる感度で検出できる分子種もあるが、一方では、その分子の化学構造の多様性という障壁を超えて、ある程度一定した検出感度で、網羅的な分析し得る手法の開発が望まれている。この点を break through する方法として、ステロイドを積極的に誘導体に導き、検出感度を向上させる手法が、試行錯誤のうちにも、次第に成果が集積しつつある。

ステロイド分子の網羅的定量法の確立という課題を達成するための誘導体化の選択指標として、現在のところ ESI-MS に対しては、ステロイド分子に恒久的電荷を付与し、分子を安定な陽イオンとして取り出せること、^{20,21,23)} ステロイド分子にプ

ロトン親和性の大きい、別分子を結合させ、プロトン化分子（あるいはその他のカチオン付加分子）の生成を助けることを目的とした誘導体がデザインされ、²⁴⁻²⁶ さらに APCI-MS に対しては、APCI のコロナ放電と窒素ガスによって生成する低エネルギー熱電子を捕獲し、解離共鳴 (EC-APCI) により負イオンを作り出すペンタフルオロベンジル基のステロイド分子への導入^{27,28} 等が挙げられ、これらの指標を中心に研究が展開されている。

エストロゲンの誘導体化

エストロゲンは、Fig. 1 に示されるように、A 環に特有のフェノール性水酸基を有する C18 のステロイドである。エストロン (estrone: E1) とエストラジオール (estradiol: E2) を例にとると、誘導体化ではこのフェノール性の水酸基、あるいは D 環上にある 17 位水酸基および 17 位カルボニル基が誘導体化の対象官能基となる。HPLC-MS 法による E1 および E2 の微量定量を目的とした誘導体として、Fig. 2 に示す構造の誘導体が報告されている。これらのうち、N-メチルピリジニウムエーテル (NMP)、^{23,29} N-メチルニコチン酸エステ

ル (MNA)、³⁰ 1-(2,4-ジニトロフェニル)-4-ジメチルピペラジニウムエーテル (MPPZ)³¹ および Girard-T (GT)³² 誘導体は、いずれも恒久電荷型である。NMP や MNA 誘導体はフェノール性水酸基とアルコール性水酸基が誘導化されるが、いずれの誘導体化もエストラジオールのように複数の水酸基を有するエストロゲンでは、誘導体調製には反応時間の制御など、条件の最適化が必要であり、かつ、単一の誘導体を得ることは難しいとされる。MNA 誘導体も水酸基対象であるが、反応条件を制御することによりフェノール性水酸基のみエステル化し得る。MPPZ 誘導体も、E1 および E2 の 3 位水酸基に導入可能で最小検出限界 (LOD) が 0.15 pg/on column で高い検出感度を有するが、試薬の調製や誘導体化が煩雑である。また GT 誘導体化はカルボニル基に選択的な反応であり、水酸基のみを有するエストロゲンの分析には用いられない。

一方、ダンシル (Dansyl)^{26,29,33} および 3-ピリジンスルホン酸エステル誘導体 (PS)³⁴ は、いずれもプロトン親和型誘導体であり、Dansyl 誘導体化および PS 誘導体化は、反応条件の制御により、通常フェノール性水酸基を選択的に誘導体とすることが

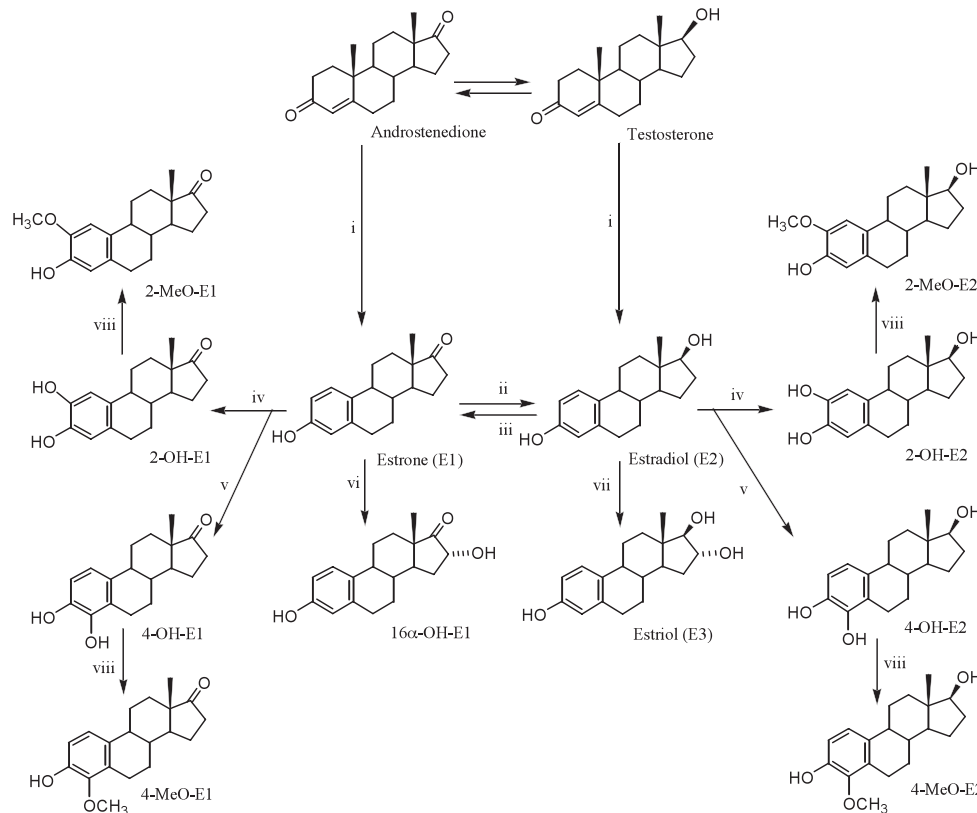


Fig. 1. Biosynthetic and Metabolic Pathway of Estrogens and Related Enzymes

i: aromatase (CYP19A), ii: 17 β -HSD-2; 17 β -HSD-14, iii: 17 β -HSD-1; 17 β -HSD-7; 17 β -HSD-12; AKR1C3, iv: CYPs 1A1; 1A2; 3A4, v: CYPs 1A1; 1A2; 1B1; 3A4, vi: CYPs 1A1; 2C8; 3A4; 3A5; 3A7, vii: CYPs 1A1; 2C8; 3A4; 3A5; 3A7, viii: catechol-O-methyltransferase (COMT).

できる。また、エストロゲンのフェノール性水酸基はペンタフロロベンジル (PFB) ブロミドと反応し、PFB エーテル誘導体が得られる。この誘導体は EC-APCI-MS に応答することが報告されている。^{27,35)}ここに挙げた誘導体の多くは、エストロゲンの steroidomics 解析を目指して、フェノール性水酸基に着目した誘導体化で、それぞれの利点はあるものの、エストロゲン以外のステロイドを含めた steroidomics 解析には応用できないのが現状である。

Xu らは Dansyl 誘導体を用いて 14 種類のエストロゲンのプロファイリングを報告²⁶⁾している。Yang らは 16 種類のエストロゲンについて、それ

らを MN 誘導体化および Dansyl 誘導体化を行い、一斉分析を行って比較した結果、Dansyl 誘導体では十分な分離が得られないが、16 種類を MN 誘導体ではほぼ分離できることを報告している。³⁰⁾エストロゲンの MN 誘導体の LOD は 0.36~2.34 ng/mL (1.8~11.71 pg/on column) であり、APCI 法を用いた非誘導体 ($[M-H]^-$ 検出) の LOD (0.014~15.70 $\mu\text{g/mL}$) に比較して飛躍的な感度上昇が達成されたものの、Dansyl 誘導体の LOD (0.25 pg/on column, 最小定量限界 (LOQ): 0.013~0.02 ng/0.5 mL urine)^{26,33)}には及ばず、絶対的感度として十分とはいえない。また、エストロゲンの PS エステ

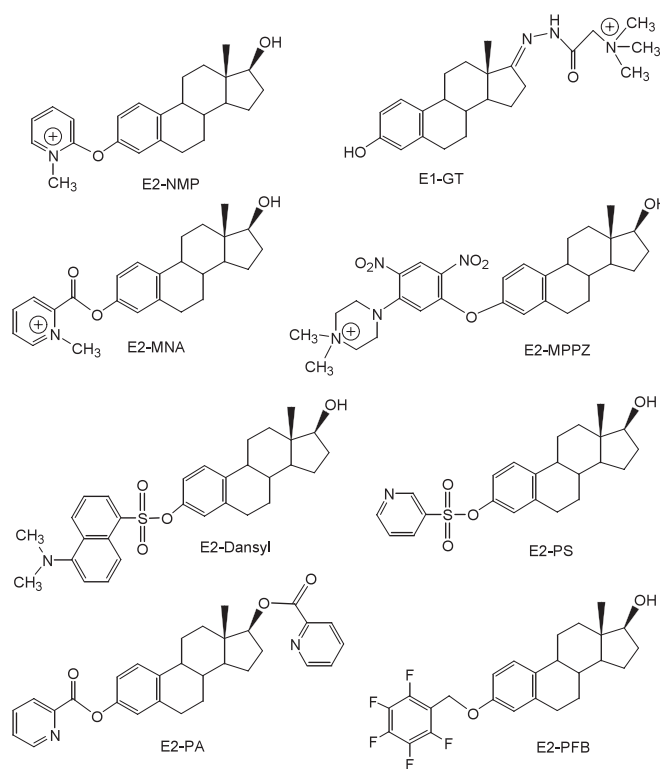


Fig. 2. Proposed Derivatization of Estrogens for HPLC-MS

E1: estrone, E2: estradiol, NMP: N-methylpyridinium, GT: Girard-T, MNA: N-methylnicotinyl, MPPZ:1-(2,4-dinitrophenyl)-4-dimethylpiperadinium, Dansyl: 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl, PS: 2-pyridine-sulfonyl, PA: picolinyl, PFB: pentafluorobenzyl

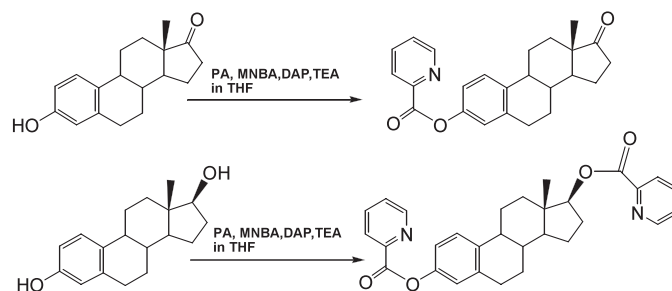


Fig. 3. Derivatization of Estrone and Estradiol with Picolinic Acid

PA: picolinic acid, MNBA: 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride, DAP: 4-dimethylaminopyridine, TEA: triethylamine, THF: tetrahydrofuran

ル誘導体は、主に E2 を用いて基礎検討されており、HPLC-ESI-MS/MS 法 (positive) で 10 pg/mL serum の LOQ (2 pg/on column) が報告されている。³⁴⁾ 一方、エストロゲンの 3-PFB 誘導体と EC-APCI-MS 法による負イオン検出による E1 および E2 ならびにカテコールエストロゲンなど、6 種類の代謝物を含めた一斉定量では、5 pg/mL serum の LOQ が得られている。³⁶⁾

著者らは、ステロイド水酸基に着目し、普遍的にプロトン親和性を付与できる水酸基の誘導体を検討したところ、ピリジンカルボン酸エステル誘導体、中でも 2-ピリジンカルボン酸 (ピコリン酸: PA) エステルが最も適していることを見いだした。²⁵⁾ そこでエストロゲン (E1, E2 および estriol: E3) の PA エステルを調製し、ESI-MS に対する挙動を精査した結果、水酸基の個数に関わらず、いずれのエストロゲンもプロトン化分子を基準ピークとして与えた。また、これらのエストロゲンの PA エステル誘導体は優れた ESI 応答性を有することを見だし、エストロゲンの steroidomics 解析に有用であること

明らかにした。エストロゲンのピコリン酸エステルは Fig. 3 に示した方法で、合成スケールでも微量定量スケールでも容易に調製でき、過剰の試薬類は固相抽出法で容易に除去可能である。さらに、生成した誘導体は、メタノール中では、やや不安定であるが、アセトニトリルを溶媒として用いると保存安定性の優れていた。E1 と E2 の PA エステルの LOD は、それぞれ 1 pg/mL および 0.5 pg/mL serum であり、優れた ESI 応答性を示した。³⁷⁾ また、本誘導体化により、これらエストロゲンの血清中濃度のみならず、唾液中濃度や乳がん組織中濃度測定にも応用可能であることを確認した。また、PA 誘導体化はカテコールエストロゲンの定量にも応用可能で、2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE1 および 4-OHE2 の異性体の相互分離にも適しており、各成分の LOQ は 20 pg/mL であった。³⁸⁾

アンドロゲンの誘導体化

アンドロゲンは、Fig. 4 に示すよう、A 環および D 環に水酸基とカルボニル基を有し、これらが誘

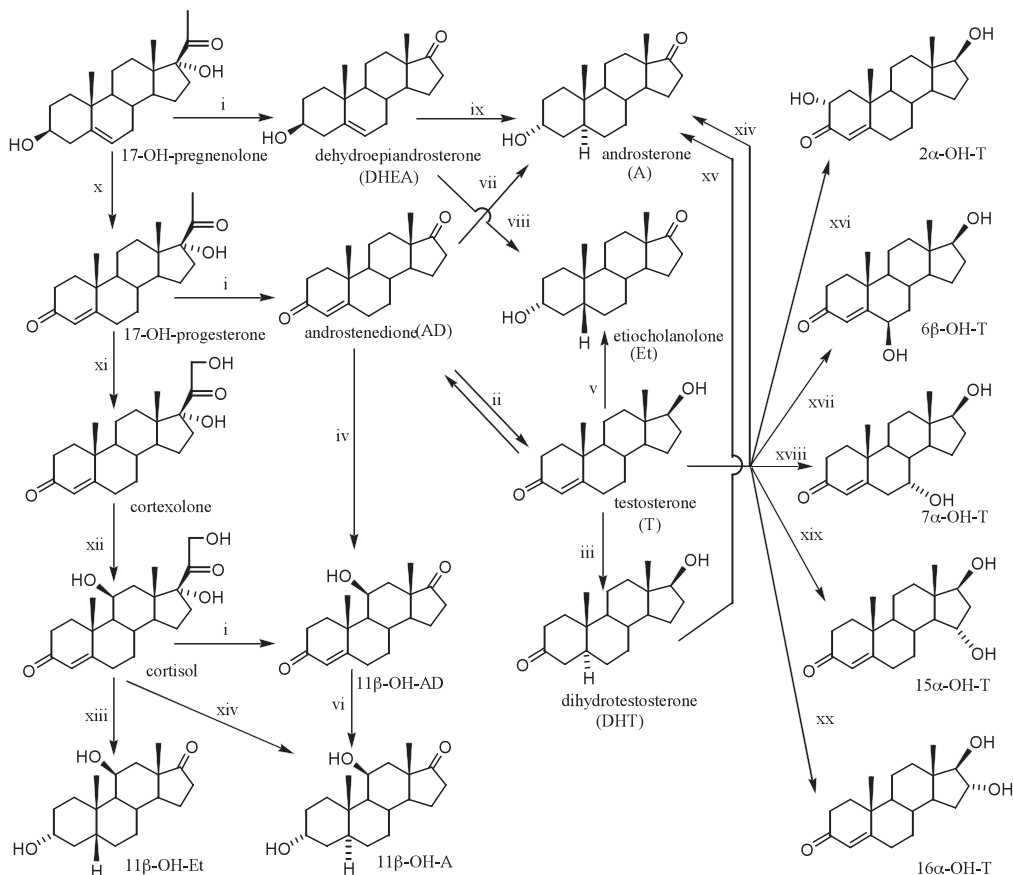


Fig. 4. Biosynthetic and Metabolic Pathway of Androgens and Related Enzymes

i: CYP17A1, ii: 17β-HSD-3, iii:SRD5A, iv: CYP11B1, v: AKR1C, AKR1D, vi: SRD5A, AKR1C, vii: SRD5A, AKR1C, viii: AKR1D, 3β-HSD-1, AKR1C, ix: 3β-HSD-2,SRD5A, AKR1C, x: 3β-HSD-2, xi: CYP21A2, xii: CYP17A1, xiii: AKR1C, AKR1D, xiv: SRD5A, AKR1C, xv: AKR1C, xvi: CYP2C11, xvii: CYP3A1, CYP3A2, CYP2B1, xviii: CYP2A1, xix: CYP2A2, xx: CYP2C11.

導体化の対象官能基となる。HPLC-MS法によるテストステロン (T) およびその活性代謝物であるジヒドロテストステロン (DHT) ならびにデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) の微量定量を目的とした誘導体として、Fig. 5に示す化学構造の誘導体が報告されている。これらのうちNMP,^{23,39)} 2-ヒドラジノ-N-メチルピリジン (HMP),⁴⁰⁻⁴²⁾ 4-(4ジメチル-1-ピペラジニウム)-3-ニトロフェニルカルバメート (MAPZ)³¹⁾ およびGirard-P (GP)^{21,40)} 誘導体は恒久電荷型であり、NMP エーテル誘導体はでは3位あるいは17位水酸基が誘導体化される。特にDHTはNMP エーテル誘導体化によってESI-MSに高感度で応答し、5 pg/sampleのLOQが報告されている。²³⁾ また、この誘導体は前立腺組織中のDHTの定量にも応用されている。また、TおよびDHEAのNMP エーテル誘導体のLODは、1.5 pg/on columnおよび2.5 pg/on columnであり、非誘導体分子に比較して13倍および320倍

の高感度化が達成されている。⁴⁰⁾ HMPおよびGP誘導体化はアンドロゲンのA環およびD環のカルボニル基を対象としたものであるが、これらの誘導体化もアンドロゲン分析において高感度化が得られており、T、DHTおよびDHEAのHMP誘導体のLODはそれぞれ0.3 pg/on column, 0.5 pg/on columnおよび0.6 pg/on columnで、非誘導体分子に対し、それぞれ70倍、1600倍および130倍の高感度化が達成されている。⁴⁰⁾ また、TおよびDHEAのGP誘導体のLODは、それぞれ3 pg/on columnおよび1.2 pg/on columnで、非誘導体分子に対し、それぞれ7倍および670倍の高感度化が達成されている。⁴⁰⁾ しかしながら、これらの誘導体化で得られるシッフ塩基は*syn*-および*anti*-型の幾何異性体の生成に基づき、クロマトグラム上2本のピークとして観察される場合があり、相互分離を目標とした微量定量分析には適さない。特にTのGP誘導体は、ブロードなクロマトグラムを示

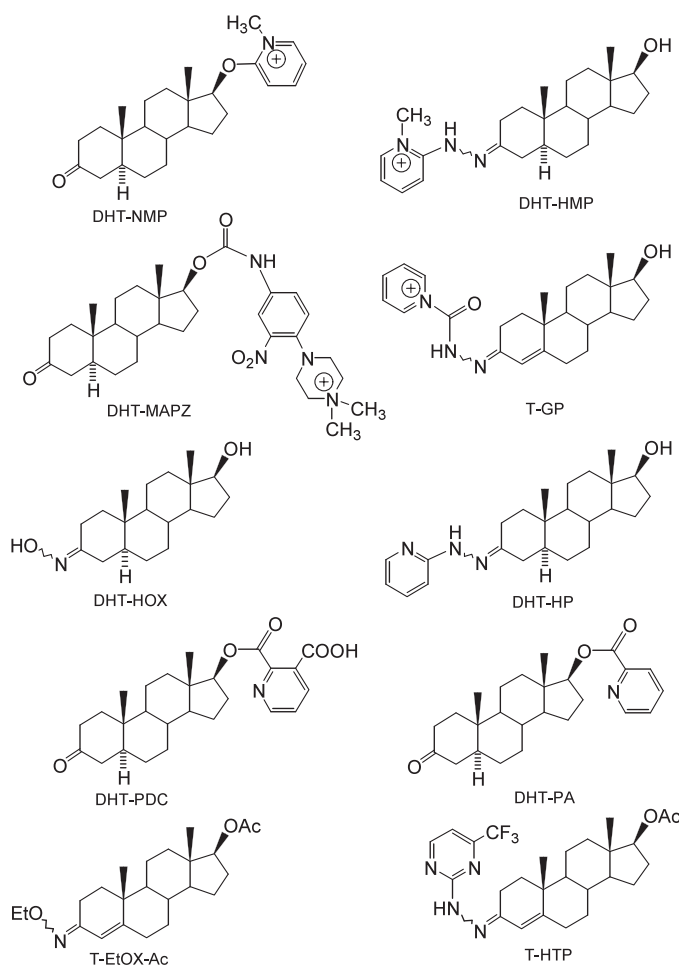


Fig. 5. Proposed Derivatization of Androgens for HPLC-MS

T: testosterone, DHT: dihydrotestosterone, NMP: N-methylpyridinium, HMP: 2-hydradino-N-methylpyridyl, MAPZ: 4-(4-dimethyl-1-piperadinium)-3-nitrophenyl-carbamate, GP: Girard-P, HOX: hydroxime, HP: 2-hydradinopyridyl, PDC: pyridine-2,3-dicarboxyl, PA: picolinyl, EtOX-Ac: O-ethyloxime-acetyl

すとされている。またアンドロステジオン (AD) やプロゲステロン (P) などのようなカルボニル基を2つ有するアンドロゲンの誘導体化では、非誘導体と比較して感度の向上は認められていない。また、DHTとDHEAのMAPZ誘導体のLODは、それぞれ0.3 pg/on columnおよび0.4 pg/on columnで、高い検出感度を有するが、³¹⁾ エストロゲンのMPPZ誘導体と同様、試薬の調製や誘導体化が煩雑である。

一方、ピリジン-ジカルボン酸半エステル (PDC)、⁴³⁾ PAエステル、^{37,44)} ヒドロキシム (HOX)、^{24,45)} 2-ヒドラジノピリジン (HP)⁴⁶⁾ および2-ヒドラジノ-4-トリフロロメチルピリミジン (HTP)⁴⁷⁾ は、いずれもプロトン親和型誘導体であるが、これらのうちPDC誘導体およびPAエステル誘導体は、水酸基が対象官能基である。PDC誘導体調製にはピリジン-2,3-ジカルボン酸無水物を用いるため、生成物は常に、2-カルボン酸エステルと3-カルボン酸エステルの混合物となり、クロマトグラムは複雑になる。また、HOXとHP誘導体は、HMPやGP誘導体と同様、A環およびD環のカルボニル基を対象としたものであるが、得られるシッフ塩基 (ヒドラゾン) はいずれも *syn*-および *anti*-の幾何異性体の生成に基づき、クロマトグラム上2本のピークとして観察される場合もあり、この場合もクロマトグラムは複雑になり、一斉分析を目的とした誘導体化として適しているとはいえない。

プロトン親和型誘導体では、HOX誘導体のLODはTおよびDHTで0.5 fmol (0.12 pg)/on columnであり、⁴⁵⁾ また、HP誘導体でのLODはTおよびDHEAでそれぞれ0.7 pg/on columnおよび0.4 pg/on columnであり、非誘導体と比較して6倍および1600倍の高感度化が達成されている。HP誘導体は、恒久電荷型のHMP誘導体と異なり、ADやPにおいても非誘導体と比較して3~8倍の感度上昇が認められている。⁴⁶⁾ 一方、PDC誘導体でのLOQはTおよびDHTでそれぞれ200 pg/mLおよび10 pg/mLとの報告がある。⁴³⁾ PAエステル誘導体化では、TおよびDHTは17位水酸化に、DHEAでは3位水酸基に定量的に導入された。ヒト血清におけるLOQは、TおよびDHTはいずれも1 pg/0.2 mL serumであった。また、前立腺組織ではTおよびDHTはそれぞれ0.5 pg/3 mg tissueおよび1 pg/3 mg tissueで高感度な一斉定量が可能となった。⁴⁴⁾ 最近報告されたHTP誘導

体でのLOQはTおよびDHTでそれぞれ0.1 ng/mLおよび0.5 ng/mLであった。⁴⁷⁾ プロトン親和型誘導体はHPLC-APCI-MS/MSにおいても利用され、Tの3-エトキシム-17-アセチル (EtOX-Ac) 誘導体でLOQは0.2 ng/mL serumとの報告もあるが、検出感度はあまり高くない。⁴⁸⁾ このように、アンドロゲンの分野でも誘導体の開発は、非誘導体ではLC-MSに対する応答性が極めて低いデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) やDHTの微量定量に対して有用であることが証明された。

コルチコステロイドの誘導体化

Fig. 6に示されるよう、コルチコステロイドはプレグネノロン (P5) と17-ヒドロキシプレグネノロン (17OHP5) より副腎で生合成される。コルチコステロイドのsteroidomics解析は、コルチゾール生合成、代謝に関わる側鎖の酸化酵素の先天性欠損による新生児診断に用いられる。コルチゾール始め、 Δ^4 -3-keto構造を有するC₂₁-ステロイドは、HPLC-MSにより高感度 (0.02~2 ng/sample; APPI)⁴⁹⁾ で定量可能であるが、 Δ^5 -3 β -OHの部分構造あるいはAおよびB環に存在するカルボニル基や二重結合が還元された代謝物はESI応答性が低く (2.5~500 ng/sample; positive)、^{50,51)} さらに20位カルボニル基が還元された代謝物を含めて網羅的に定量するためには、誘導体化が不可欠となる。また、HPLC-MS法により、非誘導体でC₂₁-ステロイド類を一斉分析した例はない。プレグナンとコルチコステロイドの微量定量を目的とした誘導体として、Fig. 7に示す構造の誘導体が報告されている。

これらのうち、HMP、⁴⁰⁾ GP、²¹⁾ NMP⁴⁰⁾ とMAPZ誘導体³¹⁾ はESI-MS用の恒久電荷型であり、HMPとGP誘導体化はカルボニル基を、NMPとMAPZ誘導体化は水酸基を対象官能基とする。P5のHMPとGP誘導体のLODはともに0.5 pg/on columnで、非誘導体と比較していずれも500倍の高感度化が達成されている。HMP誘導体はC₂₁-ステロイドの5 α -reductaseならびに3 α -HSDおよび3 β -HSDによる代謝物 (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one: AP, 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one: EAP, 5 α -pregnane-3,20-one: DHP) の定量にも有効であり、いずれの代謝物についても0.25 ng/mLのLOQが得られている。⁵²⁾ また、MAPZ誘導体はP5およびAPにおいてそれぞれ0.4 pg/on columnと0.2 pg/on columnのLODが得られており、非誘

導体の 500~630 倍の感度上昇が報告されている。P5 の NMP 誘導体の LOD は 20 pg/on column で、HMP や GP 誘導に及ばなかったが、MAPZ 誘導体では LOD は 0.4 pg/on column となり、非誘導体に比較して 630 倍の高感度化が確認されている。³¹⁾ 電子吸引性の置換基を有する DNB と NFPH 誘導体⁵³⁾ も知られており、それぞれ水酸基とカルボニル基が対象官能基であるが、主に APCI-MS の負イオン検出モードで感度が高く、ラット脳内のテトラヒドロコルチコステロン (THB) 異性体の定量に用いられている。いずれの誘導体においても

LOQ は 1 ng/50 mg tissue と、非誘導体化に比較して 40~60 倍の感度上昇が確認されているが、絶対的感度が十分高いとはいえない。

プロトン親和型誘導体としては、HP および PA 誘導体が挙げられる。HP 誘導体はプレグナン類の A 環および側鎖のカルボニル基を対象としたものであるが、得られるシッフ塩基はいずれも *syn*-および *anti*-の幾何異性体の生成に基づき、クロマトグラム上 2 本のピークとして観察される場合があり、さらに水酸基のみを有するプレグナン類には応用できない。HP 誘導体化は 17OHP5 および 17-

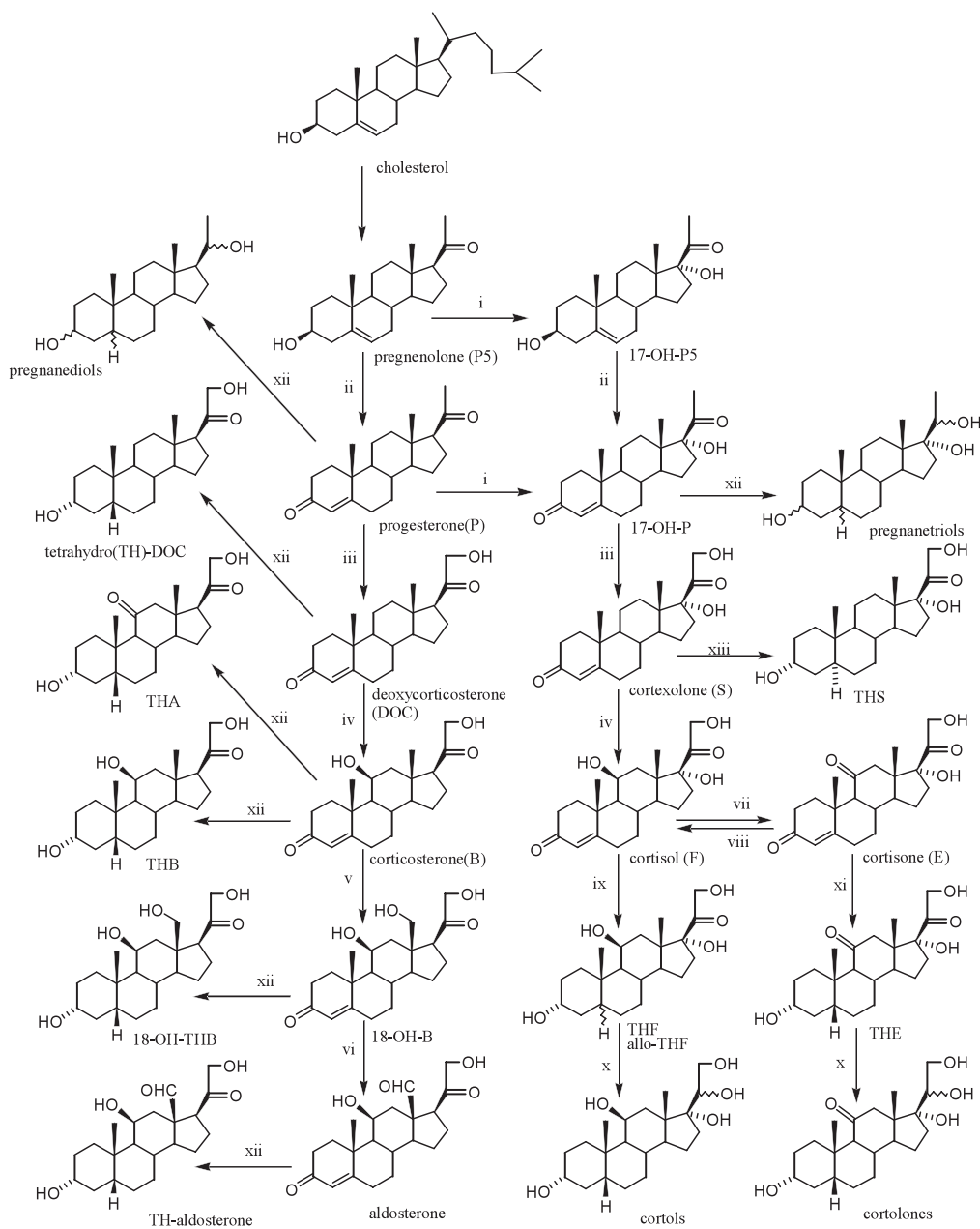


Fig. 6. Biosynthetic and Metabolic Pathway of Corticosteroids and Related Enzymes

i: CYP17A1, ii: 3β -HSD-2, iii: CYP21A2, iv: CYP11B1, v: CYP11B2, vi: CYP11B2, vii: 11 β -HSD-2, viii: 11 β -HSD-1, ix: SRD5A, AKR1C, AKR1D, x: AKR1C, 20 β -HSD, xii: AKR1C, AKR1D.

ヒドロキシprogesterone (17OHP) の微量定量に応用されており, 17OHP5 および 17OHP の LOQ はそれぞれ 1 ng/mL および 0.5 ng/mL urine で新生児の先天性副腎過形成症診断の blood spot テストに有用であった.⁵⁴⁾

プロトン親和型誘導体として著者らが見いだした, PA エステル誘導体化をpregnenoloneや各種コルチコステロイドおよびそれらの代謝物に応用し, ESI-MS に対する挙動を精査したところ, プレグナン類やコルチコステロイドの誘導体化では, 3, 20 および 21 位の水酸基がエステル化されるが, 立体障害のある 11 β -位および 17 α -位の水酸基はエステル化されないことが分かった.⁵⁵⁾ また, いずれの C₂₁-ステロイドも, クロマトグラム上で単一ピークが得られ, ESI-MS ではプロトン化分子を基準ピークとして与えた. 水酸基を対象官能基とする誘導体化の中では, プレグナン類に加えコルチ

コステロイドとその代謝物まで広く応用できる誘導体化は, PA エステル化のみと考えられる. 複雑なヘミアセタール構造を有するアルドステロン分子も, ヘミアセタール部分をエタノール/塩化水素でアルコキシ化した後, 21 位水酸基を PA 誘導体として, 他のプレグナン類やコルチコステロイド類と同様に SRM で定量可能であった. PA 誘導体化により, コルチゾール (F), 6 β -OH-F, コルチゾン (E), コルテキソロン (S), コルチコステロン (B), デヒドロコルチコステロン (A), デオキシコルチコステロン (DOC) などの Δ^4 -3-keto 体に加え, 還元された代謝物である THA, THB, THE, THF, alloTHF などのテトラヒドロ体,⁵⁶⁾ さらに代謝が進んだ cortol, β -cortol, cortolone, β -cortolone を含めた一斉分析も可能となった. PA 誘導体を用いた SRM 法における LOQ は, コルチコステロイド類およびテトラヒドロ体で 0.1 ng/mL

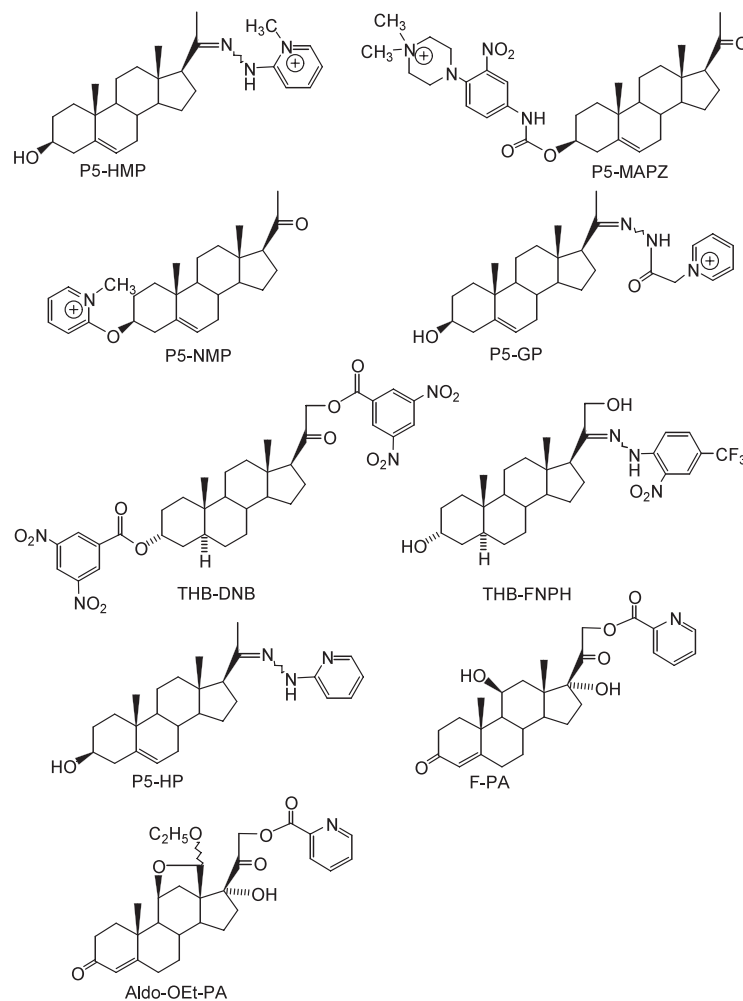


Fig. 7. Proposed Derivatization of C₂₁-Steroids for HPLC-MS

P5: pregnenolone, THB: tetrahydro-B, F: cortisol, Aldo: aldosterone, HMP: 2-hydradino-N-methylpyridyl, MAPZ: 4-(4-dimethyl-1-piperidinium)-3-nitrophenylcarbamate, NMP: N-methylpyridinium, GP: Girard-P, DNB: 2,4-dinitrobenzoyl, FNPH: trifluoromethyl-nitrophenylhydrazide, HP: 2-hydradino-N-methylpyridyl, PA: picolinyl

salivaであった。また、アルドステロンも、ヘミアセタールのアルコキシ化過程を含む一連の誘導体化⁵⁷⁾により、これらのコルチコステロイド類のプロファイルに加えることが可能で、LOQは1

pg/0.2 mL serumの高感度分析が達成された。⁵⁸⁾しかし、6 β -OH-Fのような酸性条件に弱い化合物があり、アルドステロン誘導化時のアルコキシ化条件における6 β -OH-Fの安定性を保つ工夫が必要

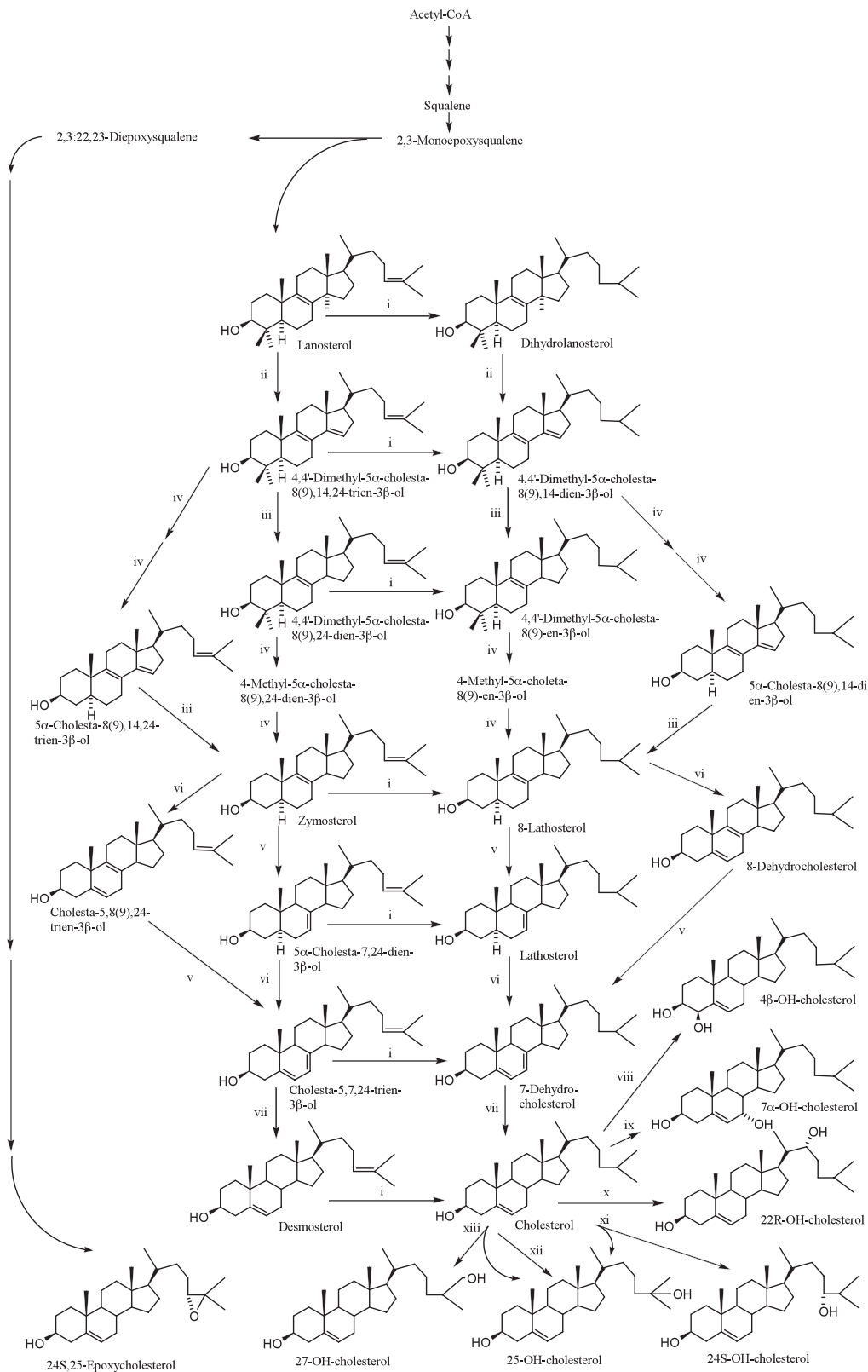


Fig. 8. Biosynthetic and Metabolic Pathway of Sterols and Related Enzymes

i: 3 β -HS- Δ^{24} -reductase, ii: lanosterol 14 α -demethylase, iii: 3 β -HS- Δ^{14} -reductase, iv: 3 β -HSD, v: 3 β -HS- Δ^8, Δ^7 -isomerase, vi: 3 β -HS 5-desaturase, vii: 3 β -HS- Δ^7 -reductase, viii: CYP3A4, ix: CYP7A1, x: CYP11A1, xi: CYP46A1, xii: CH25H, xiii: CYP27A1.

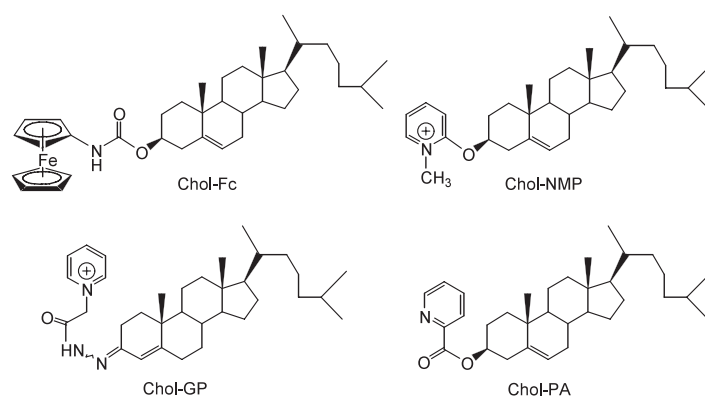


Fig. 9. Proposed Derivatization of Cholesterol for LC-MS

Chol: cholesterol, Fc: ferrocene-carbamoyl, NMP: N-methylpyridinium, GP: Girard-P, PA: picolinyl

であった。この方法はアルドステロンと同様な部分構造を持ち、近年原発性アルドステロン症の診断に利用されつつある 18-オキシコルチゾール (18-oxo-F) の誘導体化への応用も期待される。

ステロールの誘導体化

Fig. 8 にコレステロールの生合成と水酸化の代謝経路を示した。生合成前駆体やコレステロールの水酸化代謝物は、脂質代謝の恒常性維持との関わりにおいて重要な意味を持ち、コレステロールの生合成、吸収および代謝異常の診断に重要な血清バイオマーカーである。微量成分を含むこれらコレステロール前駆体および水酸化コレステロールの定量では感度に優れた GC-MS 法が主流であったが、⁵⁹⁻⁶¹⁾ 熱に不安定なエポキシ体⁶²⁾ は分析条件で分解する。コレステロールやオキシステロール類は中性で脂溶性が高いため、これまで主に HPLC-APCI-MS 法で検討されてきた。^{63,64)} コレステロールは HPLC-APCI-MS/MS 法により 2.2 pmol/on column, オキシステロールは 0.5~2.0 pmol (0.2~0.8 ng)/on column の LOD で定量されているが、十分な感度とはいえない。コレステロールやオキシステロール類の HPLC-ESI-MS 法では、Fig. 9 に示されるように、電気化学的に活性な Fc 誘導体、⁶⁵⁾ ならびに NMP²⁰⁾ および GP 誘導体²²⁾ のような恒久的電荷型の応用が報告されている。特にコレステロールの Fc 誘導体の LOD は 41 amol/on column と高感度である。⁶⁵⁾ また、オキシステロールの $\Delta^5-3\beta\text{-OH}$ 構造を $\Delta^4-3\text{-keto}$ 体に変換後、GP 誘導体とする方法での LOD も <2.5 f mol/on column との報告があるが、これらの誘導体化による各ステロール類の相互分離を含めた一斉微量定量法の

構築には至っていない。

一方、著者らが見いだしたプロトン親和性の PA エステル誘導体化は水酸基を一工程で誘導体化できるため、コレステロールやオキシステロール類の分析にも有用であることが示されている。代謝物の一つである 7 α -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの PA 誘導体は HPLC-ESI-MS 法においてプロトン化分子が基準ピークとして観察され、非誘導体と比較すると感度は 1000 倍程度上昇し、100 fg/on column の LOD が得られている。⁶⁶⁾ PA 誘導体化によりコレステロールを 260 amol (on column), オキシステロール類を 5~25 amol (on column) の高感度で検出できることが判明し、ステロール類やオキシステロール類の一斉分析にも有用であることを明らかにした。^{67,68)} PA 誘導体化を用いてコレステロール代謝の前駆体を測定することにより、各段階の酵素欠損に基づく、desmosterolosis, Antley-Bixler syndrome, HEM/Greenberg skeletal syndrome, CHILD syndrome or NSDHL deficiency, X-linked dominant chondro-dysplasia punctata type-2, Conradi-Hünemann-Happle syndrome, lathosterolosis, Smith-Lemli-Opitz syndrome などの遺伝的疾患の診断の可能性が示されている。また、脂質代謝の重要な指標となるコレステロール代謝物、4 β -OH-, 7 α -OH-, 22R-OH-, 24S-OH-, 25-OH-および 27-OH-体、ならびに不安定な 24S,25-エポキシコレステロールの HPLC-ESI-MS/MS による一斉定量にも有用であることは興味深く、これらのオキシステロールの steroidomics 解析は脂質代謝関連疾患の診断、治療評価に応用されつつある。C18 カラムでは MS/MS で類似の挙動を示す 7 α -OH-体と 7 β -OH-体の分離、7 α -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オ

ンと 24S,25-エポキシコレステロールの分離および大量のコレステロールに近接して溶出するラノステロールに注意を払う必要がある。

HPLC-MSによる水酸化ステロイドの targeted steroidomics 解析

HPLC-MSの誘導体開発は、ステロイド分子に存在するカルボニル基と水酸基をターゲットとして進められてきた。恒久的電荷型、プロトン親和型いずれにおいても、カルボニル基をターゲットとした場合、オキシムやヒドラゾンの形成による

anti-および *syn*-幾何異性体の生成は不可避であり、誘導体によってはクロマトグラムが複雑となり steroidomics 解析には応用しにくい。さらに、カルボニル基を2つ合わせ持つアンドロステンジオンやプロゲステロンに対する恒久電荷型誘導体は、カルボニル基を1つ持つステロイドに比較すると、非誘導体に対して検出感度の著しい向上は確認されていないばかりか、必ずしも分子イオンの情報は得られず、2価イオンや脱プロトン化イオンの出現など、複雑な ESI-MS の挙動を示すとされる。

一方、水酸基をターゲットとする場合は、水酸

Table 2. Positive ESI-SRM and HPLC data of the picolinyl derivative of each hydroxyl steroid.^a

Steroids	Derivatives	SRM condition			t _R (min) ^c
		transition (<i>m/z</i>)	CE (V)	Pattern ^b	
Estrone	3-Pi	376 → 78 (157)	43	B	25.2
Estradiol	3,17-diPi	483 → 370 (264)	17	A	31.4
Estriol	3,16,17-triPi	604 → 481	26	A	24.9
2-Hydroxyestrone	2,3-diPi	497 → 374	32	A	*
4-Hydroxyestrone	3,4-diPi	497 → 374	32	A	*
2-Hydroxyestradiol	2,3,17-triPi	604 → 481	30	A	*
4-Hydroxyestradiol	3,4,17-triPi	604 → 481	30	A	*
Androstenedione	non-derivatized	289 → 108	25	H	*
Testosterone	17-Pi	394 → 271 (253)	20	A	26.7
Dihydrotestosterone	17-Pi	396 → 255 (203)	20	G	32.9
Dehydroepiandrosterone	3-Pi	394 → 271 (175)	20	A	30.9
5-Androstenediol	3,17-diPi	501 → 255	23	F	*
Androsterone	3-Pi	396 → 124	19	C	31.6
Epiandrosterone	3-Pi	396 → 124	19	C	*
Etiocholanolone	3-Pi	396 → 124	19	C	31.8
Epietiocholanolone	3-Pi	396 → 124	19	C	*
Progesterone	non-derivatized	315 → 109	20	H	*
17 α -OH-progesterone	non-derivatized	331 → 108	25	H	*
Pregnenolone	3-Pi	422 → 299 (281)	10	A	38.6
17 α -OH-pregnenolone	3-Pi	438 → 315 (297)	10	A	29.9
Cortisol	21-Pi	468 → 450 (309)	21	D	13.8
6 β -Hydroxycortisol	6,21-diPi	589 → 466	21	A	10.9
Cortisone	21-Pi	466 → 78 (265)	52	B	14.6
Corttexolone	21-Pi	452 → 434 (293)	25	D	17.8
Corticosterone	21-Pi	452 → 434 (192)	25	D	19.3
Dehydrocorticosterone	21-Pi	450 → 78 (96)	52	B	16.9
Deoxycorticosterone	21-Pi	436 → 78 (191)	52	B	23.5
Aldosterone	18-Et-21-Pi	494 → 448	15	E	20.2
TetrahydroA	3,21-diPi	559 → 436	38	A	27.3
TetrahydroB	3,21-diPi	561 → 438	41	A	27.9
TetrahydroE	3,21-diPi	575 → 452	25	A	24.4
TetrahydroF	3,21-diPi	577 → 124	35	C	23.6
Allo-tetrahydroF	3,21-diPi	577 → 124	35	C	21.8
Cortolone	3,20,21-triPi	682 → 559	20	A	24.8
β -Cortolone	3,20,21-triPi	682 → 559	20	A	26.6
Cortol	3,20,21-triPi	684 → 279	30	X	25.1
β -Cortol	3,20,21-triPi	684 → 279	30	X	23.8

Abbreviations: ESI, electrospray ionization; SRM, selected reaction monitoring; CE, collision energy; t_R, retention time; Pi, picolinate; t_R, retention time.

^a Some data in this table have been obtained in our previous papers [55, 56, 58, 70].

^b Patterns of precursor to product ions. A: [M+H]⁺→[M+H-picolinic acid]⁺; B: [M+H]⁺→[C₅H₄N]⁺; C: [M+H]⁺→[picolinic acid+H]⁺; D: [M+H]⁺→[M+H-H₂O]⁺; E: [M+H]⁺→[M+H-EtOH]⁺; F: [M+H]⁺→[M+H-2picolinic acid]⁺; G: [M+H]⁺→[M+H-picolinic acid-H₂O]⁺; H: [M+H]⁺→[C₇H₁₀O or C₇H₉O]⁺; X: not identified.

^c Reversed phase Cadenza CD-C18 (250 mm×3 mm I.D., 3 μ m) was employed. Initially, the mobile phase was comprised of CH₃CN-water (35:65, v/v) containing 0.1% acetic acid, and then programmed in a linear manner to CH₃CN containing 0.1% acetic acid over 40 min. The final mobile phase was kept constant for 15 min. The flow rate was 400 μ L, and the column was maintained at 40°C.

Table 3. Positive ESI-SRM and HPLC data of the picolinyl derivative of each sterol.^a (ref. 69, 一部改変)

Steroids	Derivatives	SRM condition			RRT ^c
		Transition (<i>m/z</i>)	CE (V)	Pattern ^b	
24S-Hydroxy-4-cholesten-3-one	24-Pi	528 → 146	24	A	0.30
25-Hydroxy-4-cholesten-3-one	25-Pi	528 → 146	24	A	0.37
27-Hydroxy-4-cholesten-3-one	27-Pi	528 → 146	24	A	0.42
7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-one	7-Pi	528 → 146	24	A	0.33
7 β -Hydroxy-4-cholesten-3-one	7-Pi	528 → 146	24	A	0.36
5 α -Cholesta-8(9),14,24-trien-3 β -ol	3-Pi	551 → 510	12	B	0.71
Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol	3-Pi	551 → 510	12	B	0.79
Cholesta-5,8,24-trien-3 β -ol	3-Pi	551 → 510	12	B	0.78
5 α -Cholesta-7,24-dien-3 β -ol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.87
Zymosterol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.86
Desmsterol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.88
5 α -Cholesta-8(9),14-dien-3 β -ol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.87
5 α -Cholesta-6,8(9)-dien-3 β -ol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.83
7-Dehydrocholesterol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.92
8-Dehydrocholesterol	3-Pi	553 → 512	12	B	0.91
Lathosterol	3-Pi	555 → 514	15	B	0.98
8-Lathosterol	3-Pi	555 → 514	15	B	0.98
Cholesterol	3-Pi	555 → 514	15	B	1.00
Coprostanol	3-Pi	557 → 516	14	B	0.91
Cholestanol	3-Pi	557 → 516	14	B	1.04
4-Methyl-5 α -cholesta-8(9),24-dien-3 β -ol	3-Pi	567 → 526	12	B	0.89
4-Methyl-5 α -cholesta-8(9),14-dien-3 β -ol	3-Pi	567 → 526	12	B	0.92
24S,25-Epoxycholesterol	3-Pi	569 → 528	12	B	0.53
7-Ketocholesterol	3-Pi	569 → 528	12	B	0.48
4-Methyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol	3-Pi	569 → 528	12	B	1.01
Campesterol	3-Pi	569 → 528	12	B	1.03
20 α -Hydroxycholesterol	20-Pi	571 → 530	14	B	0.43
5 β ,6 β -Epoxycholestanol	3-Pi	571 → 530	14	B	0.64
5 α ,6 α -Epoxycholestanol	3-Pi	571 → 530	14	B	0.68
4,4'-Dimethyl-5 α -cholesta-8(9),14,24-trien-3 β -ol	3-Pi	579 → 538	14	B	0.78
4,4'-Dimethyl-5 α -cholesta-8(9),24-dien-3 β -ol	3-Pi	581 → 540	14	B	0.93
4,4'-Dimethyl-5 α -cholesta-8(9),14-dien-3 β -ol	3-Pi	581 → 540	14	B	0.99
4,4'-Dimethyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol	3-Pi	583 → 542	14	B	1.04
Sitosterol	3-Pi	583 → 542	14	B	1.07
Sitostanol	3-Pi	585 → 544	14	B	1.11
Lanosterol	3-Pi	595 → 554	12	B	0.90
Dihydrolanosterol	3-Pi	597 → 556	15	B	1.01
27-Hydroxy-7-dehydrocholesterol	27-Pi	633 → 510	22	C	0.62
7 β -Hydroxycholesterol	3,7-diPi	635 → 146	22	A	0.53
7 α -Hydroxycholesterol	3,7-diPi	635 → 146	22	A	0.51
6-Hydroxycholesterol	3,6-diPi	635 → 146	22	A	0.63
4 β -Hydroxycholesterol	3,4-diPi	635 → 146	22	A	0.76
22R-Hydroxycholesterol	3,22-diPi	635 → 512	22	C	0.55
22S-Hydroxycholesterol	3,22-diPi	635 → 512	22	C	0.48
24R-Hydroxycholesterol	3,24-diPi	635 → 512	22	C	0.56
24S-Hydroxycholesterol	3,24-diPi	635 → 512	22	C	0.57
25-Hydroxycholesterol	3,25-diPi	635 → 512	22	C	0.66
27-Hydroxycholesterol	3,27-diPi	635 → 512	22	C	0.71
5 β -Cholestane-3 α ,7 α -diol	3,7-diPi	637 → 514	22	C	0.49
7 α ,27-Dihydroxy-4-cholesten-3-one	7,27-diPi	649 → 146	28	A	0.17
7 α ,12 α -Dihydroxy-4-cholesten-3-one	7,27-diPi	649 → 146	28	A	0.14
Cholestane-3 β ,7 α ,12 α -triol	3,7,12-triPi	653 → 146	28	A	0.50
7 α ,27-Dihydroxycholesterol	3,7,27-triPi	756 → 510	20	D	0.31
5 β -Cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol	3,7,12-triPi	758 → 635	28	C	0.24
5 β -Cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,25-tetrol	3,7,12,25-tetraPi	879 → 756	20	C	0.12

Abbreviations: ESI, electrospray ionization; SRM, selected reaction monitoring; RRT, relative retention time; CE, collision energy; Pi, picolinylate.

^a Some data in this table have been obtained in our previous papers [67, 68, 69].

^b Patterns of precursor to product ions. A: $[M + Na]^+ \rightarrow [picolinic\ acid + Na]^+$; B: $[M + Na + CH_3CN]^+ \rightarrow [M + Na]^+$; C: $[M + Na]^+ \rightarrow [M + Na-picolinic\ acid]^+$; D: $[M + Na]^+ \rightarrow [M + Na-2picolinic\ acid]^+$.

^c RRT are expressed relative to the retention time of cholesterol 3 β -picolinylate. Polar endcapped C18 column, Hypersil GOLD aQ (150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m) was employed. Initially, the mobile phase was comprised of CH₃CN-MeOH-water (40:40:20, v/v/v) containing 0.1% acetic acid, and then programmed in a linear manner to CH₃CN-MeOH (50:50, v/v) containing 0.1% acetic acid over 40 min. The final mobile phase was kept constant for 2 min. The flow rate was 300 μ L, and the column was maintained at 40°C.

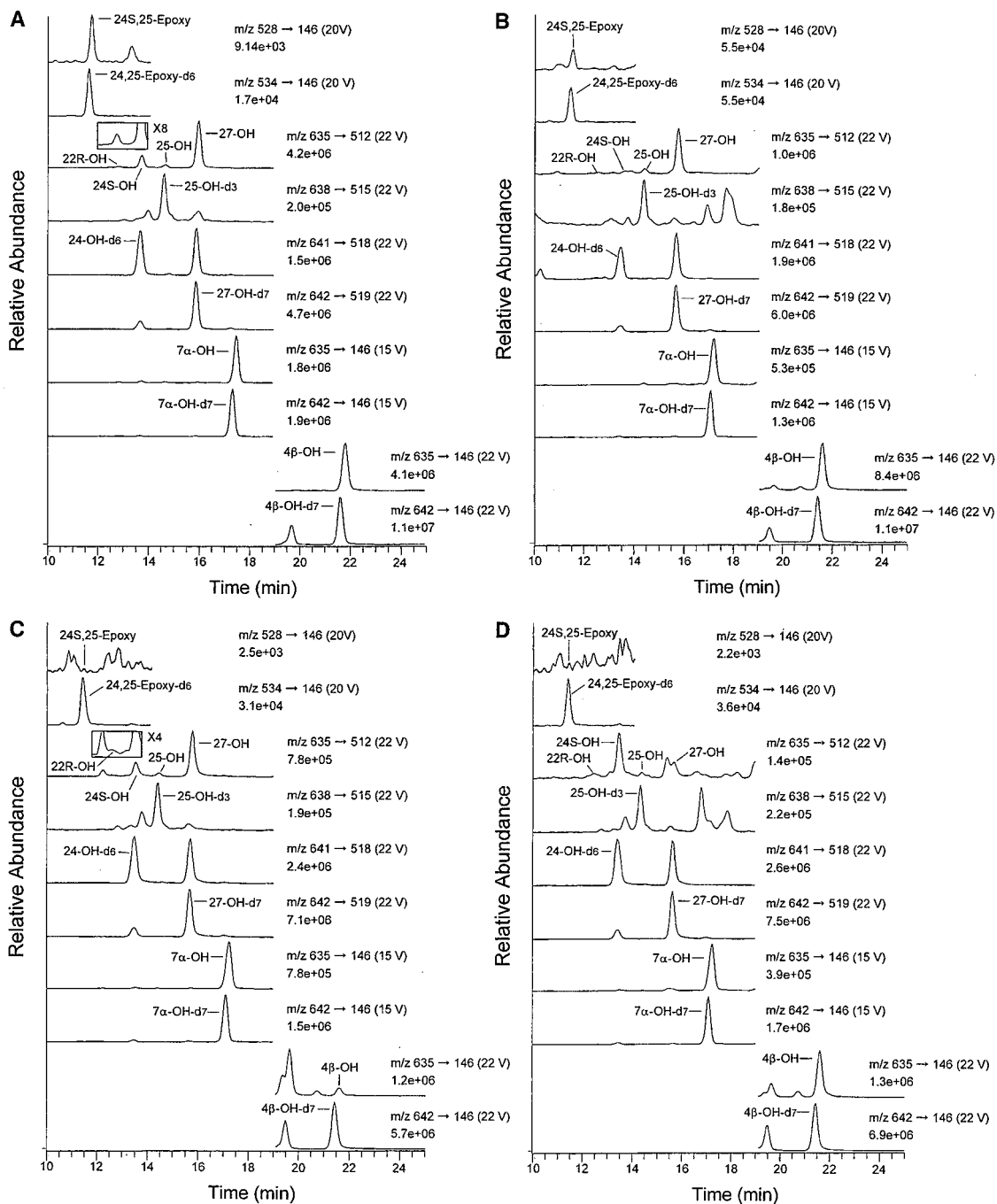


Fig. 10. Representative selected reaction monitoring chromatograms obtained from authentic oxysterols (A), 1 mg protein of the microsomal fraction from a normal rat liver (B), and 5 μ L of sera from a normal volunteer (C) and a patient with cerebrotendinous xanthomatosis (D).⁶⁷⁾

基に対する誘導体化試薬の反応性において、官能基特異性が高いもの多く、ステロイドのフェノール性水酸基とアルコール性水酸基を同時に、かつ定量的に誘導化でき、生成物が単一のクロマトグラムを示す誘導体がほとんどないのが現状である。著者らは、ステロイドの水酸基をターゲットとした誘導体としてPAエステルを見いだしたが、この誘導体化はエストロゲン、アンドロゲン、コルチコス

テロイドおよびステロール類など、ステロイド水酸基全般に適用でき、水酸化ステロイドの targeted steroidomics 解析法の構築に有用な方法と考えられる。これまでの研究の結果、現時点で Table 2 および 3 に示したステロイド、ステロール類の一斉分析が本誘導体化によって可能となり、^{69,70)} 分析可能なステロイド分子種は日ごとに増加している。PA エステル誘導体化によるエストロゲン、アンドロゲ

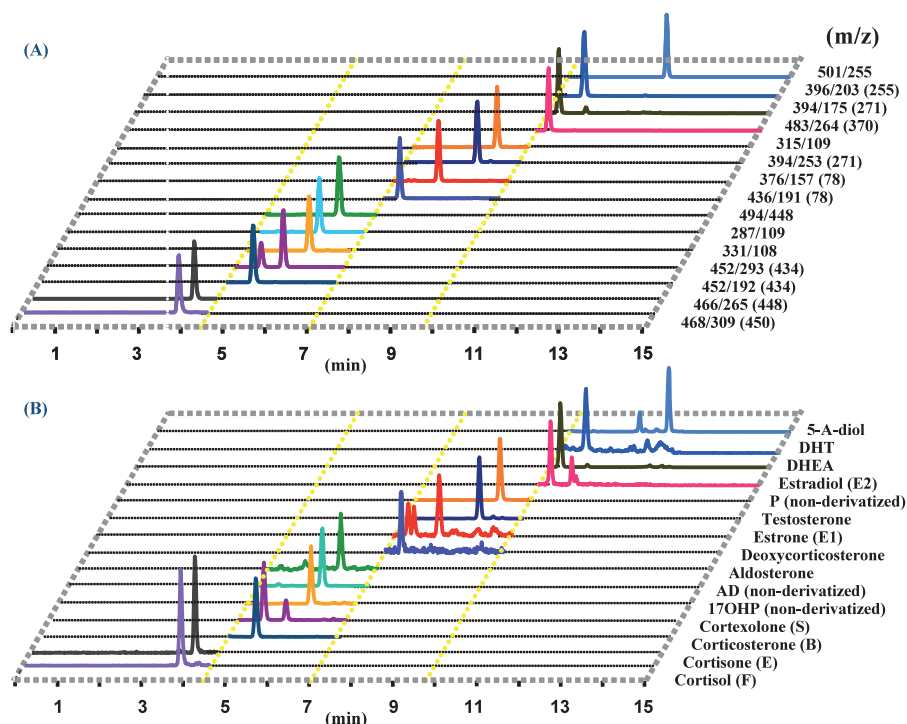


Fig. 11. Representative selected reaction monitoring chromatograms obtained for the picolinate derivatives for authentic steroids (A) and sera from a normal volunteer (B).⁶⁹⁾

ンおよび C_{21} -ステロイド15種ならびにヒト血清中のオキシステロール7種の一斉分析への応用例をFig. 10⁶⁸⁾およびFig. 11⁷⁰⁾に示した。15種のステロイドはおおむね15分、オキシステロール類は24分で分離定量できることが示されている。

おわりに

著者らは、ステロイド水酸基のプロトン親和性誘導体化に幅広く応用できる試薬として、ピリジンカルボン酸類を選択し、ステロイドの各種ピリジンカルボン酸類 (PA, 3-Me-PA, 6-Me-PA, fusaric acid: FA, nicotinic acid: NA, isonicotinic acid: INA, 2-MeO-NA) のエステルを調製してESI-MSにおける挙動について精査したところ、ESI-マススペクトル上、プロトン化分子 (またはアセトニトリルやナトリウム付加イオン) を基準ピークとして与えた。プロトン化分子およびその他の付加分子の出現強度や頻度、そしてこれらをプリカーサーとするSRMでの感度は、ピリジン環のプロトン親和力に相関すると考えられるが、未だ推測の域を出ない。

これまで検討したピリジンカルボン酸エステルの中で、ステロイド水酸基への反応性、プロトン化分子の出現頻度およびHPLCの逆相モードにお

ける質量分布比や検出感度などを総合的に評価すると、PAエステルが最も優れており、この誘導体化を中心に、血清中や尿中に存在が推定されるできるだけ多くのステロイド分子を一斉に分析し得るtargeted steroidomics解析法を構築中である。 Δ^5 -3 β -OH基に対して、PAエステル誘導体は、他のステロイドのように期待した感度が現在得られていないが、FAエステル誘導体⁷¹⁾とすることにより、この問題は解決されることから、PAエステル誘導体に加え、FAエステルもさらなるtargeted steroidomics解析の感度向上に有用な誘導体として期待が持てる。以上述べた誘導体化に関する総説は成書を参照されたい。^{70,72)}

REFERENCES

- 1) Wolters D. A., Wasburn M. P., Yates J. R., *Anal. Chem.*, **73**, 5683–5690 (2001).
- 2) Fournier M. L., Gilmore J. M., Martin-Brown S. A., Wasburn M. P., *Chem. Rev.*, **107**, 3654–3686 (2007).
- 3) Griffiths W. J., Karu K., Hornshaw M., Woffendin G., Wang Y., *Eur. J. Mass Spectrom.*, **13**, 45–50 (2007).
- 4) Griffiths W. J., Hornshaw M., Woffendin G., Baker S. F., Lockhart A., Heidelberger S., Gistafsson M., Sjövall

- J., Wang Y., *J. Proteome Res.*, **7**, 3602–3612 (2008).
- 5) Ceglarek U., Shackleton C. H. L., Stanczyk., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **121**, 479–480 (2010).
- 6) Sakauchi N., Horning E. C., *Anal. Lett.*, **4**, 41–52 (1971).
- 7) Ballie T. A., Brooks C. J. W., Middleditch., *Anal. Chem.*, **44**, 30–37 (1972).
- 8) Shackleton C., *J. Chromatogr.*, **379**, 91–156 (1986).
- 9) Griffiths W. J., Schackleton C. H. L., Sjövall J., The Encyclopedia of Mass Spectrometry (Elsevier, Amsterdam), 447–473 (2006).
- 10) Shimada K., Mitamura K., Higashi T., *J. Chromatogr. A*, **935**, 516–524 (2001).
- 11) Diallo S., Lecanu L., Greeson J., Papadopoulos V., *Anal. Biochem.*, **324**, 123–130 (2004).
- 12) Phillipou G., Bigham D. A., Seamark R. F., *Steroids*, **26**, 516–524 (1975).
- 13) Kelly R. W., Taylor P. L., *Anal. Chem.*, **48**, 465–467 (1976).
- 14) Miyazaki H., Ishibashi M., Itoh M., Nambara T., *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 23–35 (1977).
- 15) Miyazaki H., Ishibashi M., Yamashita K., *Biomed. Mass Spectrom.*, **5**, 469–476 (1978).
- 16) Miyazaki H., Ishibashi M., Yamashita K., *Biomed. Mass Spectrom.*, **6**, 57–62 (1979).
- 17) Miyazaki H., Ishibashi M., Itoh M., Yamashita K., *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 377–382 (1984).
- 18) Watanabe N., Goda R., Ochiai H., Yamashita K., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 367–375 (1997).
- 19) Krone N., Highes B. A., Lavery G. C., Stewart P. M., Arlt W., Shackleton C. H. L., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **121**, 496–504 (2010).
- 20) Quirke J. M. E., Adams C. L., Van Berkel G. J., *Anal. Chem.*, **66**, 1302–1315 (1994).
- 21) Griffiths W. J., Liu S., Alvelius G., Sjövall J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 924–935 (2003).
- 22) Griffiths W. J., Wang Y., Alvelius G., Liu S., Bodin K., Sjövall J., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**, 341–362 (2006).
- 23) Nakagawa Y., Hashimoto Y., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**, 593–599 (2002).
- 24) Liu S., Sjövall J., Griffiths W. J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 390–400 (2000).
- 25) Yamashita K., Kobayashi S., Tsukamoto S., Numazawa M., *Steroids*, **72**, 50–59 (2007).
- 26) Xu X., Veenstra T. D., Fox S. D., Roman J. M., Issaq H. J., Falk R., Saavedra J. E., Keefer L. K., Ziegler R. G., *Anal. Chem.*, **77**, 6646–6654 (2005).
- 27) Singh G., Gutierrez A., Xu K., Blair I A., *Anal. Chem.*, **72**, 3007–3013 (2000).
- 28) Higashi T., Takayama N., Nishio T., Taniguchi E., Shimada K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 658–665 (2006).
- 29) Lin Y. H., Chen C. Y., Wang G. S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 1973–1983 (2007).
- 30) Yang W. C., Regnier F. E., Sliva D., Adamec J., *J. Chromatogr. B*, **870**, 233–240 (2008).
- 31) Nishio T., Higashi T., Funaiishi A., Tanaka J., Shimada K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 786–795 (2007).
- 32) Blair I. A., *Steroids*, **75**, 297–306 (2010).
- 33) Salvador A., Moretton C., Piram A., Faure R., *J. Chromatogr. A*, **1145**, 102–109 (2007).
- 34) Xu L., Spink D. C., *Anal. Biochem.*, **375**, 105–114 (2008).
- 35) Lee S. H., Williams M. V., Dubois R. N., Blair I. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2168–2176 (2003).
- 36) Penning T. M., Lee S. H., Jin Y., Gutierrez A., Blair I. A., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **72**, 50–59 (2007).
- 37) Yamashita K., Okuyama M., Watanabe Y., Honma S., Kobayashi S., Numazawa M., *Steroids*, **72**, 819–827 (2007).
- 38) Yamashita K., Kawahata T., Takahashi M., Numazawa M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **57**, 75–80 (2009).
- 39) Nishiyama T., Hashimoto Y., Takahashi K., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 7121–7126 (2004).
- 40) Higashi T., Yamauchi A., Shimada K., *J. Chromatogr. B*, **825**, 214–222 (2005).
- 41) Higashi T., Shibayama Y., Shimada K., *J. Chromatogr. B*, **846**, 196–201 (2007).
- 42) Shibayama Y., Higashi T., Shimada K., Odani A., Mizokami A., Konaka H., Koh E., Namiki M., *J. Chromatogr. B*, **877**, 2615–2623 (2009).
- 43) Licea-Perez H., Wang S., Szapacs M. E., Yang E., *Steroids*, **73**, 601–610 (2008).
- 44) Yamashita K., Miyashiro Y., Maekubo H., Okuyama M., Honma S., Takahashi M., Numazawa M., *Steroids*, **74**, 920–926 (2009).
- 45) Kalthorn T. F., Page S. T., Howald W. N., Mostaghel

- E. A., Nelson P. S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 3200–3206 (2007).
- 46) Higashi T., Nishio T., Hayashi N., Shimada K., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 662–665 (2007).
- 47) Weng Y., Xie F., Xu L., Zagorevski D., Spink D. C., Ding X., *Anal. Biochem.*, **402**, 121–128 (2010).
- 48) Niwa M., Watanabe N., Ochiai H., Yamashita K., *J. Chromatogr. B*, **824**, 258–266 (2005).
- 49) Guo T., Taylor R. L., Singh R. J., Soldin S. J., *Clin. Chim. Acta*, **372**, 76–82 (2006).
- 50) Raffaelli A., Saba A., Vignali E., Marcocci C., Salvadori P., *J. Chromatogr. B*, **830**, 278–285 (2006).
- 51) Turpeinen U., Markkanen H., Sane T., Hämäläinen., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **66**, 147–60 (2006).
- 52) Higashi T., Nagahama A., Otomi N., Shimada K., *J. Chromatogr. B*, **848**, 188–199 (2007).
- 53) Higashi T., Yokoi H., Maekubo H., Honda A., Shimada K., *Steroids*, **72**, 865–874 (2007).
- 54) Higashi T., Nishio T., Uchida S., Shimada K., Fukushi M., Maeda M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 177–182 (2008).
- 55) Yamashita K., Takahashi M., Tsukamoto S., Numazawa M., *J. Chromatogr. A*, **1173**, 120–128 (2007).
- 56) Yamashita K., Nakagawa R., Okuyama M., Honma S., Takahashi M., Numazawa M., *Steroids*, **73**, 727–737 (2007).
- 57) Yamashita K., Tadokoro Y., Takahashi M., Numazawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 873–877 (2008).
- 58) Yamashita K., Okuyama M., Nakagawa R., Honma S., Satoh F., Morimoto R., Ito S., Takahashi M., Numazawa M., *J. Chromatogr. A*, **1200**, 114–121 (2008).
- 59) Cohen A., Hertz H. S., Mandel J., Paule R. C., Schaffer R., Sniegowski L. T., Sun T., Welch M. J., White V. E., *Clin. Chem.*, **26**, 854–860 (1980).
- 60) Dzeletovic S., Breuer O., Lund E., Diczfalusy U., *Anal. Biochem.*, **225**, 73–80 (1995).
- 61) Ahmida H. S., Bertucci P., Franzo L., Massoud R., Cortese C., Lala A., Federici G., *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **842**, 43–47 (2006).
- 62) Ruan B., Wilson W. K., Pang J., Gerst N., Pinkerton F. D., Tsai J., Kelley R. I., Whitby F. G., Milewicz D. M., Garbern J., Schroepfer Jr. G. J., *J. Lipid Res.*, **42**, 799–812 (2001).
- 63) Tian Q., Failla M. L., Bohn T., Schwartz S. J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3056–3060 (2006).
- 64) Manini P., Andreoli R., Careri M., Elviri L., Musci M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 883–889 (1998).
- 65) Van Berkel G. J., Quirke J. M. E., Tigani R. A., Dilley A. S., Covey T. R., *Anal. Chem.*, **70**, 1544–1554 (1998).
- 66) Honda A., Yamashita K., Numazawa M., Ikegami T., Doy M., Matsuzaki Y., Miyazaki H., *J. Lipid Res.*, **48**, 458–464 (2007).
- 67) Honda A., Yamashita K., Miyazaki H., Shirai M., Ikegami T., Xu G., Numazawa M., Hara T., Matsuzaki Y., *J. Lipid Res.*, **49**, 2063–2073 (2008).
- 68) Honda A., Yamashita K., Hara T., Ikegami T., Miyazaki T., Shirai M., Xu G., Numazawa M., Matsuzaki Y., *J. Lipid Res.*, **50**, 350–357 (2009).
- 69) Honda A., Miyazaki T., Ikegami T., Iwamoto J., Yamashita K., Numazawa M., Matsuzaki Y., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **121**, 556–564 (2010).
- 70) Honma S., Okuyama M., Yamashita K., *J. Med. Tech.*, **52**, 1165–1175 (2008).
- 71) Yamashita K., Komatsu S., Takahashi M., Numazawa M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 249–253 (2010).
- 72) Yamashita K., Numazawa M., *Handbook on Mass Spectrometry: Instrumentation, Data and Analysis, and Application.* ed. by Lang J K., (Novapublishers Inc.), 459–453 (2009).