

ステロイド化合物のメトキシム／トリメチルシリル 誘導体のマススペクトル

(マススペクトル／ステロイド)

福島 正充*, 青山 美子**, 仲田富士徳**

Mass Spectra of Steroid Compounds
Methoxime Trimethylsilyl Derivatives

(mass spectrum/steroid)

Shoju FUKUSHIMA*, Yoshiko AOYAMA** and
Fujinori NAKADA**

Mass spectra of steroid compounds were observed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The samples were applied as methoxime-and/or trimethylsilyl-derivatives.

緒 言

生体試料中のステロイド化合物の同定や定量については既に多くの報文があり、血液や尿中のステロイド化合物の分析については幾つかの方法が確立されている。またこれらの試料中の微量ステロイド化合物の定量には、ラジオイムノアッセイ (RIA) のような優れた方法もあってナノグラム (ng), ピコグラム (pg) のオーダーでの測定も可能である。しかしながら精巢, 前立腺などのステロイドホルモン産生臓器, 標的臓器中のステロイド化合物の分析は試料の量が少ないこと, 前処理によってステロイド化合物を夾雑物から分離することの困難なことなどから, その分析は容易ではない。また RIA では目的とするステロイド化合物以外の測定はできないので, 測定するステロイドの種類の数だけ RIA 系を必要とすることになり, ときには他のステロイド化合物との cross reaction による測定値への障害が想定されることもある。

一方, マススペクトロメーター (MS) による分析は機器の性能の向上によって ng, pg のオーダーでの分析が可能であり, また一度に多種類のステロイドの検出が可能でもある。しかし, 前処理によって夾雑物からステロイドを分離することが必要でもある。ガスクロマトグラフィー (GC) は現在もっとも進歩した分離機器の一つであって, この両者の組合わせによる GC-MS はステロイド化合物の微量分析に有用な手段となりつつある。

著者らは生体試料中とくに精巢, 前立腺中のステロイド化合物の GC-MS による分析を意図して実験を行なっているが, これらの組織からステロイド化合物のみを分離することは大変困難で, とくに脂肪を除くことが難かしく目下種々の方法を試みている。

GC-MSによる分析ではステロイド化合物の熱による分解を防ぐために, ケト基はメトキ

* 実験実習機器センター
Central Research Laboratories*

** 化学教室
Department of Chemistry**

シム (MO), アルコール基はトリメチルシリル (TMS) 誘導体として分析することが有用な手段とされている。著者らも組織中のステロイド化合物の GC-MS による分析の指標として, ステロイド化合物の標品を MO/TMS 誘導体とし GC-MS によりそれらのマススペクトルを測定した。

使用機器, 実験条件および試薬

使用した GC は Hewlett Packard 社製 5710 A 型で 25m×0.24mm, OV-101のキャピラリーカラムを装着し, カラム温度200℃から300℃まで1分間2℃の昇温で, また MS は日本電子株式会社製 JMS-D300, JMA-2000S で分析条件は E1 法によりイオン化電圧 24 eV, イオン化電流 300 μ A, イオン源温度230℃, 加速電圧 3 KV で, M/Z 50-700 を 1.5秒でのスキャンニングを行った。

ステロイド化合物の標品は化学教室所有のものを再結晶, 薄層クロマトグラフィーなどにより精製して使用した。また有機溶媒などは市販の特級品を使用した。

ステロイド化合物の誘導体作製

ステロイド化合物のケト基のMO化は試料 5 μ g にピリジン 100 μ l, Methoxyamine Hydrochloride 1.5 mg を加え, 60℃で1時間加温した後, N₂ 気流中溶媒を蒸発乾固した。またアルコール基の TMS化は上記 MO化物, またはステロイド標品 5 μ g にピリジン 100 μ l, N,O-bis-(trimethylsilyl) -trifluoroacetamide 20 μ l, Trimethylchlorosilane 5 μ l を加え, 室温で1夜放置するか, 或いは100℃で2時間加温した後, N₂ 気流中溶媒を蒸発乾固した。これらは 100 μ l のヘキサンに溶解し, その 1 μ l を GC に注入した。

考 察

ステロイド化合物の GC-MS による検出にはこの実験条件で M/Z 50-700 のスキャンニングでも 50 ng を GC に注入すれば十分検出することが可能で, マスフラグメントグラフィーならば pg での検出が可能と思われる。

それぞれのステロイド化合物はこの実験条件でケト基は MO 化, アルコール基は TMS 化されたが, C-11 β 位のアルコール基は一部, また C-11 位のケト基は大部分誘導体化されなかった。

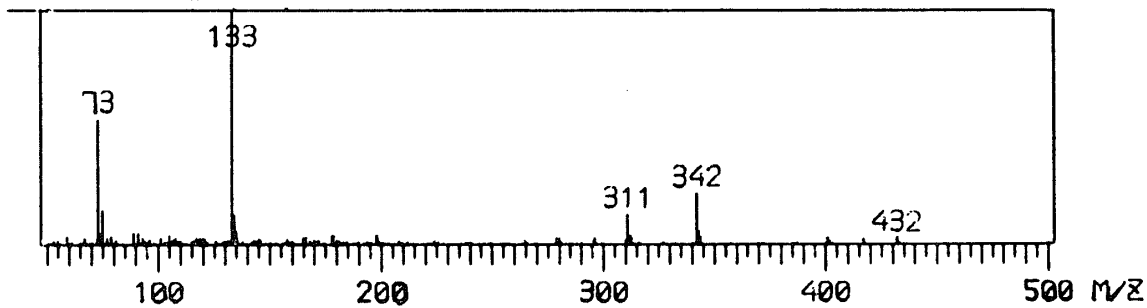
得られたマススペクトルはそれぞれに特有の開裂イオンのスペクトルを示しており, こんごのステロイド化合物の分析に有用な資料となると考える。

参 考 文 献

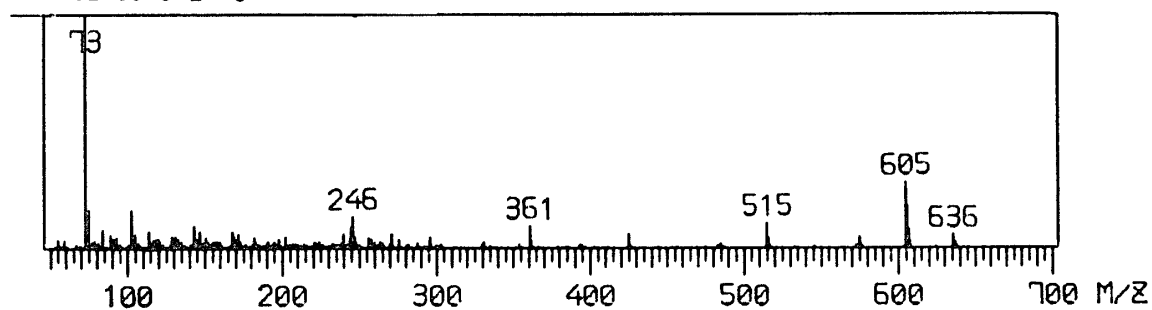
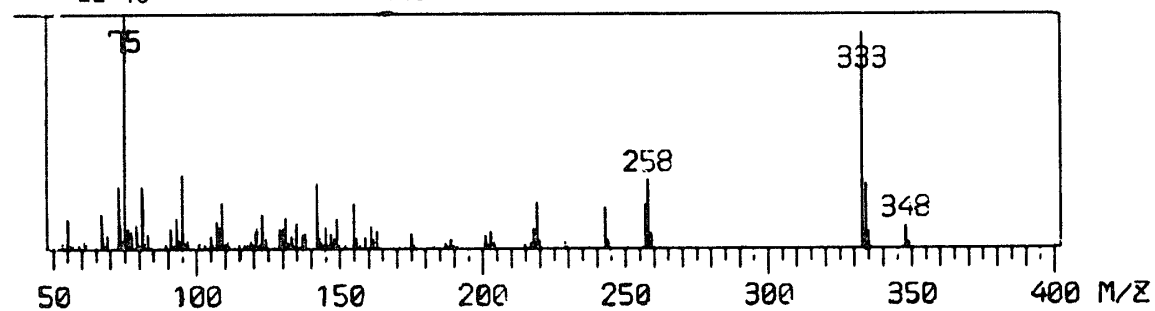
- 1) E. C. Horning and M. G. Horning: Human Metabolic Profiles Obtained by GC and GC/MS. *J. Chromatographic Science* **9**, 129-140 (1971)
- 2) M. Axelson and J. Sjövall: Separation and Computerized Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Unconjugated Neutral Steroids in Plasma. *J. Steroid Biochemistry* **5**, 733-738 (1974)
- 3) 立松晃, 宮崎浩, 鈴木眞吾著: 医学と薬学のためのマススペクトロメトリー, 講談社, 昭和50年
- 4) M. Axelson and J. Sjövall: Analysis of Unconjugated Steroids in Plasma by Liquid-Gel Chromatography and Glass Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Steroid Biochemistry* **8**, 683-692 (1977)
- 5) M. A. Quilliam and J. B. Westmore: Mass Spectra of Sterically Crowded Trialkylsilyl Ether Derivatives of Steroids. *Steroids* **29**, 579-611 (1977)
- 6) 平本眞介: ガスクロマトグラフィーによる小児尿中ステロイドの分析, 米子医誌29巻, 275-298 (1979)
- 7) J. Sjövall: Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Studies of Steroids, Bile Acids and Bile Alcohols. 医用マス研究会講演集 **8** 巻, 29-45 (1983)
- 8) 市村一義ほか: Capillary column-GC/MSによるステロイドの同時測定—先天性副腎過形成の診断. 医用マス研究会講演集, **9** 巻, 183-186 (1984)
- 9) 市村一義, 野崎一義, 加藤精彦: GC/MSに依る血中副腎ステロイドの同時測定法. 医用マス研究会講演集, **10** 巻, 27-34 (1985)

Fig. Mass spectra of steroid compounds.

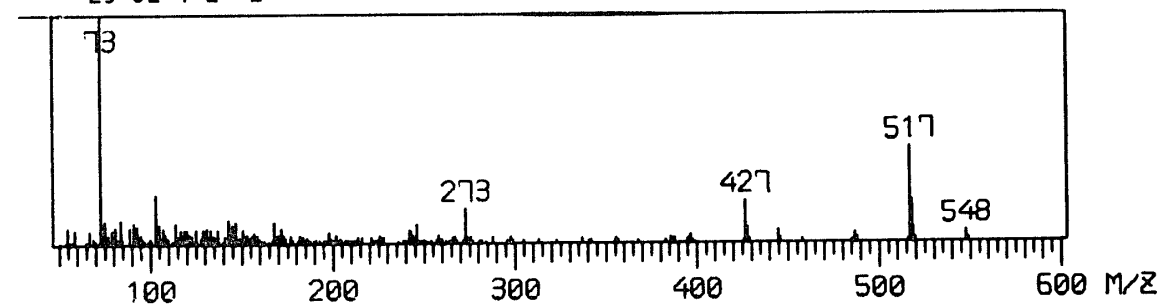
The samples were introduced as MO—and/or TMS—derivatives in the GC-MS. A 25m×0.24 mm fused silica capillary column coated with OV-101 was attached to the GC instrument. The mass spectrometer was operated with a trap current of 300 μ A and ionizing voltage of 24 eV. The temperature of the source was 230°C.

1 α -Hydroxy-4-androstene-3,17-dione $C_{24}H_{40}O_3N_2Si$ MW=432

Hydrocortisone (Cortisol)

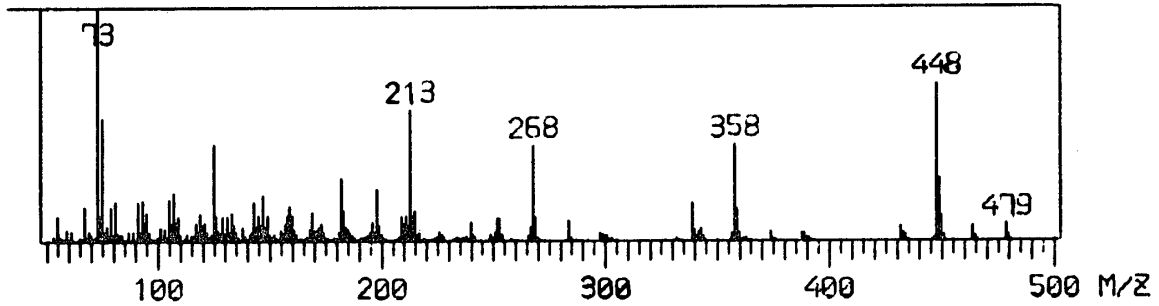
 $C_{32}H_{60}O_5N_2Si_3$ MW=6363 β -Hydroxy-5 α -androstane $C_{22}H_{40}OSi$ MW=348

Reichstein's Compound "S"

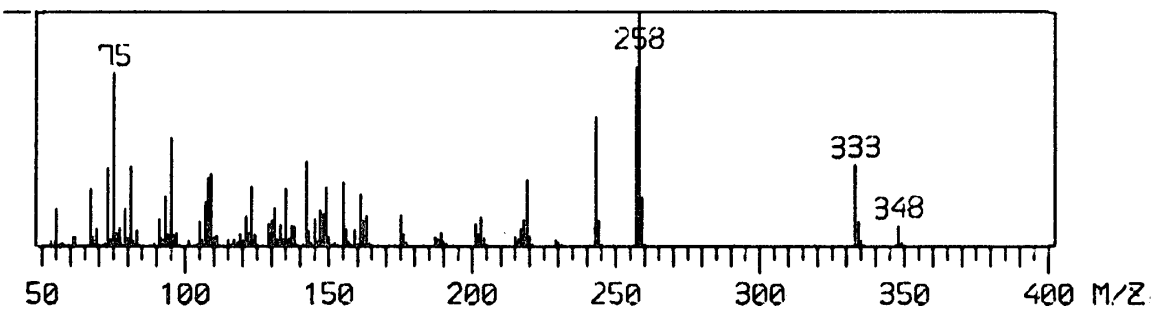
 $C_{29}H_{52}O_4N_2Si_2$ MW=548

3 α ,11 β -Dihydroxy-5 α -androstan-17-oneC₂₆H₄₉O₃NSi₂

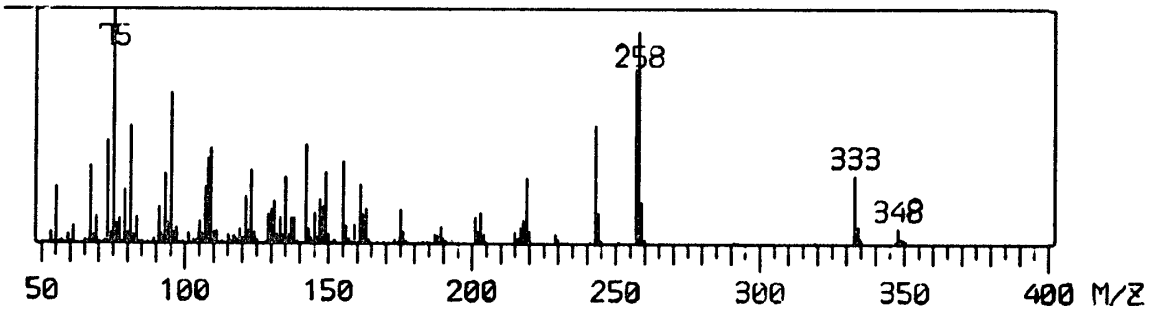
MW=479

3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-oneC₂₂H₄₀O₃Si

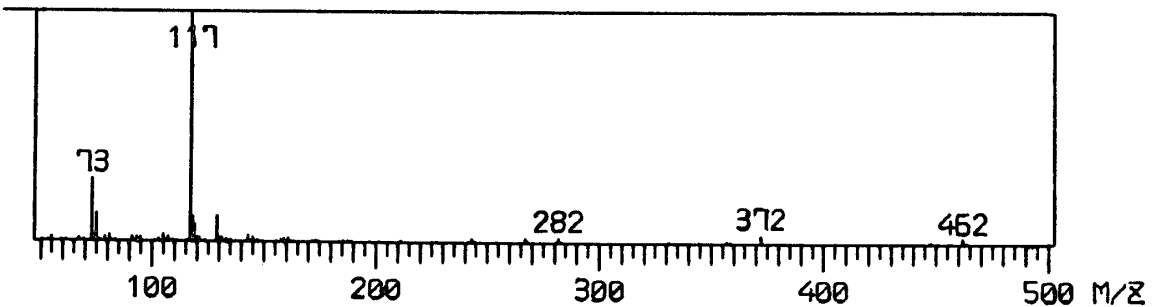
MW=348

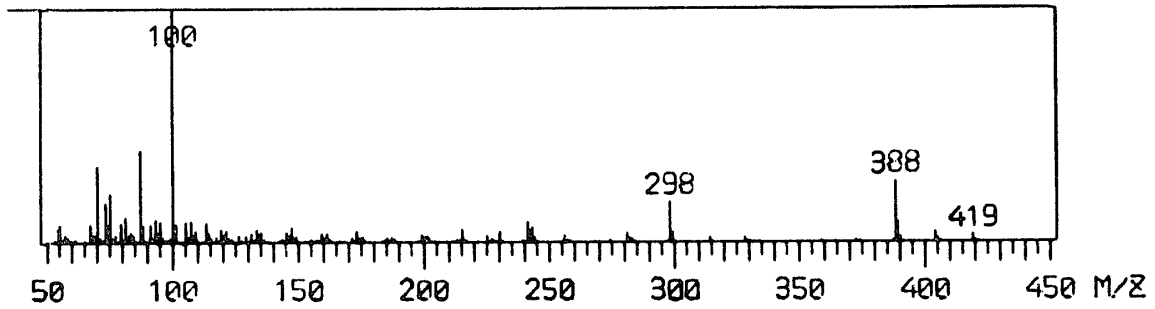
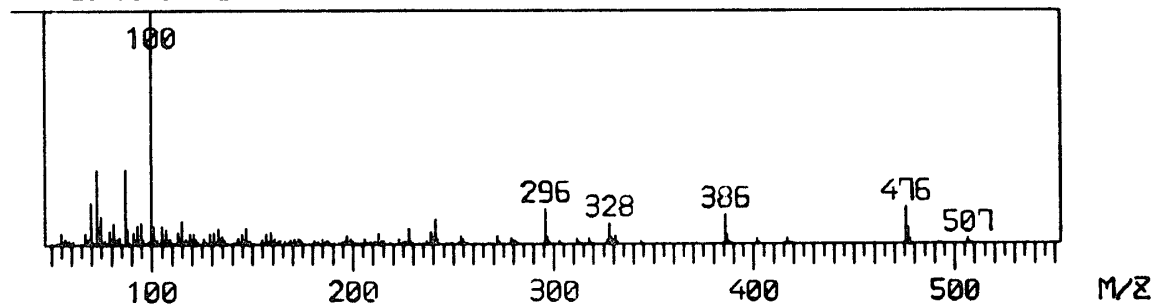
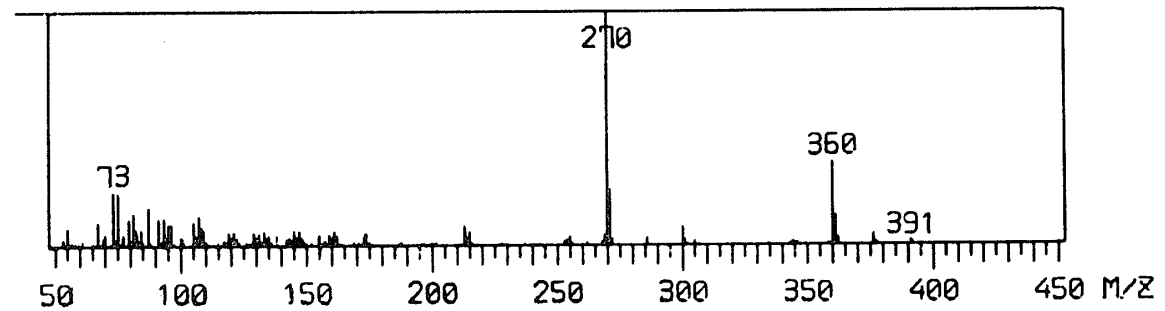
3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-oneC₂₂H₄₀O₃Si

MW=348

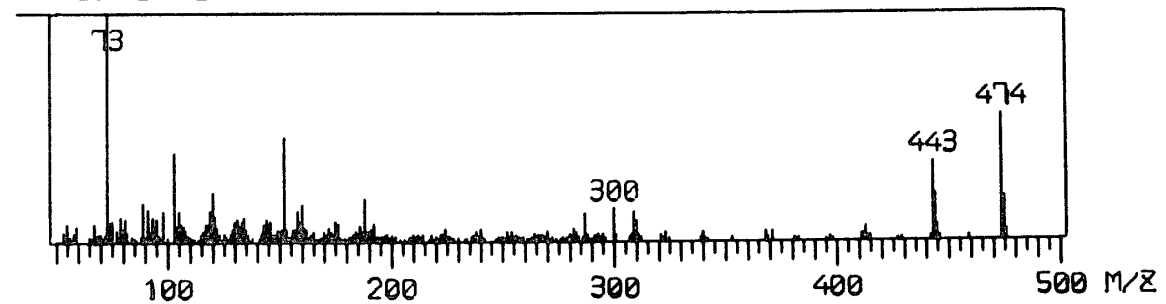
3 β ,20 α -Dihydroxy-5-pregneneC₂₇H₅₀O₂Si₂

MW=462

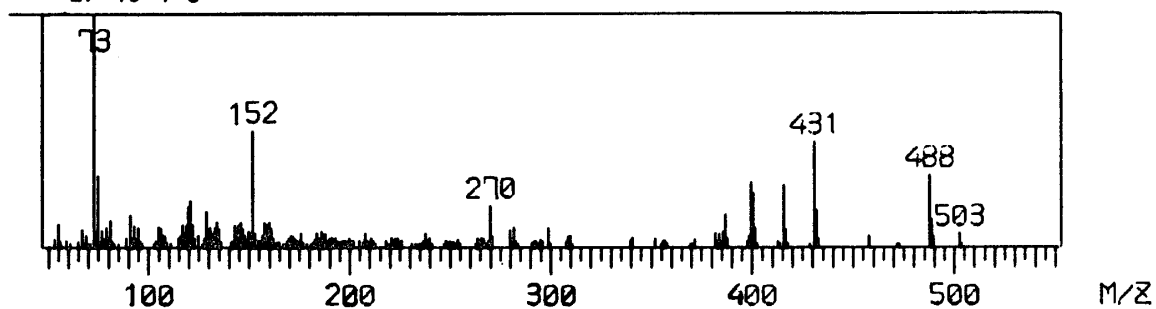
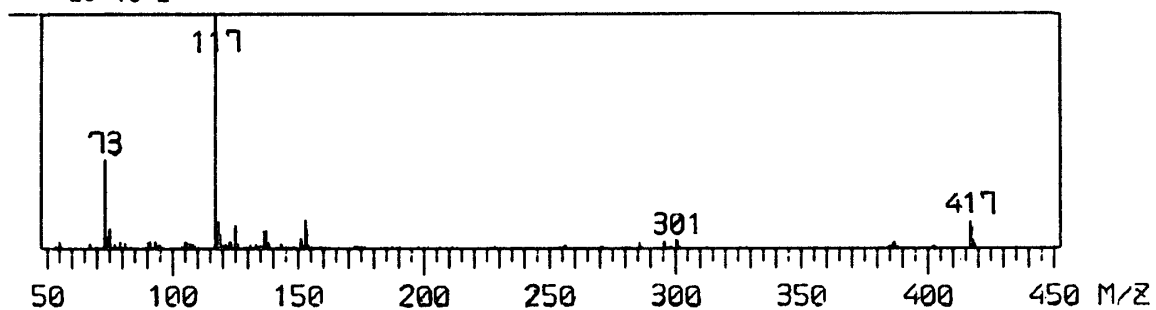


3 α -Hydroxy-5 β -pregnan-20-one $C_{25}H_{45}O_2NSi$ MW=4193 α ,6 α -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-one $C_{28}H_{53}O_3NSi_2$ MW=5073 β -Hydroxy-5 β -androstan-17-one $C_{23}H_{41}O_2NSi$ MW=391

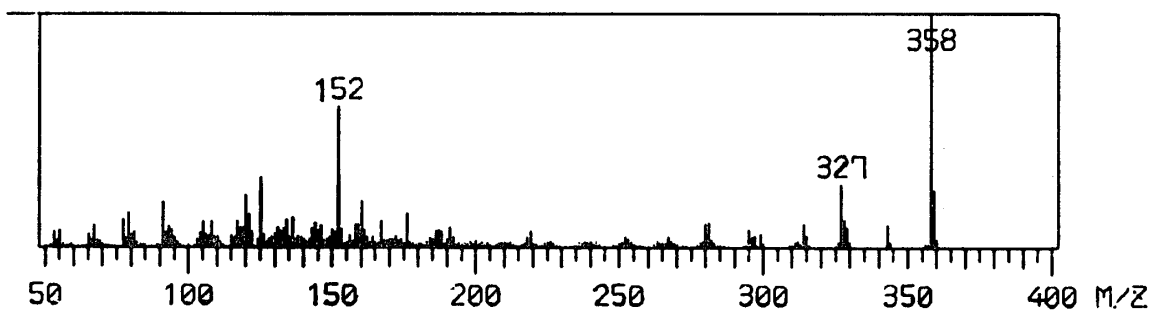
11-Dehydrocorticosterone

 $C_{26}H_{42}O_4N_2Si$ MW=474

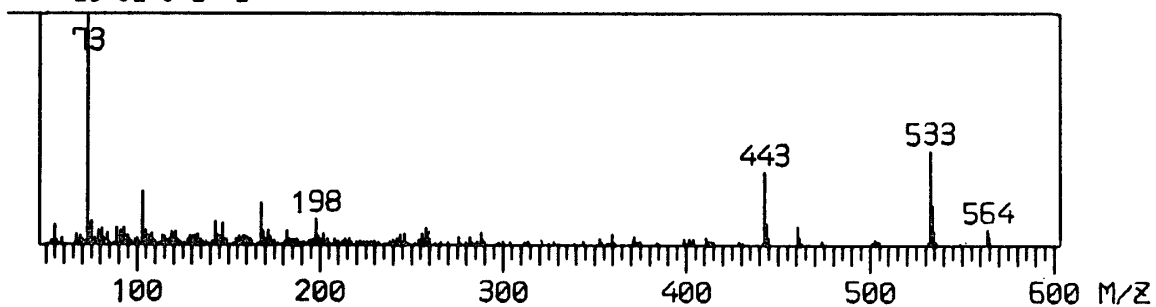
11-Dehydrocorticosterone

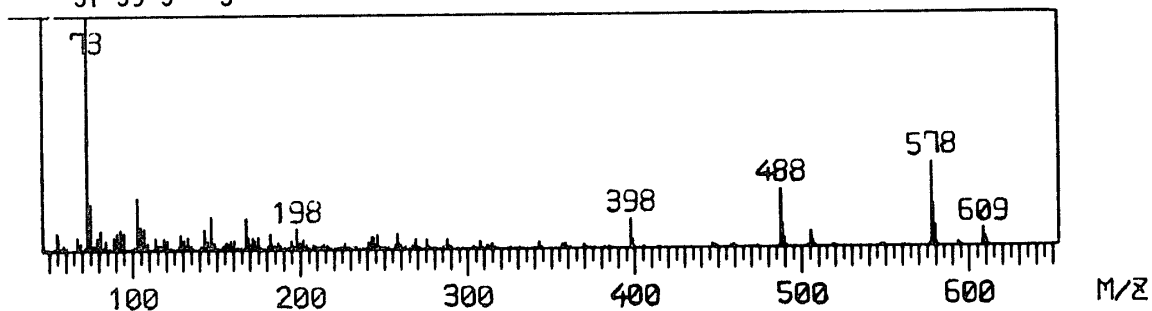
 $C_{27}H_{45}O_4N_3Si$ MW=50320 α -Hydroxy-4-pregnen-3-one $C_{25}H_{43}O_2NSi$ MW=417

4-Androstene-3,11,17-trione

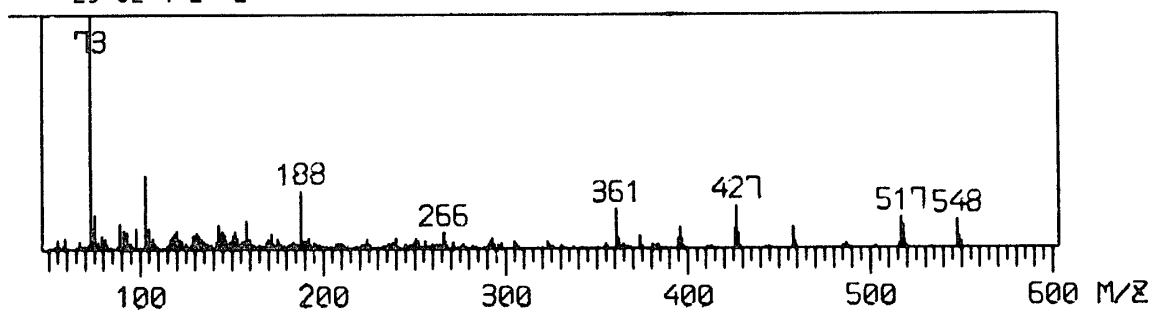
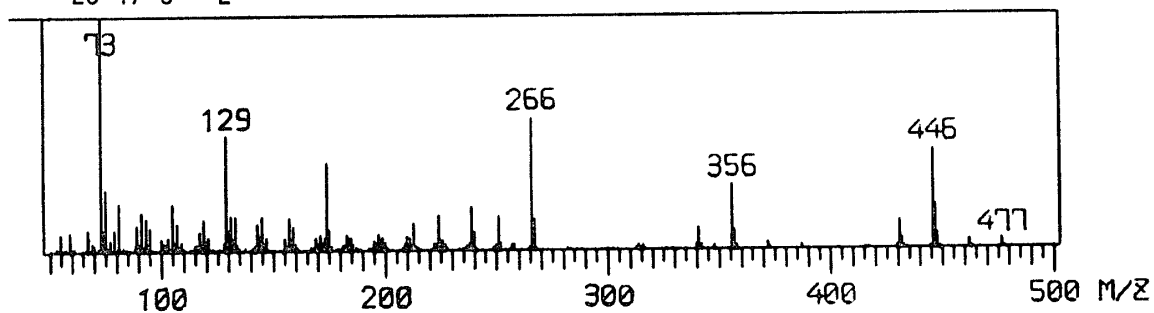
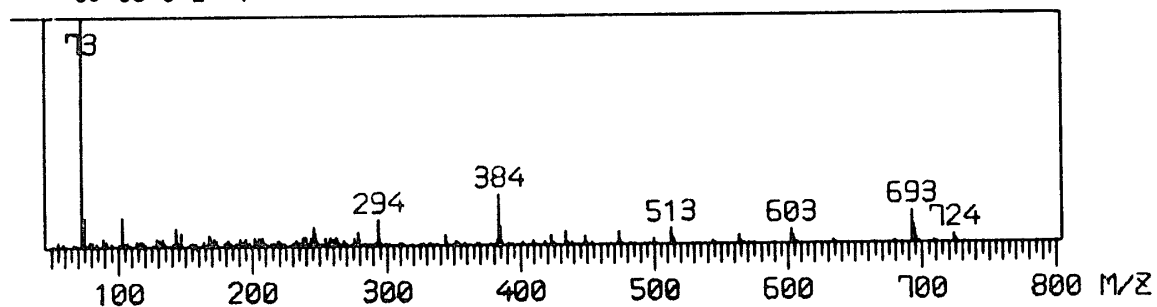
 $C_{21}H_{30}O_3N_2$ MW=358

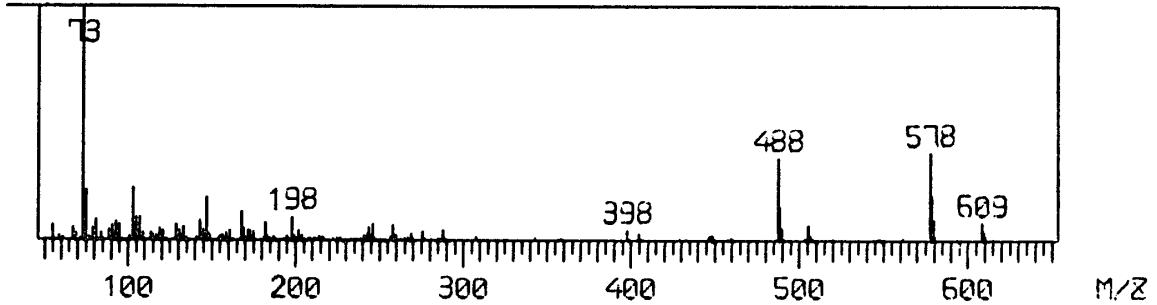
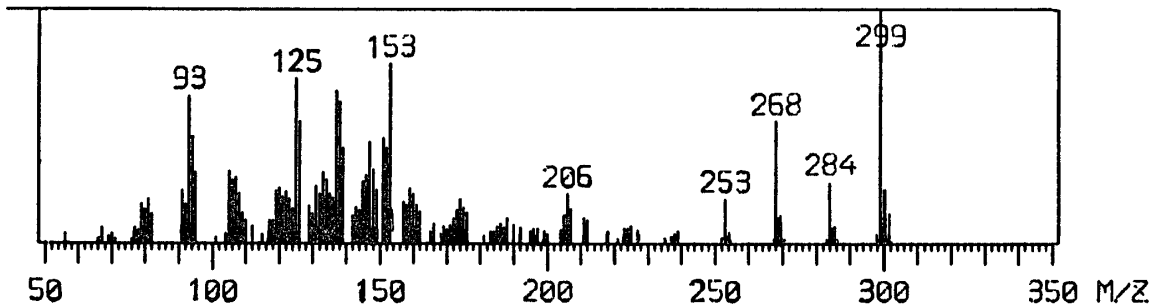
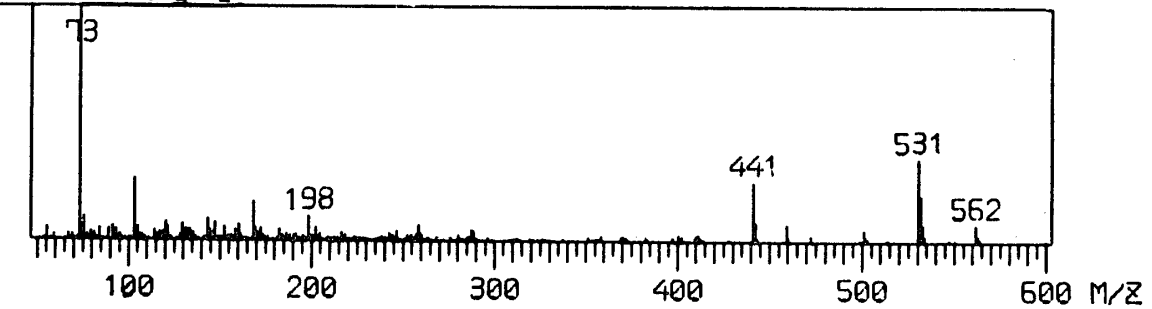
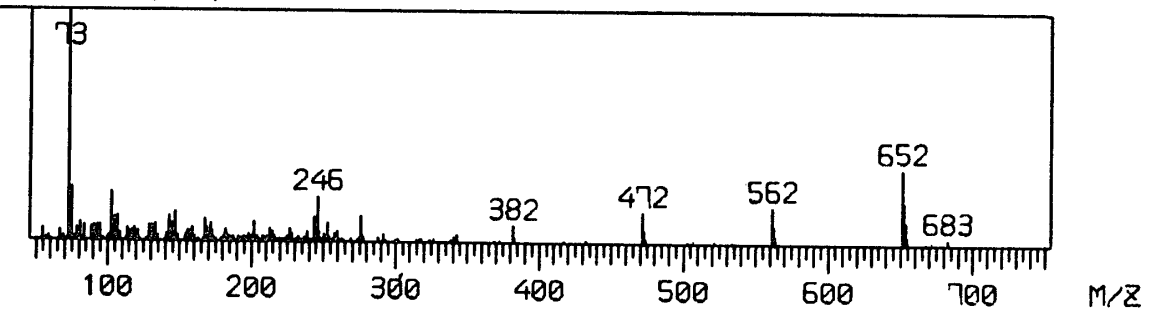
Dihydrocortisone

 $C_{29}H_{52}O_5N_2Si_2$ MW=564

3 α ,17 α ,21-Trihydroxy-5 β -pregnane-11,20-dione (THE) $C_{31}H_{59}O_5NSi_3$ MW=609

Corticosterone

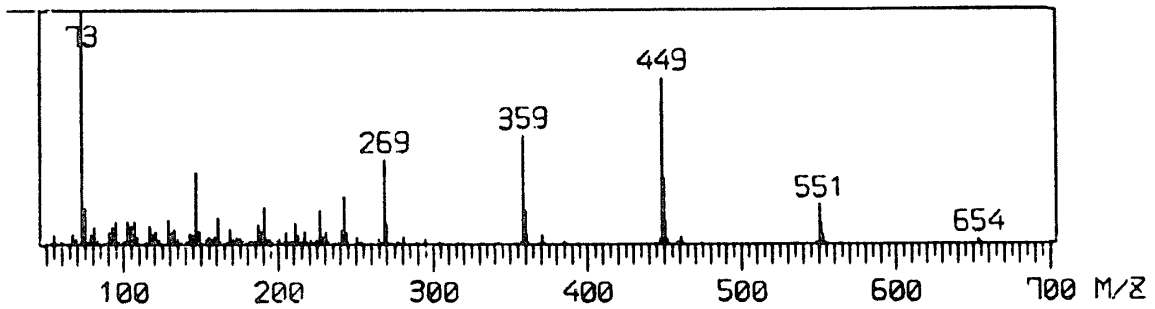
 $C_{29}H_{52}O_4N_2Si_2$ MW=54816 α -Hydroxy-dehydroisoandrosterone $C_{26}H_{47}O_3NSi_2$ MW=4776 β -Hydroxy-hydrocortisone $C_{35}H_{68}O_6N_2Si_4$ MW=724

3 α ,17 α ,21-Trihydroxy-5 α -pregnane-11,20-dione (Allo-THE)**C₃₁H₅₉O₅NSi₃ MW=609****Androsta-4,16-dien-3-one****C₂₀H₂₉O_N MW=299****17 α ,21-Dihydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione (Cortisone)****C₂₉H₅₀O₅N₂Si₂ MW=562****3 α ,11 β ,17 α ,21-Tetrahydroxy-5 α -pregnan-20-one (Allo-THF)****C₃₄H₆₉O₅NSi₄ MW=683**

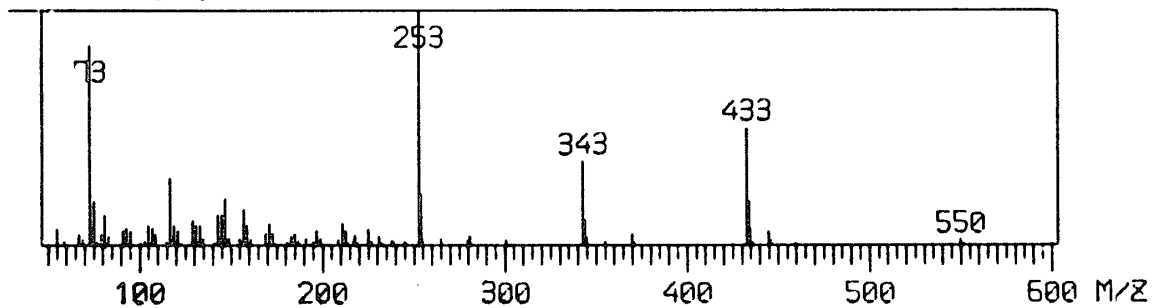
Cortolone

 $C_{33}H_{66}O_5Si_4$

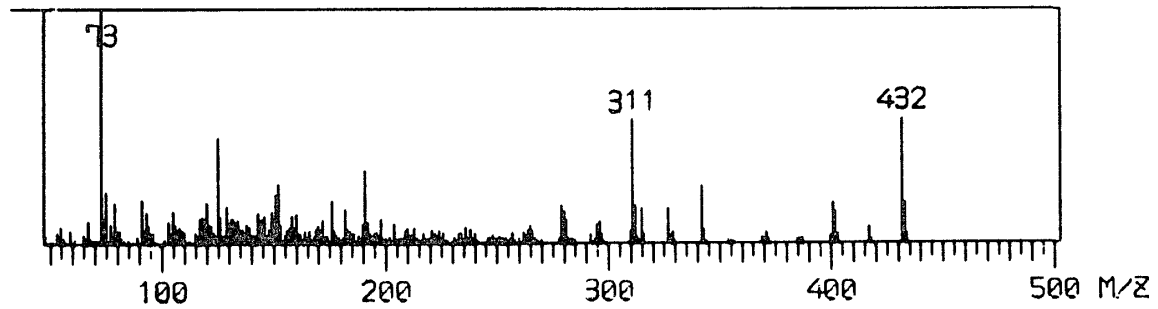
MW=654

 $3\beta,17\alpha,20\beta$ -Trihydroxy-5-pregnene $C_{30}H_{58}O_3Si_3$

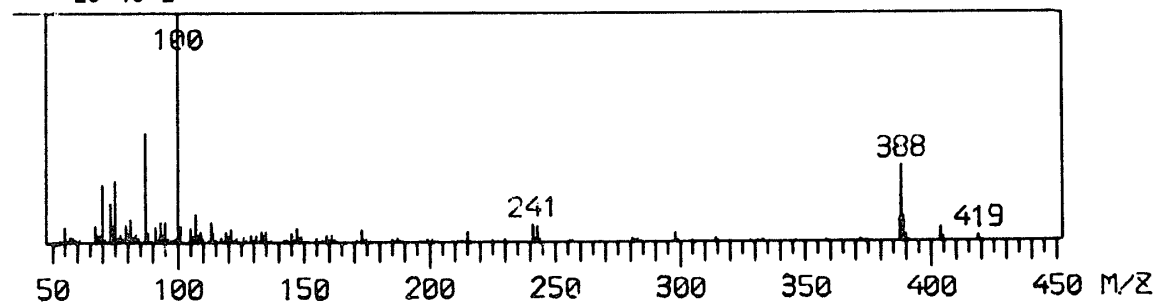
MW=550

 11β -Hydroxy-4-androstene-3,17-dione $C_{24}H_{40}O_3N_2Si$

MW=432

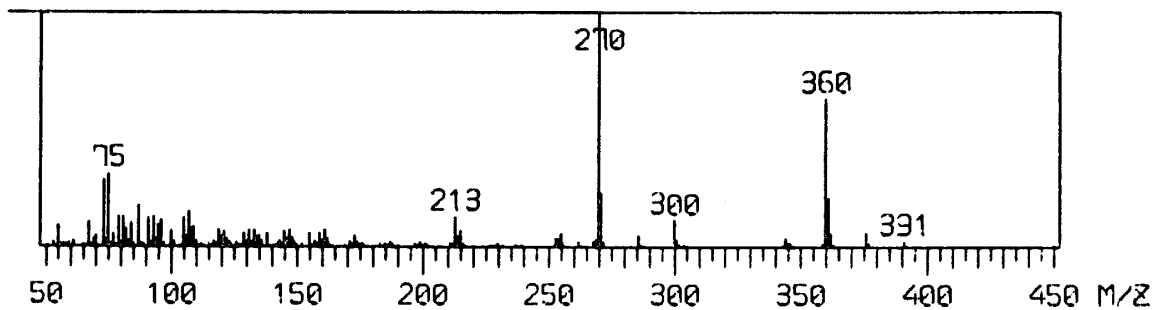
 3β -Hydroxy-5 α -pregnan-20-one $C_{25}H_{45}O_2NSi$

MW=419

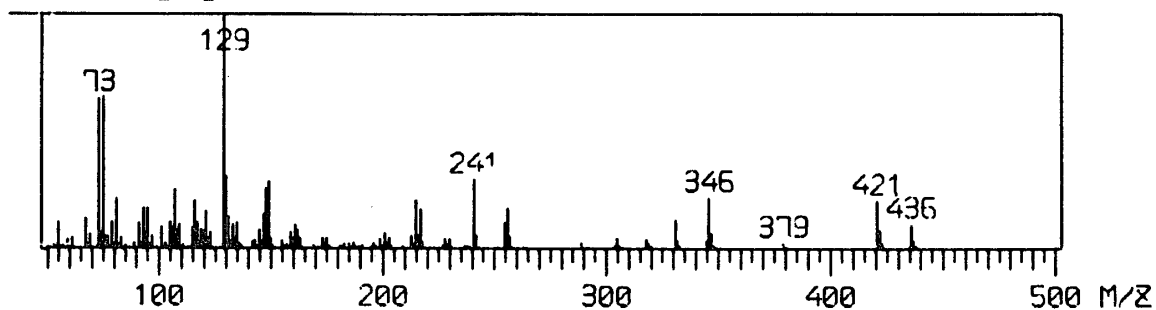


3 α -Hydroxy-5 α -androstane-17-one (Androsterone)C₂₃H₄₁O₂NSi

MW=391

3 β ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstaneC₂₅H₄₈O₂Si₂

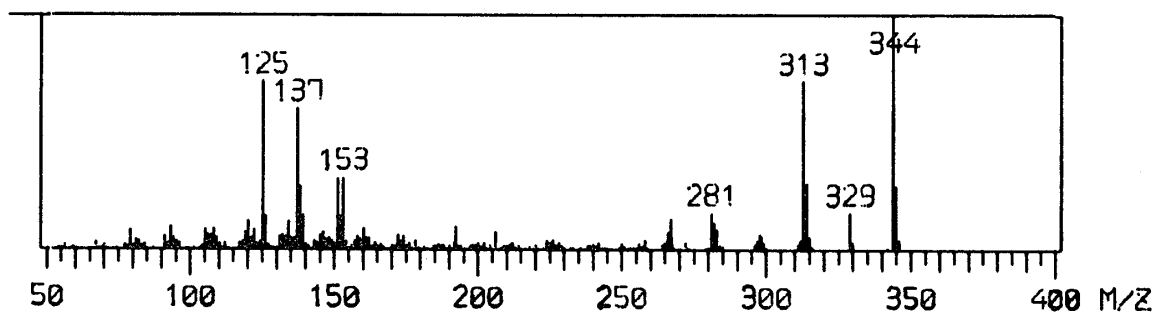
MW=436



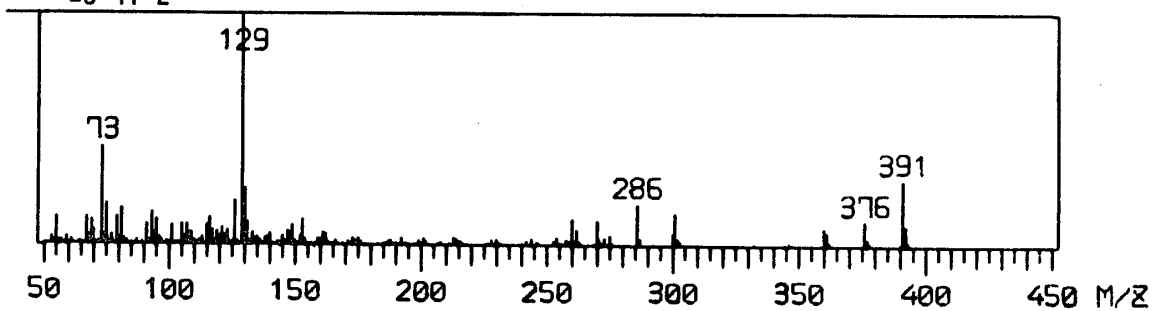
4-Androstene-3,17-dione

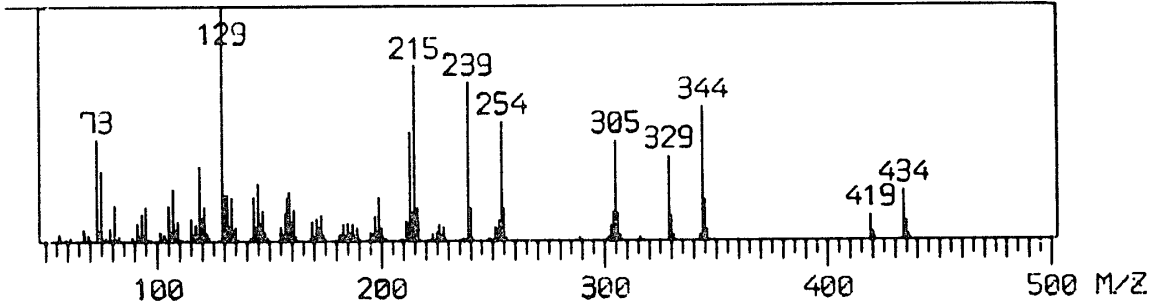
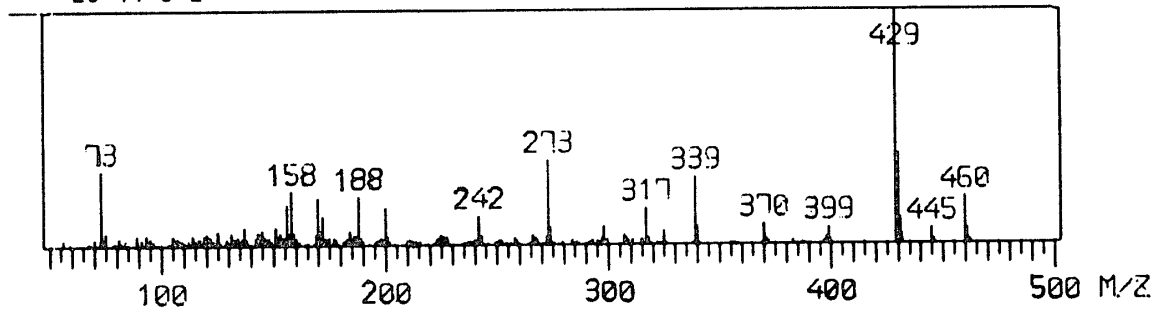
C₂₁H₃₂O₂N₂

MW=344

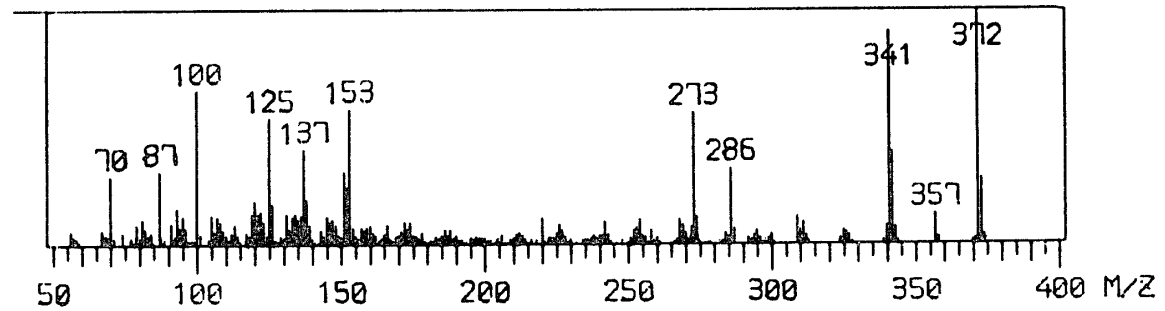
17 β -Hydroxy-5 α -androstane-3-one (5 α -Dihydrotestosterone)C₂₃H₄₁O₂NSi

MW=391

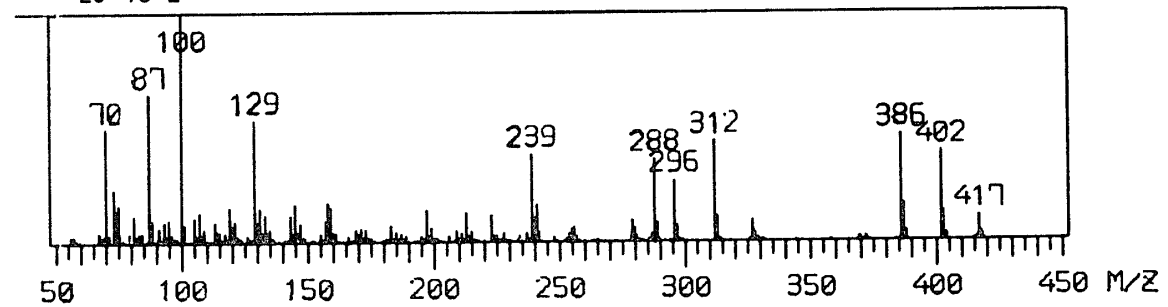


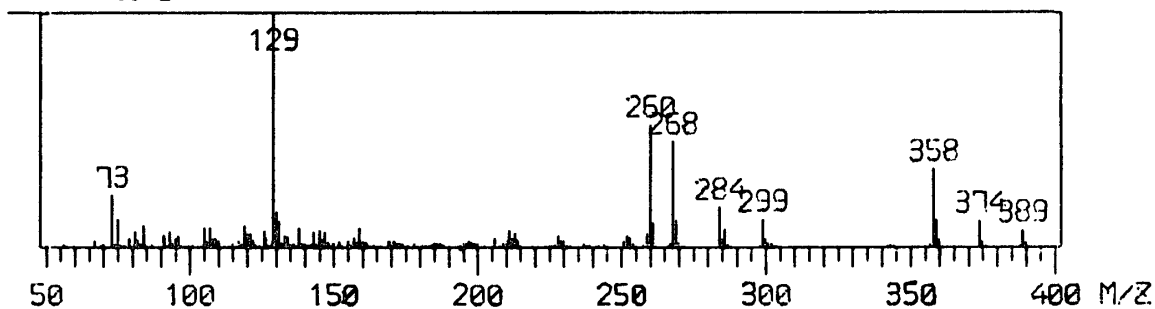
3 β ,17 β -Dihydroxy-5-androsteneC₂₅H₄₆O₂Si₂ MW=43417 α -Hydroxy-progesteroneC₂₆H₄₄O₃N₂Si MW=460

Progesterone

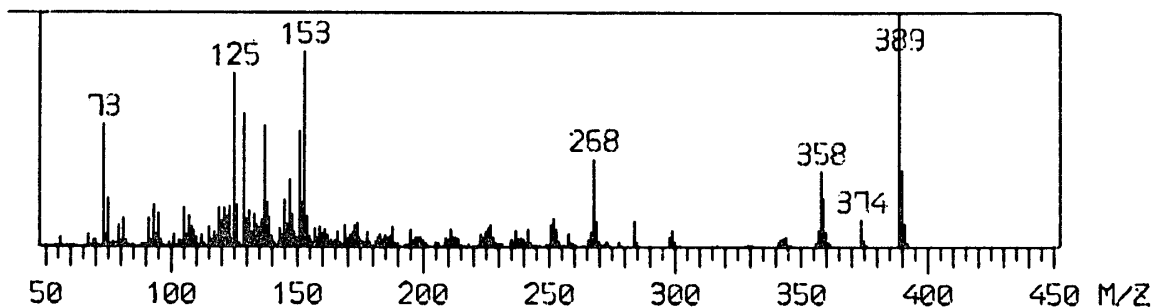
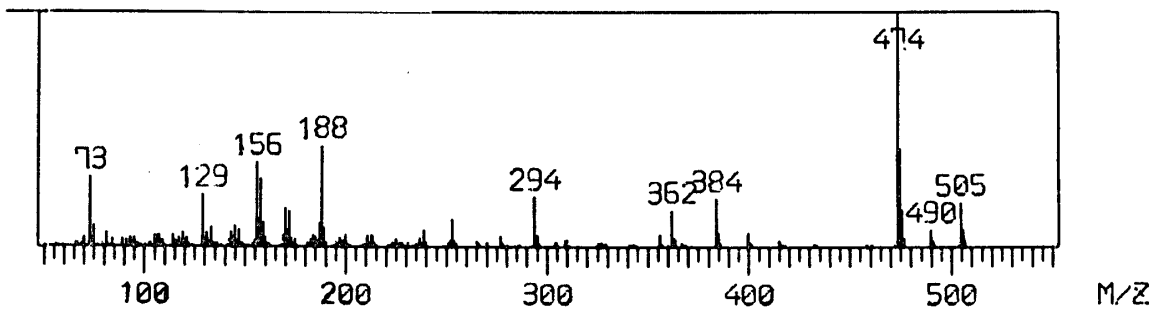
C₂₃H₃₆O₂N₂ MW=372

Pregnenolone

C₂₅H₄₃O₂NSi MW=417

3 β -Hydroxy-5-androsten-17-one (DHA) $C_{23}H_{39}O_2NSi$ MW=389

Testosterone

 $C_{23}H_{39}O_2NSi$ MW=38917 α -Hydroxy-pregnenolone $C_{28}H_{51}O_3NSi_2$ MW=505

1-Dehydrotestosterone

 $C_{23}H_{37}O_2NSi$ MW=387