

## 安定同位体希釈法と選択的イオンモニタ法を 組合せた微量ステロイドの一斉分析

(安定同位体希釈法/SIM/ステロイド)

福島 正充\*, 漆谷 弘子\*\*, 赤根 敦\*\*\*, 松原 和夫\*\*\*  
福井 有公\*\*\*, 仲田富士徳\*\*

### Simultaneous Microanalysis of Steroids by Combined Method of Isotope Dilution Technique and Selected Ion Monitoring

(isotope dilution technique/SIM/steroid)

Shoju FUKUSHIMA\*, Hiroko URUSHIDANI\*\*, Atsushi AKANE\*\*\*,  
Kazuo MATSUBARA\*\*\*, Yuko FUKUI\*\*\* and Fujinori NAKADA\*\*

(Received December 2, 1986)

The simultaneous microanalysis of steroids was examined using a combined method of isotope dilution technique and selected ion monitoring. The method was usefully applied to the steroid analysis on human prostate tissue with hypertrophy.

## 緒 言

この実験は、前立腺や精巣組織中の数種のステロイド化合物をガスクロマトグラフィー質量分析計による selected ion monitoring (GC/MS/SIM) 法によって同時定量する方法について検討したものである。

元来これらの組織中のステロイド化合物は微量であり、分析に当っては他の生体成分による妨害を受けやすい。GC/MS/SIM 法は他の分析法に見られない高感度と特異性を有しており、またいくつかのステロイドを同時定量できる利点を持っている。さらに近年、GCでの分離においても化学結合型溶融シリカキャピラリカラムの出現によって、従来の充填カラムにはなかった高分解能での分析が可能となってきた。

しかし、これらの特性を十分に引き出すためには、いくつかの克服しなければならない点がある。今回著者らは、組織からのステロイドの抽出と精製の方法、GC/MS/SIM に適した誘導体の調製および重水素標識内部標準の作成に目標を置いて検討したので、その成果を報告する。

## 実 験 方 法

### 試 薬

テストステロン(T), アンドロステンダイオン(A4), デヒドロエピアンドロステロン(DHEA), ジヒドロテストステロン(DHT), プレグネノロン(P5), プロゲステロン(P4),

\* 実験実習機器センター

\*\* 化学教室

\*\*\* 法医学教室

Central Research Laboratories\* Department of Chemistry\*\* Department of Legal Medicine\*\*\*

17OH-プレグネロン (17OH-P5) および17OH-プロゲステロン (17OH-P4) は Sigma から購入した。各種誘導体化剤はGC分析用を用いた。99.5%重水素メタノール, 20%重水素塩酸, 40%重水素水酸化ナトリウムは Aldrich から入手した。Extrelut<sup>®</sup> と蛍光剤入り TLC プレートは Merck から得た。Lipidex<sup>®</sup> 1000 および5000 は Sigma から, Amberlite XAD-2<sup>®</sup> はオルガノ, SepPak C<sub>18</sub><sup>®</sup> は Waters からそれぞれ入手し, 使用前に Axelson ら<sup>1)</sup> が報告した手順に従って処理した。その他の試薬および有機溶媒は市販の特級を使用し, 定量に用いる全てのガラス器具はあらかじめシリコン処理を施した。

### 使用機器

GC/MS は, Hewlett Packard 社製 5710 A GC を接続した日本電子社製 JMS D300/JMA 2000 S を使用した。GC への注入には, キャピラリカラム (25 m×0.24 mm I. D.) の使用時は splitless モードを, またラージボアキャピラリカラム (12 m×0.53 mm I. D.) の時は direct モードを使用した。抽出率を検討するための予備実験には, ソルベントレス試料導入装置とキャピラリカラム OV-101 (50 m×0.24 mm I. D.) を装着した島津製 GC 6 A を使用し, また充填カラムは OV-1 (3 m×2 mm I. D.) とした。さらに, 分取に際しては Lichrosolb-DIOL カラムを接続した溶媒グラジェント HPLC (島津製) を用いた。

### 組織試料

肥大化した前立腺を試料とした。これは, 手術で摘出されたもので, 分析まで-80℃で保存した。ラット肝およびブタ精巣ホモジネートは, 抽出率および精製法を検討するために使用した。

### 抽出と精製

組織ホモジネートに各種ステロイド標品混合溶液 (300 μg/ml EtOH) を 100 μl 添加後, 種々の有機溶媒による液々抽出を行い, またすでに報告されている Extrelut<sup>2)3)4)</sup>, Amberlite XAD-2<sup>7)8)9)</sup> 樹脂あるいは SepPak C<sub>18</sub><sup>5)6)10)</sup> による液固抽出を試みた。さらに Andersson らの方法<sup>11)</sup> も追試し比較検討した。これらの抽出液は蒸発乾固させ, メトキシム/トリメチルシリルエーテル (MO/TMS) 化後, GC 分析した。

これらの粗抽出物の精製には, Lipidex 5000 ゲルのベッドとメタノール/水/酢酸 (70:30:0.05) を用いた。またこれらの抽出や精製の各ステップで得られた溶出液の一部は, TLC 分析 (ベンゼン/メタノール 90:10 展開液) を行い, 妨害成分の除去程度の確認に用いた。

### 誘導体の調整および内部標品

GC/MS/SIM モードでの定量に最も適した誘導体化を検討するため, ステロイド化合物のケトン基を種々のオキシム化剤を用いて保護した。ヒドロキシム (HO)<sup>12)</sup> 化はヒドロキシルアミン塩酸塩の酢酸ピリジン緩衝液 (pH 5.4) で, またエトキシム (EO) 化はエトキシルアミン塩酸塩ピリジン溶液で, さらに tert-ブトキシム (BO) 化は tert-ブトキシルアミン塩酸塩ピリジン溶液で, それぞれ行った。これらのオキシム化後, 水酸基は TMS 化, ジメチルエチルシリルエーテル (DMES) 化または tert-ブチルジメチルシリルエーテル (TB-DMS)<sup>12)13)14)</sup> 化を行った。このほか, ケトンのエノールエーテル化やペルフルオロアシル化剤によるエノールアシル化<sup>15)</sup> も試みた。

定量のための内部標品 (I.S.) は Dehennin<sup>16)</sup> らの方法や Tokes らの成書<sup>17)</sup> を参考に, 著者らの実験室で標品を重水素標識した。その主な条件は Table II に示した。

## 組織ステロイドの分析

前立腺組織からのステロイド化合物の分析には、上記のような予備実験を通じて最も良好な結果が得られた手法を組合せて行った。すなわち、湿重量 1 g の前立腺を粗くハサミで切り、除タンパク剤を含む tris-buffer (pH 7.9) と 100 ng の I.S. を加えホモジナイズした後、超音波破砕を30分間行った。その溶液を遠心分離 (800 g×10 分間) し、上清を Extrelut カラムに移し5分間放置後、塩化メチレンで溶出した。溶出液はロータリエバポレータで乾固し、予め処理した少量の Lipidex 5000 にメタノール/水/酢酸 (70:30:0.05) 1 ml で移し、さらに同溶液 5 ml で溶出した。溶出液の最初の 0.5 ml 分は捨て、続く 3 ml 分を回収し、蒸発乾固した。残渣は MO/TMS 化し、GC/MS に注入した。カラムオープン時は、210°C から 260°C まで 8°C/min の昇温を行った。内径 0.24 mm のキャピラリカラムを使用する場合、カラムの終端はイオン源まで導き、ラージボアカラムを用いる時は、セパレータを用いた。イオン化法にはイソブタンを試薬ガスとする化学イオン化 (CI) 法を使用した。各ステロイドのモニタイオンは Table III の通りであった。

## 結果と考察

### 分析前の処理

生体試料からのステロイドの抽出には、有機溶媒による液々抽出や樹脂を使用した液固抽出、あるいは両者を組合せた方法等がある。種々の体液からの遊離型や抱合型ステロイドの抽出には、SepPak C<sub>18</sub><sup>5)6)10)</sup>、Amberlite XAD-2<sup>1)5)7)-9)</sup> あるいは Extrelut<sup>2)3)4)</sup> などによる液固抽出法の検討が数多く試みられ、液々抽出で問題となるステロイドの広範な極性差やエマルジョン形成などによる抽出率の低下を軽減する方法が報告されている。またタンパク質との結合解離には、抽出カラムを64°Cに加熱し、定量的な抽出率が得られている<sup>7)</sup>。

一方、組織試料においては、リン脂質、脂肪酸あるいはコレステロールなどが大量に存在し、しかも抽出時の挙動がステロイドと類似しているため、これらの混入が微量分析での障害となる。このことは、GC/MS 分析にキャピラリカラムを使用する場合、試料の最大負荷量の制約があるので特に重要である。そのため粗抽出物は引続き精製ステップを必要とする。Sjövall らは、自らの研究室で合成したイオン交換ゲル<sup>18)19)</sup> を精製やグループ分離<sup>7)10)</sup> に使用し、優れた成果を得ている。Andersson らの方法<sup>11)</sup> は、有機溶媒抽出と液固抽出とを巧みに組合せた技法であり、アルコールと組織中の遊離型ステロイドの関係を研究するのに応用している<sup>20)21)</sup>。

著者らは上記の方法を、抽出率、妨害成分からの影響、操作の簡便さ、前処理段階でのステロイドの安定性および経済性などの点から比較検討した。

Table I に示した種々の方法による抽出率は、これらのテストに用いた濃度と同等のステロイドを直接反応管で誘導体化後 GC 分析し、得られた値を 100 とした相対値 (%) で表わした。なお A4 と DHT の分離は不十分なため、これらのピークはひとつの成分として計算した。結果はいずれの方法も高い回収率を示したが、ガスクロマトグラム上に現われる未知ピークによる干渉などを考慮し、Extrelut カラムと塩化メチレンあるいはベンゼンとの組合せが最良であると判断した。なお 17OH-P5 はヘキサンから抽出されにくかった。

ステロイドを含む粗抽出物には、脂肪酸やコレステロールが多量に混入してくるため、引続きステロイドは、Andersson らの方法<sup>11)</sup> に従って少量の Lipidex 5000 ゲルにより酢酸酸性下で精製した。この逆相ベッドは、ステロイド含有量に比較し 100 倍以上の濃度で存在するコレステロールを、容易に保持し除去することができた。Fig. 1 のように、Lipidex 5000 からの溶離液を 0.5 ml ずつ分画し GC 分析したところ、目的のステロイドは、

Table I. Recovery rate(%) of eight steroid substances by various extraction methods

Methods	N	DHEA	DHT+A4	T	P5	P4	17OH-P5	17OH-P4
Solvent Extractions								
Ethyl ether	(4)	79.93	90.51	85.96	84.73	93.29	84.62	87.99
Ethyl acetate	(4)	86.06	90.57	86.56	87.79	92.81	84.74	94.06
Dichloromethane	(3)	90.86	95.67	94.92	94.22	97.96	83.75	94.47
Hexane	(4)	89.30	98.52	80.15	84.51	113.79	— *	72.74
Benzene	(4)	94.98	98.64	96.49	97.27	100.60	86.85	95.95
Extrelut								
Ethyl ether	(4)	99.11	102.32	98.18	94.87	101.68	101.74	105.26
Ethyl acetate	(4)	79.26	96.06	81.72	78.74	94.36	72.46	96.09
Dichloromethane	(4)	82.61	81.54	89.23	54.63	75.54	68.86	88.93
Hexane	(3)	94.76	94.90	97.34	76.55	111.03	—	72.20
Benzene	(3)	97.99	94.64	100.24	78.41	97.24	78.16	98.92
SepPak C18								
Acetonitrile	(4)	86.73	92.90	97.58	86.04	86.21	72.08	88.93
Methanol	(4)	86.06	90.19	93.46	85.82	86.09	75.68	89.88
Ethyl acetate/Methanol (1 : 2)	(4)	87.63	90.45	94.07	88.33	94.72	70.84	92.31
Dichloromethane	(4)	84.06	87.48	91.76	87.13	91.61	76.55	88.12
Amberlite XAD-2								
Methanol	(4)	69.12	69.79	84.02	79.61	69.66	69.23	64.51
Methyl acetate/ Methanol (1 : 1)	(3)	68.56	70.50	91.53	81.90	72.06	55.83	62.35
Andersson's Method**	(6)	88.85	94.13	87.65	81.57	97.96	81.76	89.61

\* Not detected \*\*Reference No. 11

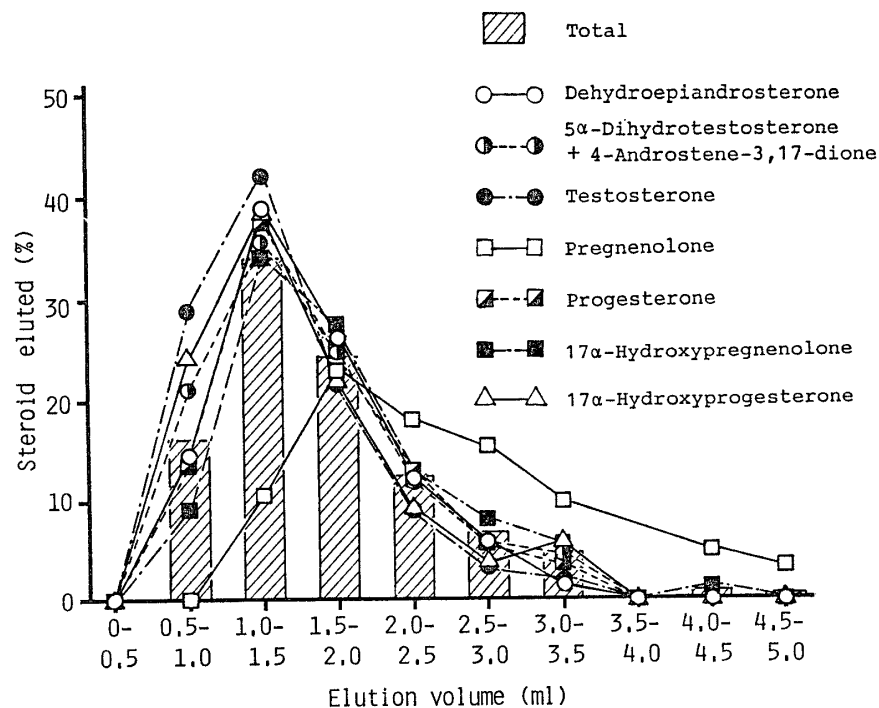


Fig. 1 Elution pattern of steroids through Lipidex 5000.

0.5 ml から 3.5 ml の部分にほとんど含まれてくることが判った。

### 内部標準品

定量に用いる内部標準品 (I.S.) は、試料の前処理や GC/MS での損失を補正するため、分析すべき物質と同じ挙動をとることが望ましく、また言うまでもなく分析試料中に存在する物質であってはならない。安定同位体で標識した I. S. を用いれば、これらの問題は解決できるばかりでなく、前処理過程での損失を少なくする“キャリア効果”も期待できる。しかし Baillie<sup>22)</sup> も記述しているとおり、GC/MS 分析への安定同位体標識化合物の応用には考慮すべき課題も多い。また入手が困難であったり、高価であったりする場合もある。この点、重水素を多重標識することは実験室でも可能なことが多く、著者らは Table II に示したような条件下で処理し、重水素アイソトープ純度の高い I. S. を得ることができた。

Table II. Synthetic conditions and isotope ratio of deuterium-labelled steroids

Deuterium-labelled steroid	Conditions			Recrystallization	Isotope ratio a)
	Deuterium source	Temperature (°C)	Time (h)		
4-Androstene-3,17-dione-d <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/ <sup>2</sup> HCl	65	48	acetone	0.80
Dehydroepiandrosterone-d <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/ <sup>2</sup> HCl	65	24	acetone	4.20
Testosterone-d <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/ <sup>2</sup> HCl	65	48	acetone	0.21
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone-d <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/ <sup>2</sup> HCl	80	24	acetone	0.30
Pregnenolone-d <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/NaO <sup>2</sup> H	65	24	acetone	1.40
Progesterone-d <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/ <sup>2</sup> HCl	80	48	acetone	0.10
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone-d <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/NaO <sup>2</sup> H	65	24	methanol	2.10
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone-d <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> O <sup>2</sup> H/ <sup>2</sup> HCl	65	48	methanol	0.20

a) Ratio of unlabelled molecules vs labelled molecules with isotope species required for quantitative measurement by SIM.

重水素を多重標識する場合、3 から 4 atomic mass unit (AMU) の質量シフトが適切とされる<sup>16)</sup>。2 AMU 以下では、天然同位体の存在やアイソトープ純度不良のために、標識体と非標識体が相互に影響し定量値の信頼性を低めたり、検出限界を悪化させたりする。この点 DHEA-d<sub>2</sub> は 2 AMU のシフトであるため、低濃度域の定量に課題が残った。反対に 5 AMU 以上では、理化学的同位体効果が GC 上の移動度に大きく現われる。特にキャピラリカラムを使用した場合、標識体と非標識体が部分的分離をおこしたり、ピーク形状の不良を生じたりする。今回の標識に用いたステロイドでは、P4 と 17OH-P4 が 8 AMU と最大のシフトであった。

重水素標識体が前処理の間に、重水素—軽水素 (D-H) 交換反応をおこすかどうかについて GC/MS で調べたが、標識ステロイドのマススペクトルには、前処理操作の前後で変化は見られなかった。本法では抽出精製中の pH および温度の変化はほとんどないため、もし D-H 交換反応がおこるとすれば、むしろ誘導体調製時の加熱や酸などによっておこるかもしれない。また分子中の標識位置によっては、GC カラムや質量分析計内でこの交換反応が発生する可能性も考えられたので、これらの標識ステロイドをイオン源への GC 導入と直接導入の両方で測定したが、有意な D-H 交換の様子は観察されなかった。なおこの D-H 交換は、ステロイド分子中の活性水素を適当な誘導体に導くことで防止できるかもしれない。著者らは以前、harman-d<sub>3</sub> 体の活性水素をペルフルオロアシル化したものは GC カラム内で D-H 交換しないのに対し、誘導体化しない重水素標識体はほとんど交換してしまうことを経験している。これは恐らく Eiceman ら<sup>23)</sup> が報告したように、分子中の活

性水素とカラム固定相中の残留シラノール基とが相互作用する間に D-H 交換するためと思われるが、ステロイドについてこのような現象は観察されなかった。以上の検討から、これらの重水素標識ステロイドは GC/MS 分析に充分に使用できるものと考えた。

### 誘導体の調製

ステロイド化合物の GC/MS 分析には、誘導体調製が不可欠である。今回対象としたステロイドのうち、17位に水酸基を有するものは、誘導体化しないと GC 中で分解した。他のステロイドは、キャピラリカラム特にラージボアカラムを使用すればシャープな GC ピークが得られたが、気化室温度が250℃以上では、これらも一部熱分解した。

現在ステロイドの誘導体化法として、分子中のケトンはおキシム化し、その後、水酸基はベルフルオロアシル化またはシリルエーテル化する方法が広く用いられている。このほかケトン積極的にエノールアシル化<sup>15)</sup> やエノールエーテル化<sup>13)24)25)</sup> する方法も知られる。著者らは、分子構造が微妙に異なる複数ステロイドを GC/MS で一斉分析するため、次のような条件を満す誘導体化剤を検索した。すなわち、1) 官能基と迅速に反応すること、2) GC 分離度が良く、保持時間と質量数が極端に増加しないこと、3) 異性体を生じて複数の GC ピークを出現させないこと、4) 開裂様式が単純で特に高質量側に基準イオンが出現しやすいこと、5) ハード的な制約上、モニタイオン相互間で広範な質量差が生じないこと、6) モニタイオンが妨害成分イオンとオーバーラップしないこと、そして7) 調製後の化合物が安定であること、などである。以上の条件を基準として、GC および MS での挙動を観察した結果、ケトンのエノールアシル化やエノールエーテル化は、分子イオンが基準イオンになりやすい反面、反応が円滑でないステロイドもあり、ガスクロマトグラム上で複数のピークが現われ一斉分析には不都合であった。

従来からケトンのオキシム化には MO 化が常用されているが、著者らは HO, EO, あるいは BO 化も実験し、その後水酸基は TMS の代わりにジメチルアルキルシリル化剤を用いて DMES および TBDMS 化を行った。反応後、不揮発性の余剰物はヘキサン/水(2:1)で除去した。Fig. 2(A)\* はHO/DMES 化したステロイド標品およびそれらの重水素標識体の電子衝撃イオン化 (EI) マススペクトルである。同様に、Fig. 2(B)\* は EO/DMES 化したものを示している。これらの誘導体化ステロイドは、TMS 化体に比較して水分に対する安定性ははるかに高く、加えて EI マススペクトルは、分子イオンからエチル基(DMES 化の場合) や tert-ブチル基 (TBDMS 化の場合) が脱離したイオンが基準イオンになりやすいという報告<sup>26)</sup> がある。Fig. 2(A)および 2(B)から DHEA, DHT および P5 を除くステロイドは、これらの誘導体によって基準イオンが高質量側に出現することがわかった。しかし誘導体反応が比較的ゆっくり進むため、適当な触媒が必要と思われる。特に TBDMS 化は立体障害の影響を受けやすく、また生成物の保持時間が TMS 体に比較し有意に増大した。

結果的に今回の検討では上記1)~7)の条件をすべて満す誘導体化剤を見つけることはできなかったが、テストした誘導体化剤の性質および生成した化合物の GC/MS 上での挙動を観察できたことは、今後の貴重な資料になりうると思われる。

立体障害をほとんど気にしないで使用できる MO/TMS 化体は EI 法では開裂しやすく、代謝プロファイルなど定性分析には有効<sup>27)</sup> であるが、分子イオンを含む高質量側イオンの強度が低いため、SIM モードでの定量には不利である。これに対しイソブタンを試薬ガスとする化学イオン化 (CI) 法を応用すれば、DHEA, P5 および 17OH-P5 は [M-OTMS]<sup>+</sup> が、またその他は擬分子イオンである [M+H]<sup>+</sup> が基準イオンとなる単純なマススペクトルとなった。

\* 本文末尾に掲載

CI 法を応用したステロイドの定量分析例は少ないが、この理由は分析精度に影響する因子が増えるためと思われる。すなわち CI 法の場合、分子-イオン反応を左右するイオン化室の圧力、温度および気密性を考慮することが重要で、特に安定同位体標識の内部標品なしでは、定量値のバラツキが大きい。また EI 法に比較して、それほど感度が増加しないという報告<sup>1)</sup>もある。

著者らは、8種類のステロイドを MO/TMS 化した後、SIM での定量に CI 法を使用してみた。各ステロイドのモニタイオンの質量数と保持時間は Table III に示した。また Fig. 3 は本法による各ステロイドの検量線であり、すべてのステロイドが試験管当り 6-120

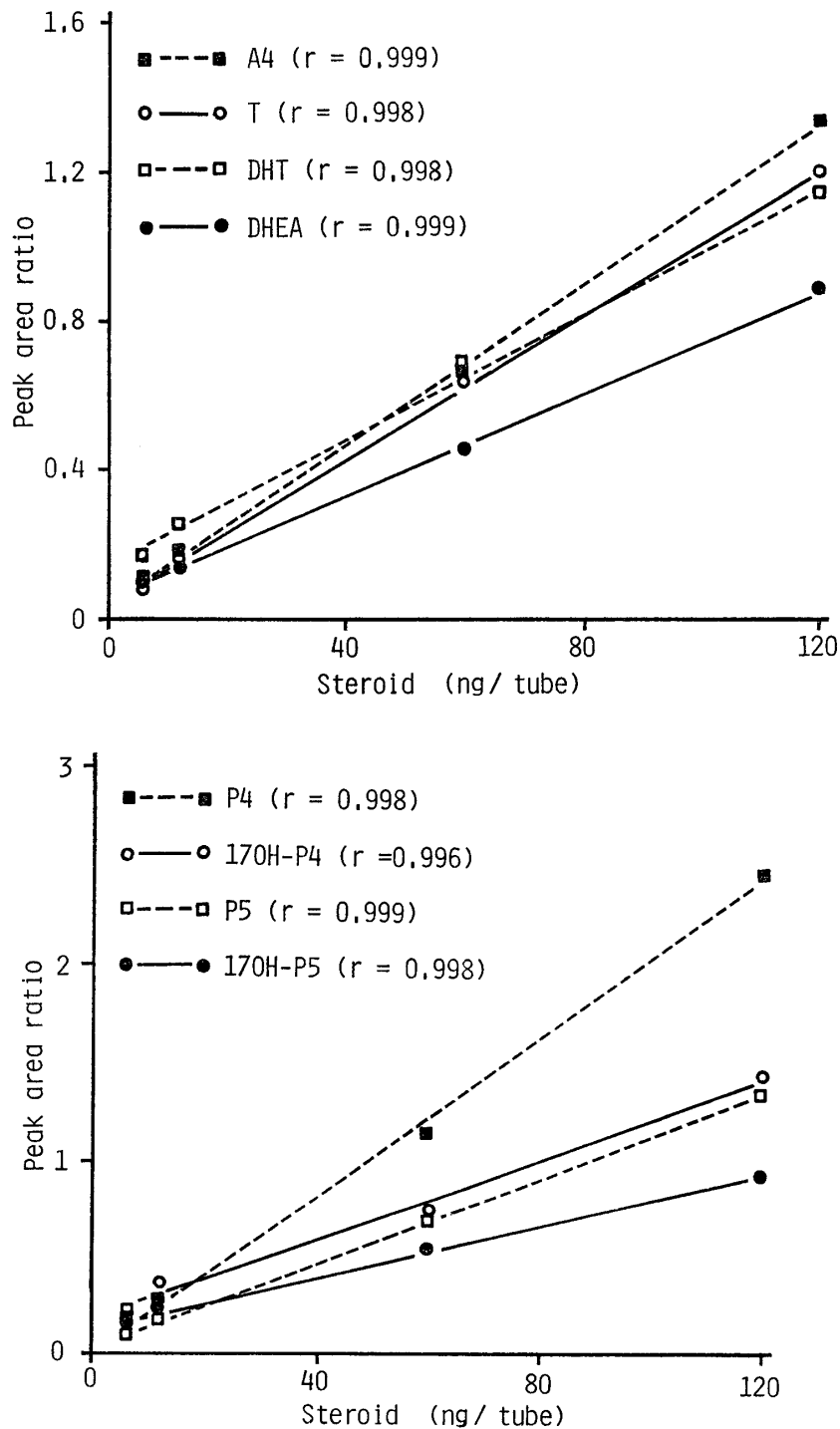


Fig. 3 Calibration curves.

Table III. GC/MS behaviors of MO/TMS-derivatized steroids

Steroid	Molecular ion of derivative(M/Z)		Selected ion for SIM(M/Z)		Retention time (min)
	Unlabelled	Labelled	Unlabelled	Labelled	
A4	344	351	345.2	352.2	3.17
DHEA	389	392	300.2	302.2	2.83
T	389	394	390.2	395.2	3.17
DHT	391	395	392.2	396.2	3.00
P5	417	421	328.2	332.2	4.17
P4	372	380	373.2	381.2	4.58
17OH-P5	505	508	416.2	419.2	4.67
17OH-P4	460	468	461.2	469.2	4.83

Operating conditons : Column, large-bore chemically bonded capillary CBP-1(12 m × 0.53 mm ID); Carrier, He 1.0 kg/cm<sup>2</sup>; Oven temperature, programmed increase from 210°C to 260°C at 8°C/min after direct mode injection ; Ionizing mode, chemical ionization using isobutane as reagent gas.

Table IV. Accuracy and precision of steroid determinations

Steorid	Prepared (ng/ tube)	N	Detected(ng/tube)		Lower limit (ng/tube)
			Mean	S. D.	
A4	90	4	98.80	4.165	1.0
	18	4	19.09	2.888	
DHEA	90	4	86.71	0.619	3.0
	18	4	18.25	1.844	
T	90	4	82.73	3.866	3.0
	18	4	15.78	0.530	
DHT	90	4	86.93	0.619	6.0
	18	4	20.04	5.048	
P5	90	4	91.45	3.650	3.0
	18	4	24.34	2.817	
P4	90	4	87.24	0.750	1.0
	18	4	23.05	1.027	
17OH-P5	90	4	95.26	4.280	3.0
	18	4	24.87	5.846	
17OH-P4	90	4	100.70	2.293	6.0
	18	4	22.27	5.654	

ng の濃度で相関係数 0.996 以上の直線関係を示した。また、感度および 18 ng と 90 ng における繰返し精度は Table IV のようであった。すべての測定値は、I.S. (100 ng) のみを添加した時の測定値をブランクとして差し引いて示した。DHT は、GC 内で生成される未知化合物 (分子量390) の巨大なピークのため、低濃度での分析で影響を受けた。Fig. 4 は、水に各ステロイド標品および I.S. をそれぞれ 120 ng および 100 ng 添加した時の GC/MS/SIM のクロマトグラムである。



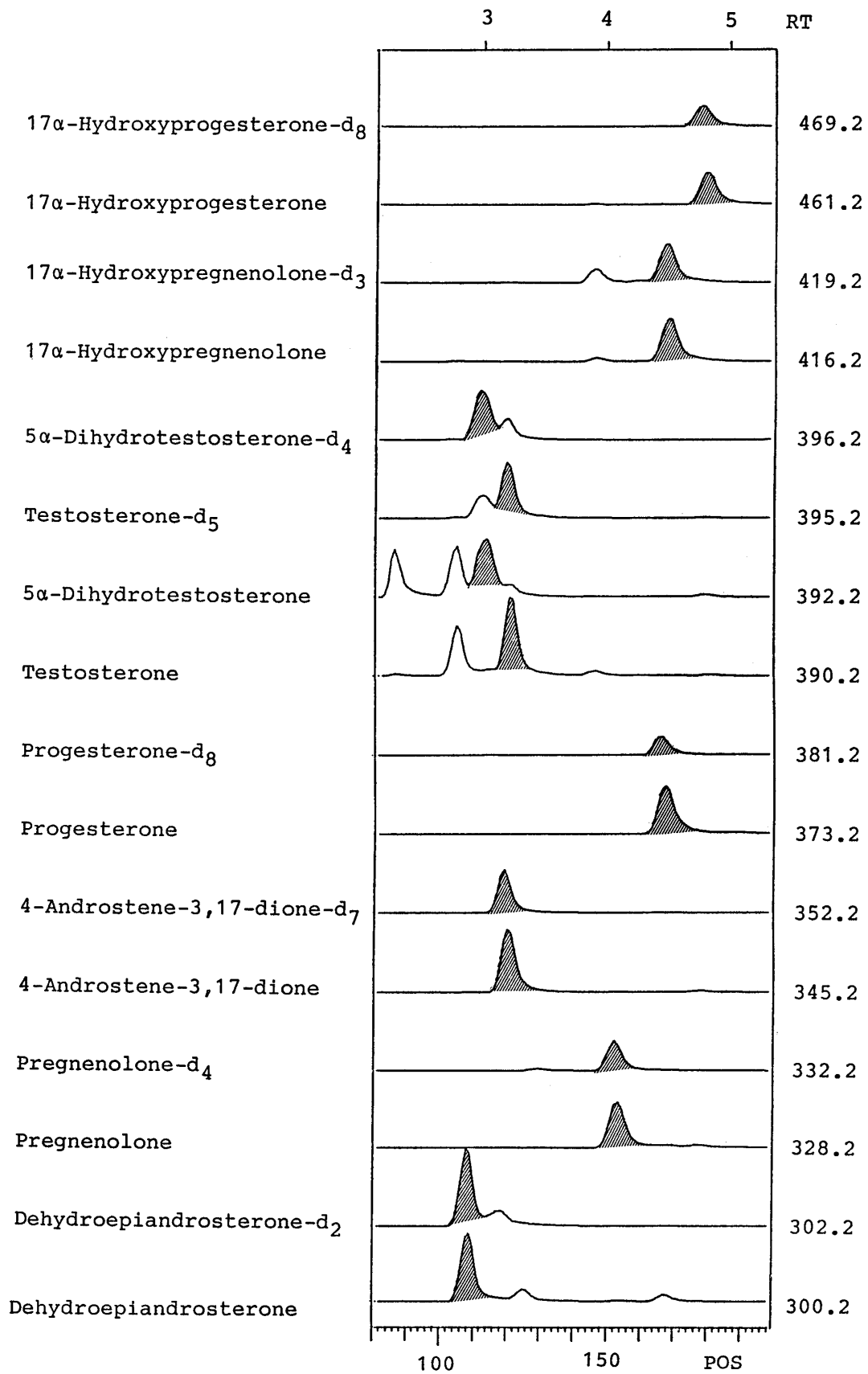


Fig. 4 SIM Chromatograms of MO/TMS derivatives of steroids and their internal standards.

## 組織中のステロイド分析への応用

上述した方法を、肥大化した前立腺からのステロイド分析に応用した。この種の分析において、キャピラリカラム GC/MS/SIM 法は高い感度と選択性を示すが、常にカラムのオーバーロードを念頭に置きステロイドの精製に十分な力を注ぐ必要がある。ラージボアキャピラリカラムを使用した場合、分離能力は通常のキャピラリカラムよりも低下するが、充填カラム並みの注入量が可能である。加えて充填カラムに比較し、目的成分の溶出速度が極めて速い。従って Jennings ら<sup>28)</sup> が指摘したような試料注入テクニックの問題に留意すれば、ラージボアカラムの使用は、このような組織を試料とする分析に非常に有効である。

なお、本法によって得られた成績は、DHT の値が他のステロイドに比べ、はるかに高濃度で存在することを示し、このことは前立腺肥大症に DHT の蓄積が関与するという島崎ら<sup>29)</sup> や森岡ら<sup>30)</sup> の報告と一致するが、本研究の目的からも離れるため、これ以上の考察は控えたい。

## 結 語

本研究は、GC/MS/SIM によって組織中のステロイドを一斉分析することを目的とし、抽出・精製、安定同位体希釈法、誘導体の調製、およびラージボアカラムと化学イオン化法の使用につき検討した。

その結果、次の結論を得た。1)抽出、精製には保持容量の大きい樹脂やゲルを用いるのが有効であった。2)誘導体の調製に際しては、熱的安定性や揮発性を高めることだけでなく、GC および MS 内での挙動を総合的に考慮し選択することが重要である。3)重水素標識体を I.S. に使用することで分析精度を高めることができるが、標識体の挙動は、予め十分に調査すべきである。4)CI 法は、ステロイドの一斉分析に有効に使用できる。5)GC における分離手段としてラージボアカラムを用いることは、精製ステップの一部を省略でき、前処理操作を短縮しうる。

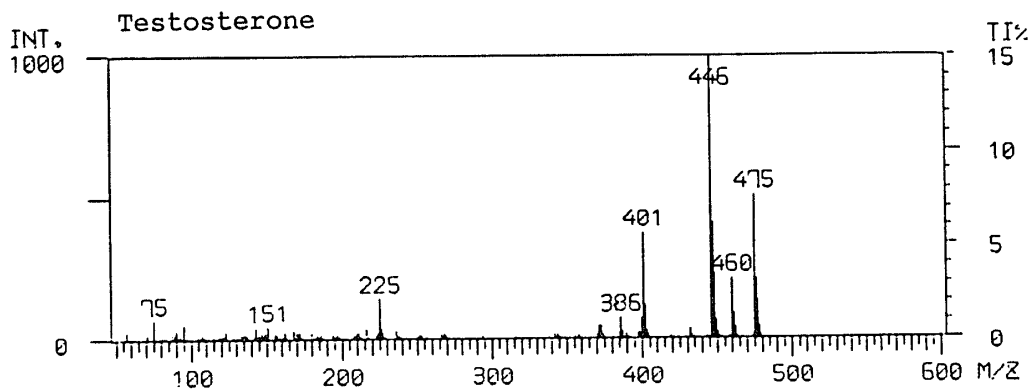
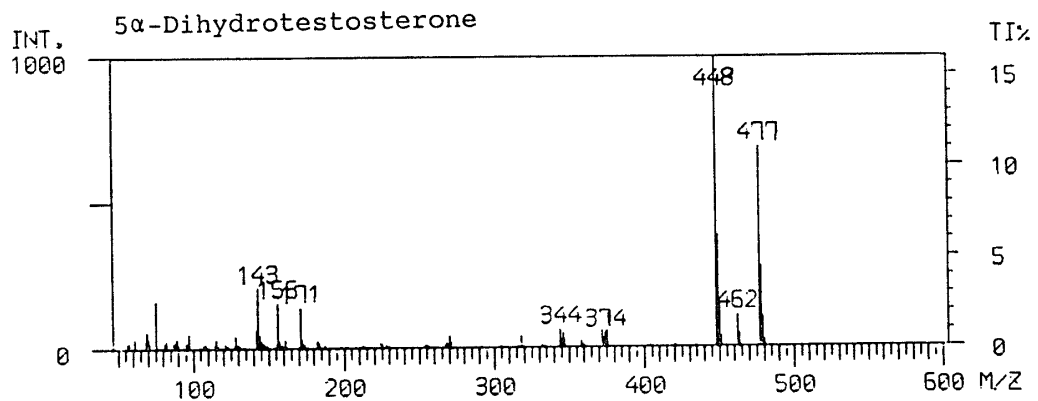
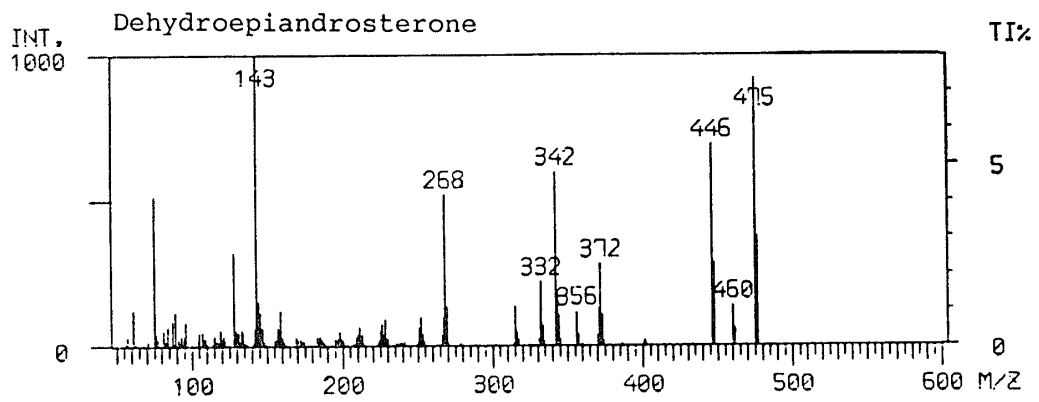
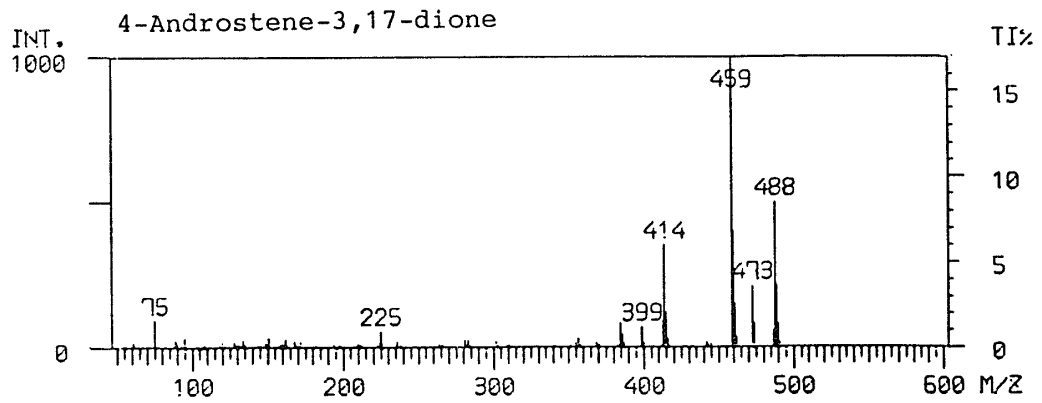
## 謝 辞

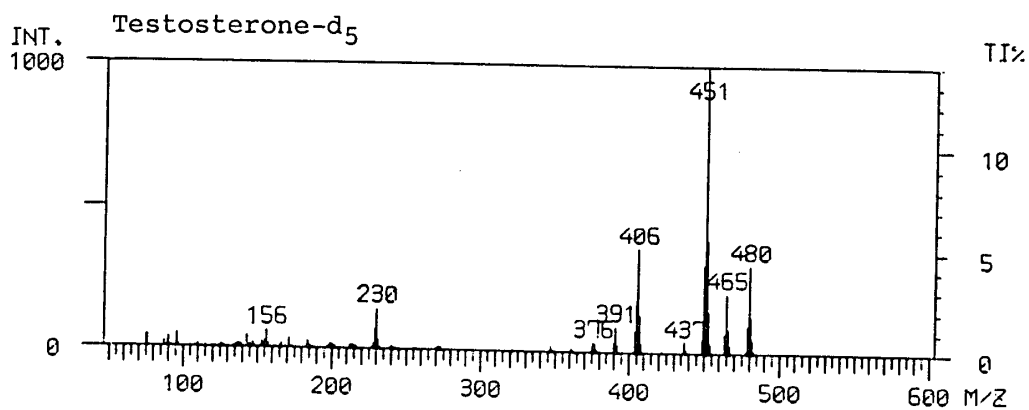
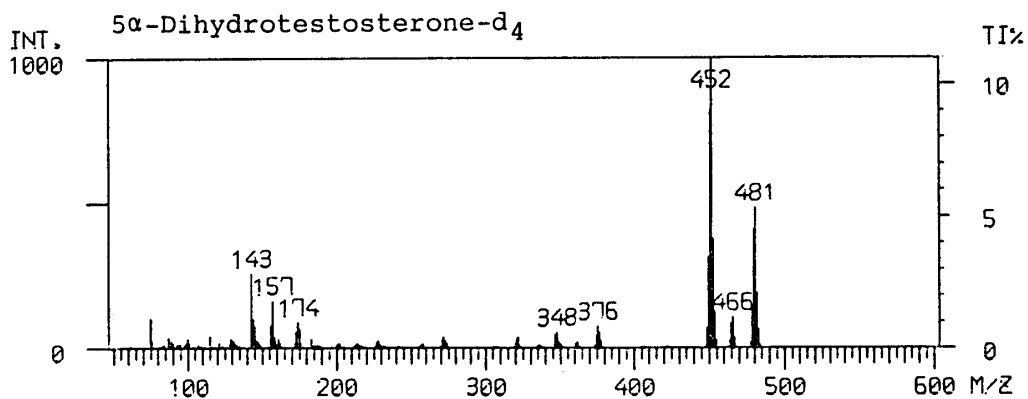
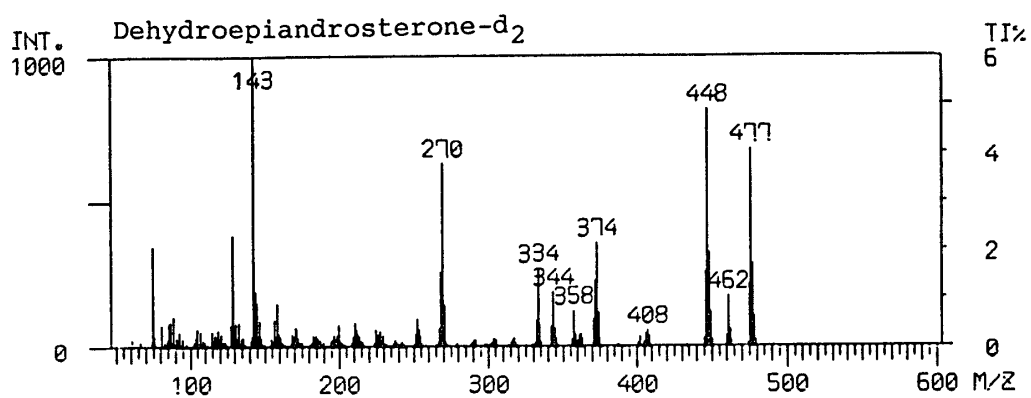
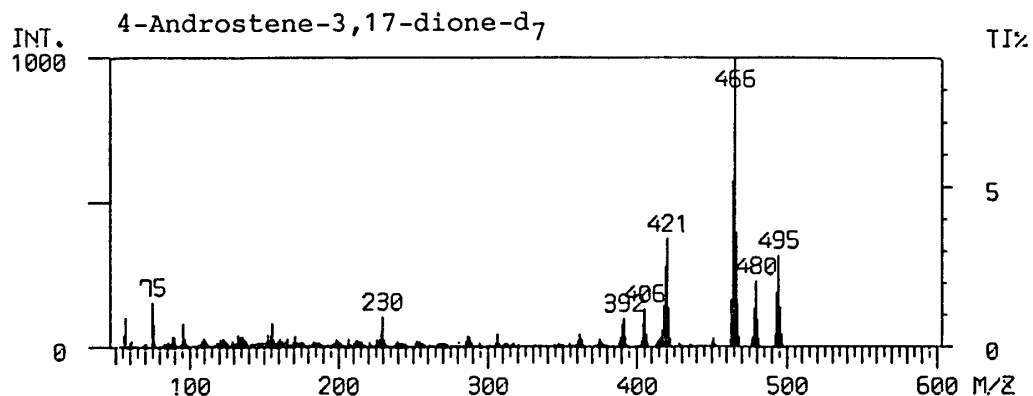
本研究にご援助頂いた本学泌尿器科・石部知行教授及び出雲市大野医院院長・大野弘幸博士に厚く御礼申し上げます。

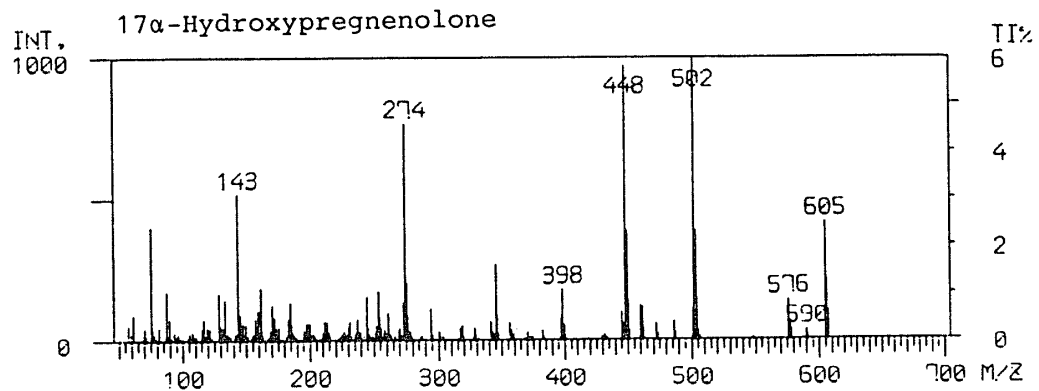
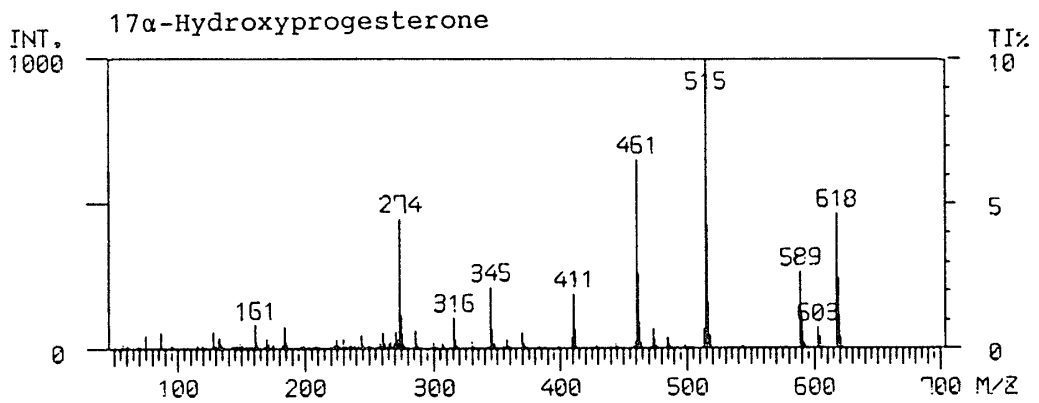
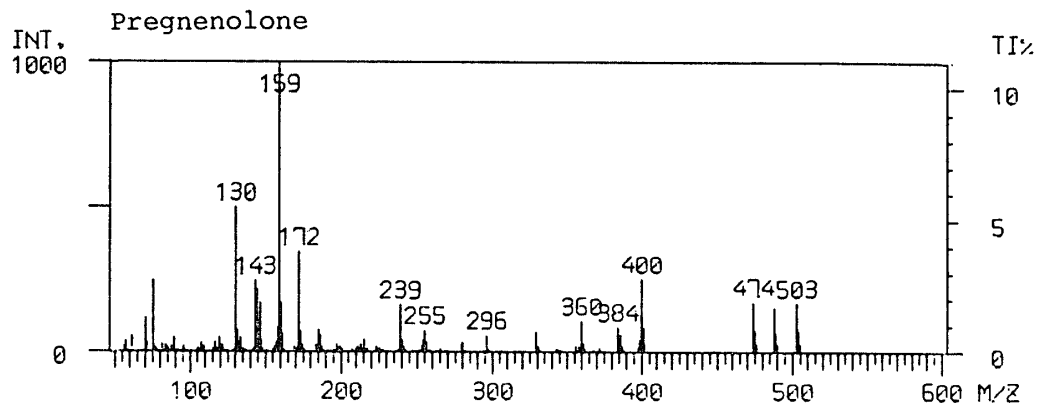
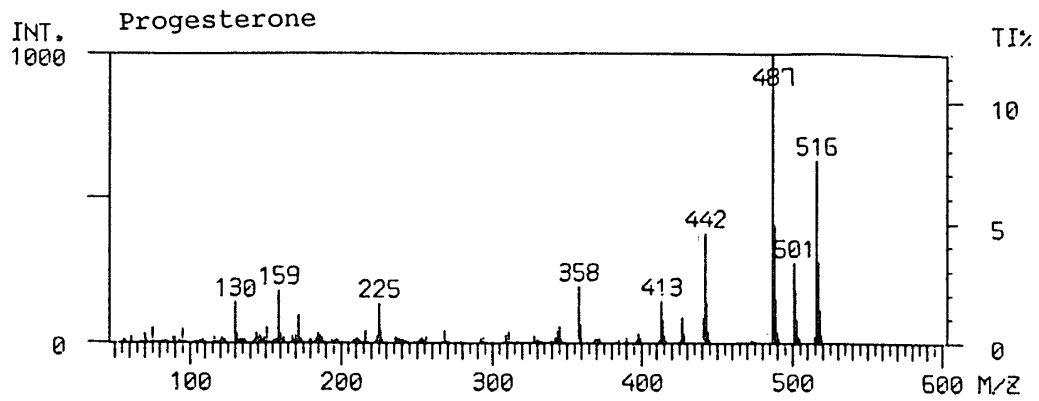
## 参 考 文 献

- 1) M. Axelson and J. Sjövall: Selective liquid chromatographic isolation procedure for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of 3-ketosteroids in biological materials. *J. Chromatogr.* 126, 705-716 (1976)
- 2) E. Bamberg, E. Möstl, N. E. D. Hassan, W. Stöckl and H. S. Choi: Rapid and efficient extraction of steroids from microlitre quantities of plasma using Extrelut® mini-columns. *Clinica Chimica Acta*, 108, 479-482 (1980)
- 3) 市村一義ほか: 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, 第10巻, 27-34 (1985)
- 4) 野崎 豊ほか: non-packed column を用いた副腎皮質コーチゾール, コルチコステロン及びテストステロンの同時測定法の確立. 医用マス研究会講演集, 第9巻, 187-190 (1984)
- 5) C. H. L. Shackleton and Joanne O. Whitney: Use of SepPak® cartridges for urinary steroid extraction; Evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Clinica Chimica Acta* 107, 231-243 (1980)
- 6) 林 陽ほか: 血中女性ホルモン GC/SIM による定量とその応用. 医用マス研究会講演集, 第9巻, 191-194 (1984)

- 7) M. Tetsuo, H. Eriksson and J. Sjövall: Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of endogenous levels of estradiol in plasma and in cytosol from rat uterus. *J. Chromatogr.*, 239, 287-300 (1982)
- 8) 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)
- 9) M. Axelson et al.: Estrogen binding in target tissues; A GC/MS method for assessing uptake, retention and processing of estrogens in target cell nuclei under in vivo conditions. *J. Steroid Biochemistry*, 14, 1253-1260 (1981)
- 10) M. Axelson, B.-L. Sahlberg and J. Sjövall: Analysis of profiles of conjugated steroids in urine by ion-exchange separation and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 224, 355-370 (1981)
- 11) Stig H. G. Andersson and J. Sjövall: A method combining solvent and gel extraction for isolation and preliminary purification of steroids in tissues. *Analytical Biochemistry*, 134, 309-312 (1983)
- 12) R. W. Kelly and P. L. Taylor: tert-Butyl dimethylsilyl ether as derivatives for qualitative analysis of steroids and prostaglandins by gas phase methods. *Analytical Chemistry*, 48, 465-467 (1976)
- 13) I. A. Blair and G. Phillipou: Derivatization of steroid hormones with t-butyl dimethylsilyl imidazole. *J. Chromatogr. Science*, 16, 201-203 (1978)
- 14) Elizabeth M. H. Finlay and Simon J. Gaskell: Determination of testosterone in plasma from men by gas chromatography/mass spectrometry, with high-resolution selected-ion monitoring and metastable peak monitoring. *Clin. Chem.*, 27, 1165-1170 (1981)
- 15) D. W. Johnson et al.: Deuterium labelled steroid hormones; tracers for the measurement of androgen plasma clearance rates in women. *J. Steroid Biochemistry*, 22, 349-353 (1985)
- 16) L. Dehennin, A. Reiffsteck and R. Scholler: Simple methods for the synthesis of twenty different, highly enriched deuterium labelled steroids, suitable as internal standards for isotope dilution mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*, 7, 493-499 (1980)
- 17) László Tökés and Lewis J. Throop: Introduction of deuterium into the steroid system. *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, 1, 145-221 (1971)
- 18) M. Axelson and J. Sjövall: Strong non-polar cation exchangers for the separation of steroids in mixed chromatographic systems. *J. Chromatogr.*, 186, 725-732 (1979)
- 19) J. Ellingboe, B. Alme and J. Sjövall: Introduction of specific groups into polysaccharide supports for liquid chromatography. *Acta Chemica Scandinavica*, 24, 463-467 (1970)
- 20) S. H. G. Andersson and J. Sjövall: Effects of ethanol on steroid profiles in the rat testis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 876, 352-357 (1986)
- 21) S. H. G. Andersson, T. Conholm and J. Sjövall: Effects of chronic ethanol ingestion on steroid profiles in the rat testis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 876, 358-362 (1986)
- 22) T. A. Baillie: The use of stable isotopes in pharmacological research. *Pharmacological Reviews*, 33, 81-132 (1981)
- 23) G. A. Eiceman and C. S. Leasure: Quantitative investigation of rapid injection port derivatization of amphetamine using trifluoroacetic anhydride with packed and capillary column GC and GC/MS methods. *J. Chromatogr. Science*, 22, 509-513 (1984)
- 24) W. G. Stillwell, R. N. Stillwell and E. C. Horning: Analysis of nanogram quantities of norethisterone in plasma using a GC-MS-COM selective ion detection procedure. *Steroids Lipids Res.*, 5, 79-90 (1974)
- 25) S. Z. Nicosia et al.: Base-catalyzed silylation. A quantitative procedure for the gas chromatographic mass spectrometric analysis of neutral steroids. *J. Steroid Biochem.*, 4, 417-425 (1973)
- 26) 長谷川光夫: 新しいガスクロマトグラフィ試料前処理用試薬. *ファルマシア*, 22, 35-38, (1986)
- 27) 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*, 第8巻, 29-46 (1983)
- 28) M. Jennings and M. F. Mehran: Sample injection in gas chromatography. *J. Chromatographic Science*, 24, 34-39 (1986)
- 29) 島崎 淳, 志田圭三ほか: 前立腺肥大症と androgen. *副腎・生殖内分泌II*, 246-252 (1972)
- 30) 森岡政明ほか: ヒト前立腺組織内 Androgen 濃度について. *日本内分泌学会雑誌*, 58, 876-885 (1982)







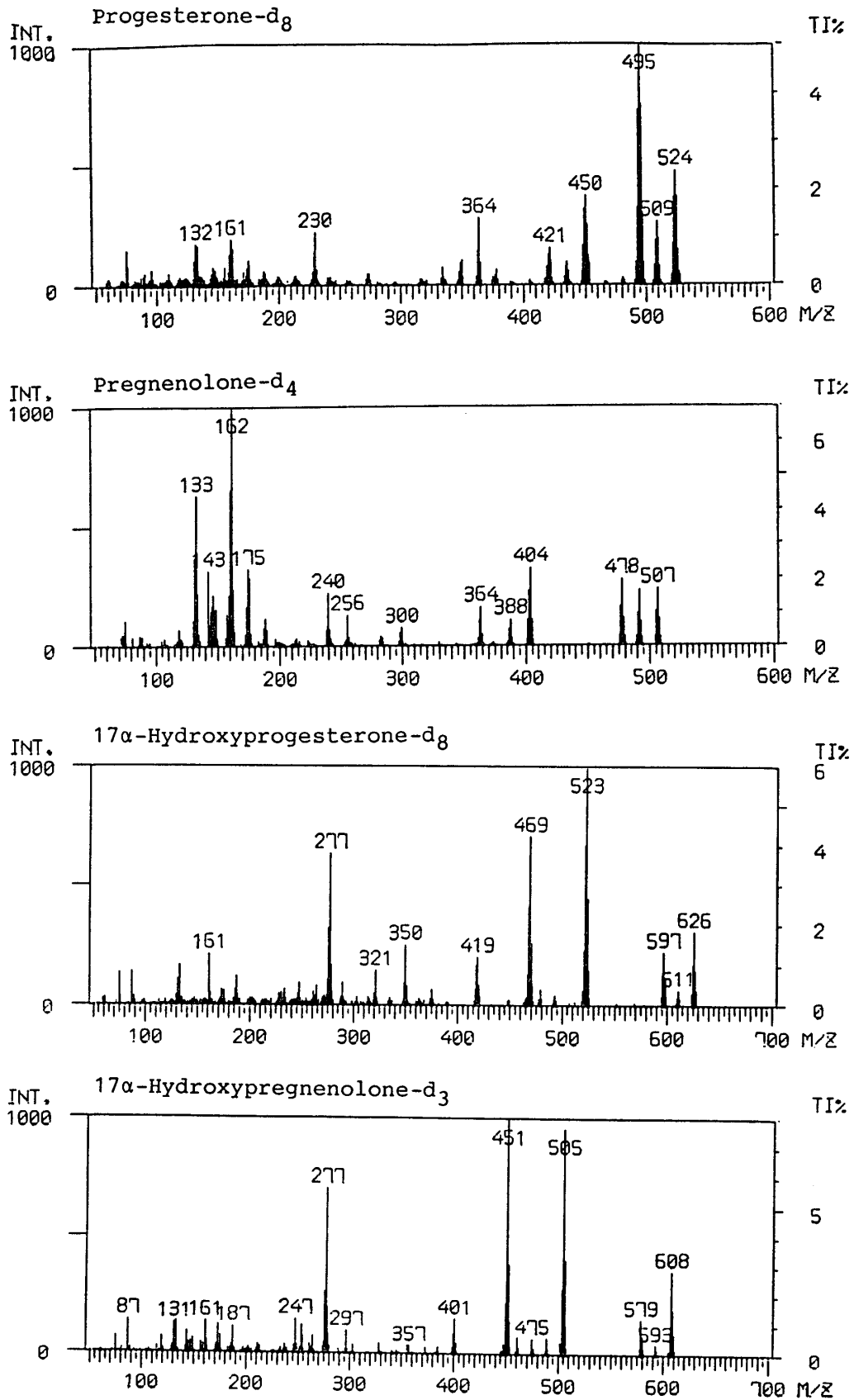
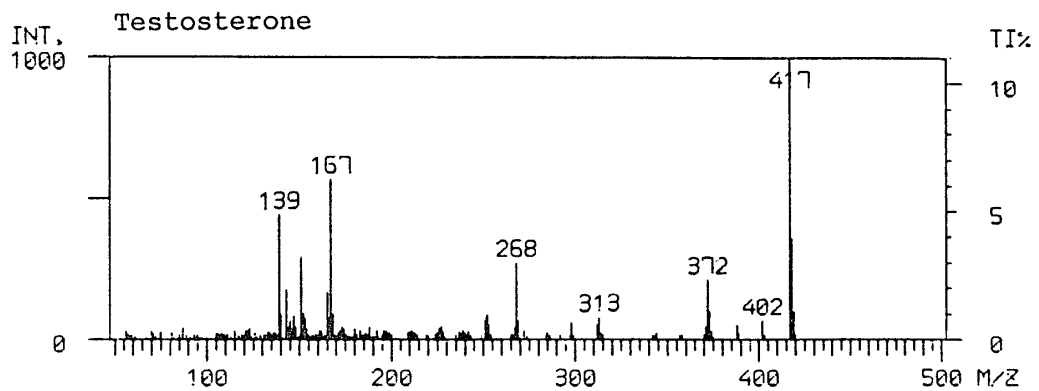
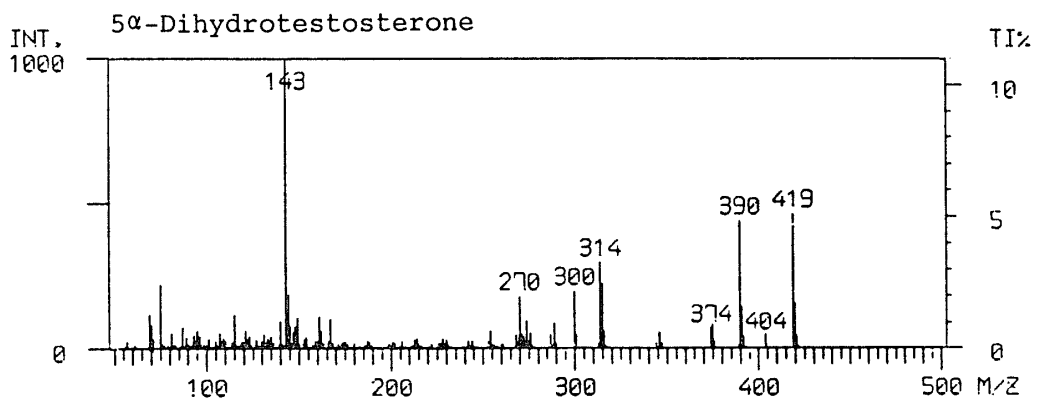
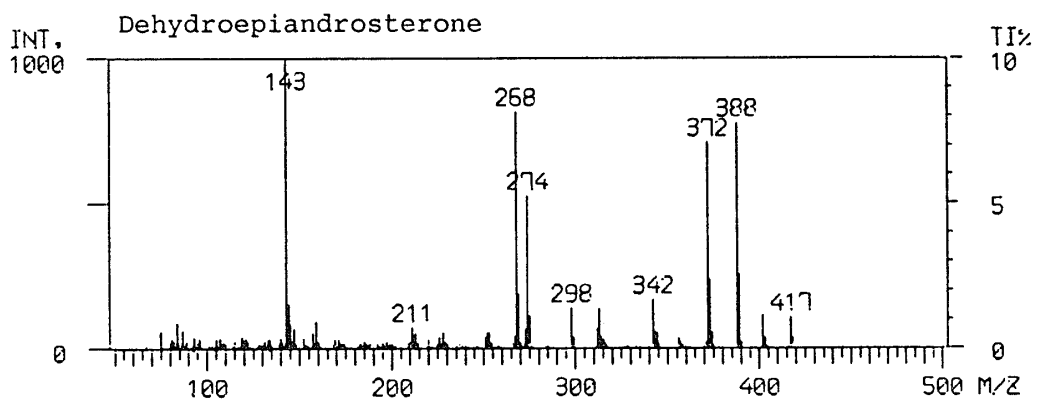
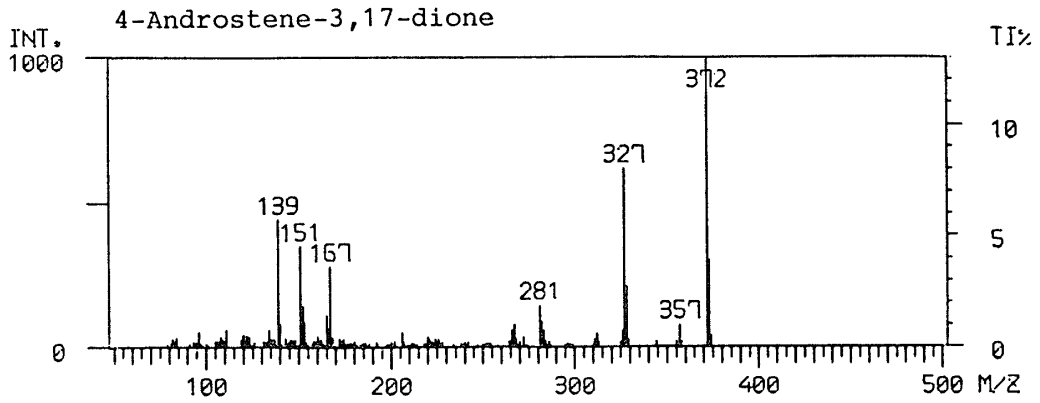
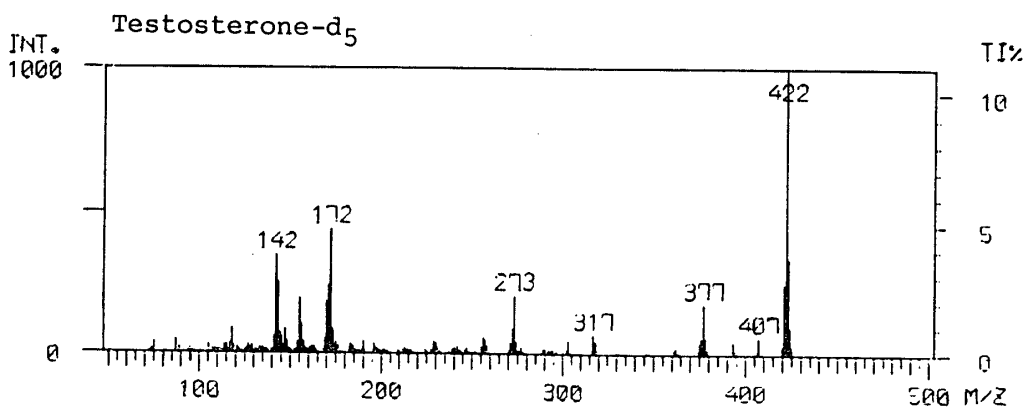
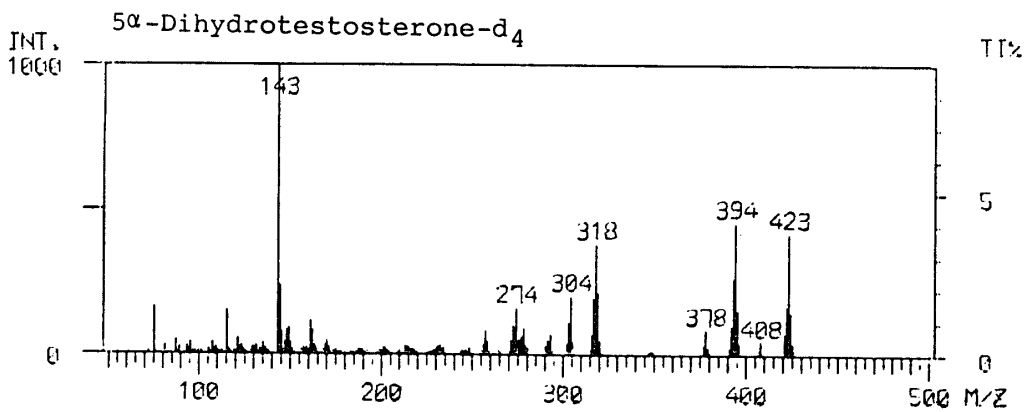
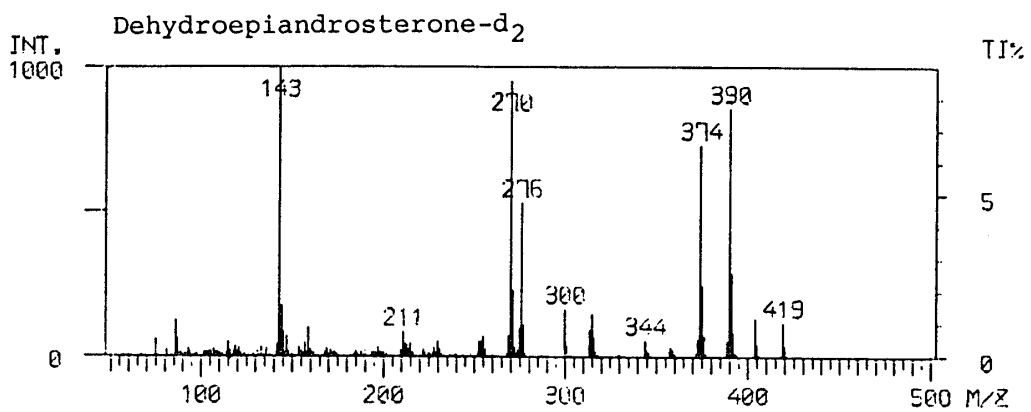
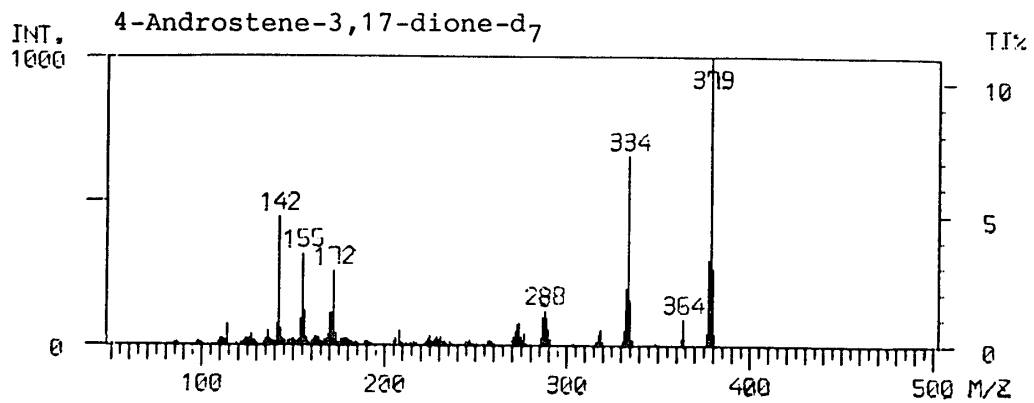
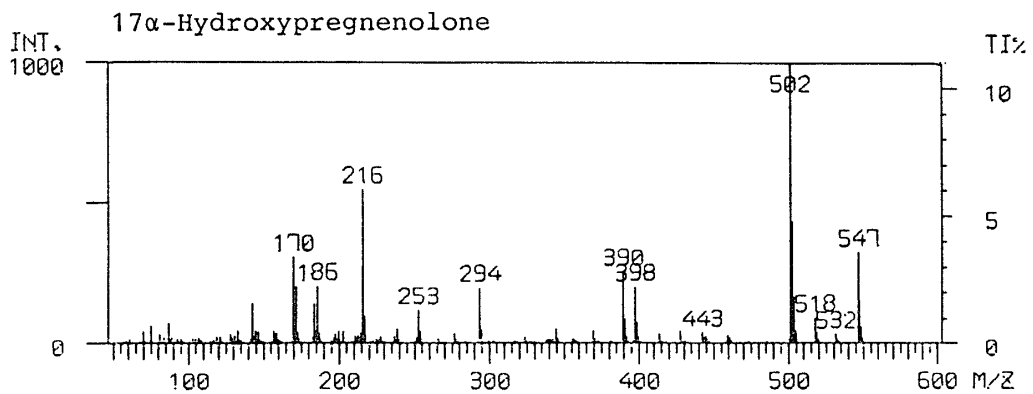
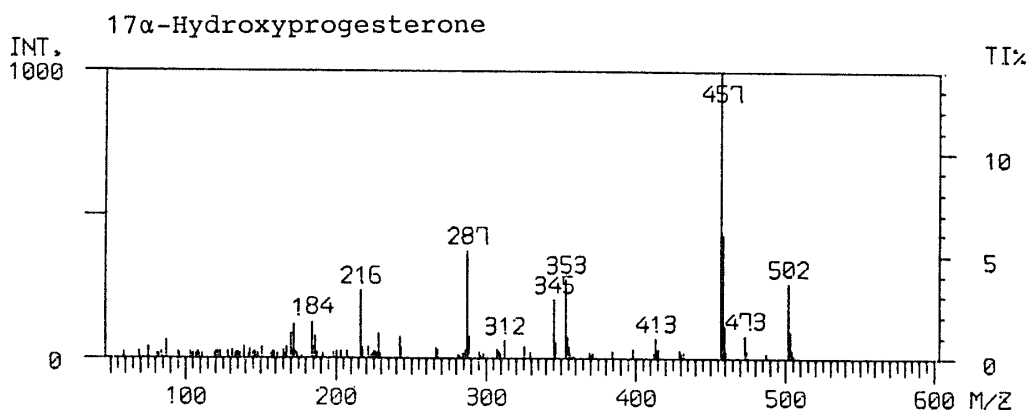
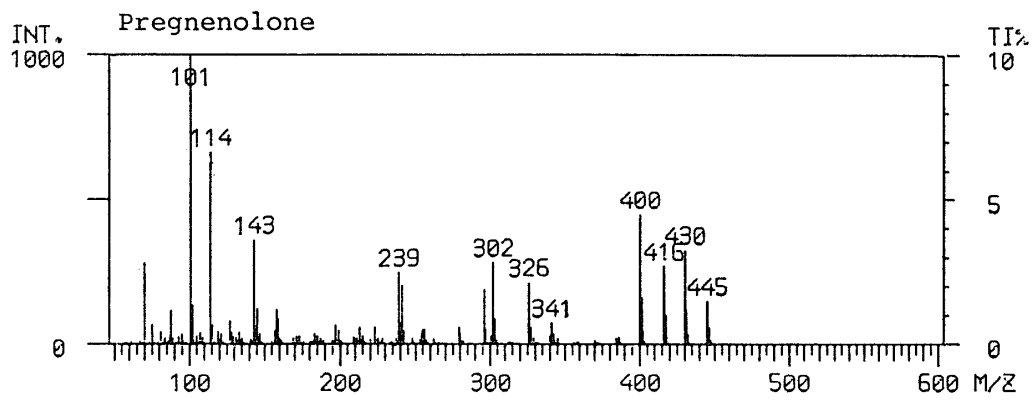
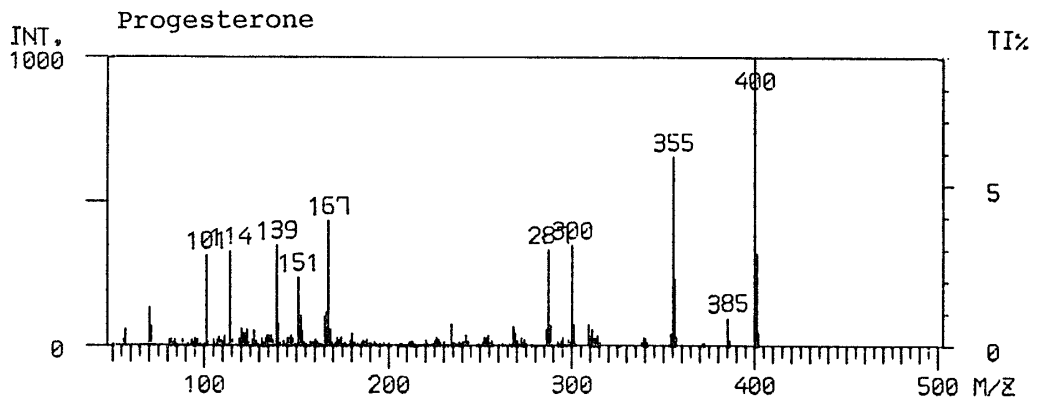


Fig. 2(A) Mass spectra of HO/DMES derivatives of steroids.









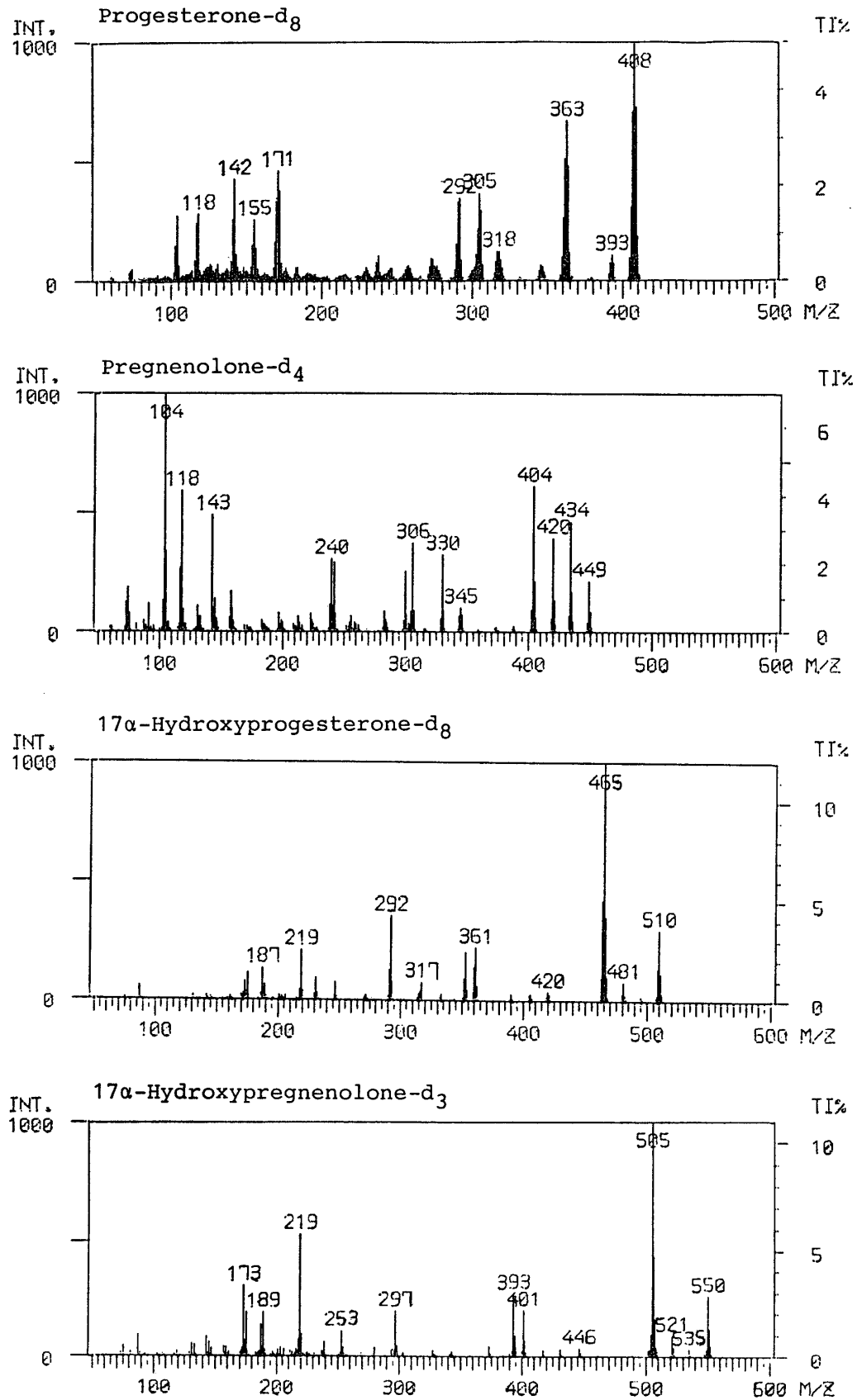


Fig. 2(B) Mass spectra of EO/DMES derivatives of steroids.