—— ポストコンGRESシンポジウム (東京) ——

講演紹介

E. C. Horming*: 生体内代謝研究における気相分析法**

1 生体成分のプロファイル分析

最近、生体成分の気相分析法は急速に進歩したが、われわれの研究所におけるこの分野の最近の研究について述べる。われわれの研究室では人の代謝物の研究に二つのタイプの気相分析システムを用いている。一つは電子衝撃イオン化ソースをもつ LKB-9000 GC-MS と DEC PDP 12 を結合した GC-MS-COM (コンピューター) システムで、もう一つは化学的イオン化ソースをもつ Finnigan GC-MS (四重極マス) と DEC-PDP 8/I を結合した GC-MS-COM 装置である。この二つとも現在の代表的システムである。このほかに二重収束型のいわゆる高分解能マスペクトルもコンピューターと直結して用いているが、これらはいずれも生体内代謝物のプロファイル分析に用いている。コンピューターは現在ではテータ分析に用いられているが将来臨床診断に用いるものである。

代謝物プロファイルというのは要約すれば人間のある代謝物群の大部分または全部が含有している生体試料の多成分分析のことである。分離は GC によって行なわれ個々の組成はマスペクトルによって同定されるわけであるがそのステップを分けると、(1) 生体試料からいわゆる化学分析試料といえるものを単離すること、(2) 得られた化学試料を誘導体をつくることによって機器分析試料に変換すること、(3) GC, GC-MS, または GC-MS-COM 装置により分析しテータを得る、(4) 装置からのテータを化学的知見に変える、いい替えれば、研究しようとする各成分の同定と定量、(5) 得られた化学的知見を生物学的知見に変換する。この最後のステップは必ずしも分析と関係ないかもしれないが、研究の生物学的または生化学的意義はこれによってはじめて完結される。

* Baylor College of Medicine

** Gas Phase Analytical Methods for the Study of Human Metabolic Problems

る。それぞれのステップは場合によってはいっしょに行なわれたりまた省略されたりする。

2 応用例

次に代謝物プロファイルの応用例について述べる。ここで述べるのは尿中のステロイド、尿中の酸、尿中の糖類などである。

ステロイド分析についてはわれわれは長年研究を続けており、尿中のステロイドプロファイルについてはすでに各種の例を発表してきた。ステロイドのサンプルは尿の酵素加水分解によって得られる。種々の加水分解法が報告されているが、最も適当な方法は Helx pomatia の酵素 Glusulase を用いる方法である。ある場合には Fotherby-Roy 加水分解法が用いられる。これは酸性にせずに尿を加熱する方法である。17-ケトステロイドには Vestergaard の酸加水分解法も用いられる。普通の酸加水分解は適当でない。ポリヒドロキシステロイドの抽出には極性溶媒、たとえば酢酸エチルが必要である。

ステロイドの誘導体については非常に多くの研究がなされてきた。一または二置換ステロイドは直接分析できるが、それ以上の置換基を持つステロイドは GC 分析の前に誘導体にななければならない。立体障害のないケトンたとえば 3, 16, 17, 20-ケトン体の誘導体は普通メトキシム (MO) である。水酸基は一般にトリメチルシリル (TMSi) エーテルに変換する。TMSi 化は一つ of the ステロイドから多くの誘導体ができないように反応条件を選ばなければならない。現在ではすべての水酸基が TMSi 化されるよい条件が見つっている。すなわちメトキシアン塩酸塩と 60°C で 15 分加温して MO 化後、トリメチルシリルイミタソール (TSIM) と 100°C で 2 時間加熱するとステロイドのすべての水酸基が TMSi 化される。

図 1 は男性尿のステロイドプロファイルである。このプロファイルは性、年齢、病気などによって非常に異なる。

図 1 男性尿ステロイドの代謝物プロファイル (TMSi および MO-TMSi 誘導体)

1% OV-1, 170°C→1°C/min; glucosylase 加水分解による, 黒ピークは酵素からのブランクである. STD, 内標準 cholesteryl butyrate

図 2 妊婦尿ステロイドの代謝物プロファイル (third trimester) (TMSi および MO-TMSi 誘導体)

1% OV-1, 170°C→1°C/min

っている。たとえば図2は妊婦の尿中ステロイドプロファイルである。プレグナンジオールなどが主ステロイドである。胎児胎盤によるステロイド合成に基づく代謝物が明らかに示されている。このようにしてステロイドプロファイルを変化させる種々の病理学的症状を研究することができる。

新生児のステロイドプロファイルは小児および成人の場合と著しく異なっていて、違った種類のステロイドである。しかし比較的少量(2~20 mg/24 hr)に分泌する。大部分 5-エン-3β-オールステロイドのスルフェート抱合型であり、そのプロファイルはわれわれによって明らかにされてきた。

MO-TMSi 誘導体について述べたが、ベンジルオキシム (BO)-TMSi 誘導体も同じように合成することができる。BO-TMSi は MO-TMSi よりはるかに長い保持時間を示す。したがってケト基(反応性のない 11-ケト

は除く)をもったステロイドと水酸基のみのステロイドを容易に区別することができる。これを尿中ステロイドプロファイル分析に利用すると水酸基ステロイド(H-シリーズ)と反応性のあるケト基をもったステロイド(K-シリーズ)がよく分離される。図3は正常成人尿のプロファイルを示し TMSi 誘導体と BO-TMSi 誘導体が 1% Dexsil 300 によってよく分離されていることを示している。図4は新生児尿中ステロイドの BO-TMSi 誘導体のプロファイルである。

尿中の酸のサンプルの作り方に二つの方法がある。一つは酢酸エチルとエーテルで抽出する方法でこれによってすべての通常の芳香族酸が抽出されてくるが、同時に若干の水溶性酸も抽出される。この方法は尿中の芳香族酸を研究対象とする場合に用いられるが、クレーブサイクルの酸およびグルクロナイドに対しては抽出ふじゅうぶんで適当でない。もう一つの方法は全部の酸性フラ

図 3 正常男性尿ステロイドの代謝物プロファイル (TMSi および BO-TMSi 誘導体)
1% Dexsil 300; 200°C→1°C/min

図 4 新生児尿ステロイドの代謝物プロファイル (生後 2 日) (TMSi および BO-TMSi 誘導体)
1% SE-30, 175°C→1°C/min; H-2, 5-アンドロステン-トリオール; H-III, 5-アンドロステン-3β, 16α, 17β-トリオール; H-4, エストリオール; H-6, H-7, H-9, 5-アンドロステン-テトラオール; H-13, コレステロール; K-I, 5-アンドロステン-3β, 16α-ジオール-17-オン; K-1, K-2, K-3, 5-アンドロステン-トリオール-オン; K-II, 5-アンドロステン-3β, 17β-ジオール-16-オン; K-IV, 5-プレグネン-3β, 16α-ジオール-20-オン; K-7, 5-アンドロステン-トリオール-ジオン

クシオンを対象とする場合で、DEAE-セファデックスのカラムを通して酸性分を単離する方法である。通常分析する誘導体としてはメチルエステル (ME) および ME-TMSi である。プロファイルのパターンは病理学的症状および薬物投与によって変わってくる。たとえばアスピリン投与後の患者のパターンには salicylic acid および salicylic acid の大きなピークが現われる。図 5 は新生児の尿中芳香族酸のプロファイルである。多

くの未同定の小さなピークがあるが、おとなのものより簡単なパターンを示している。薬物の代謝物を容易に検出することができる。たとえば母親が妊娠中に飲んだ薬物の代謝物が新生児の尿中酸のプロファイルに明らかに観察される。このような化合物の構造決定にはどうしても GC-MS システムが必要になる。

尿中および血清中の糖および糖アルコールは同様な方法で研究されており、TMSi 化して分析することにより

図 5 正常新生児の尿中芳香族酸のプロファイル (TMSi-メチルエステル誘導体)

10% F-60, 100°C→2°C/min; P-HPAA, *p*-hydroxyphenyl acetic acid; Hipp, hippuric acid; HVA, homovanillic acid; VMA, vanilmandelic acid; 3,4-DHMA, 3,4-dihydroxymandelic acid; 5-HIAA, 5-hydroxy-indole acetic acid; STD, 内標準 methyl nonadecanoate

それらのプロファイルが得られる。

以上述べたようなプロファイル分析は病院でルチンワークとして診断に用いるもので、将来ぜひこのような分析が必要になる。

3 化学的イオン化マスペクトル

次に化学的イオン化マスペクトル (CI-MS) について簡単に述べようと思う。この 2, 3 年のうちにマスペクトロメーターの相当部分が CI-MS になるであろう。その特徴は CI では単に数本のピークが現われるにすぎず、非常に単純なスペクトルで、オーバーラップがきわめて少なく、スペクトルをほぼ予言することができる。またノイズが少ない。これらは電子衝撃型に比べ著しく異なる点である。

CI でメタンをイオンソースとして用いた場合、 CH_5^+ からのプロトン移行により大部分の酸素または窒素化合物は MH^+ のピークを与え {炭化水素では $(\text{M}-\text{H})^+$ のピークを与える}、この MH^+ は安定であるがまた分裂も起こす。普通の反応は脱水、脱アルコールまたは脱トリメチルシラノールである。多くの含窒素化合物は安定な MH^+ を与える。プロトン移行はイソブタンやアンモニアをイオンソースとした場合にも起こる。アンモニアの場合窒素含有医薬の研究上たいへん興味あることが起こる。それは二つの反応すなわちプロトン移行による安定な MH^+ と付加反応による MNH_4^+ を与えるからであり、この二つのイオンの生成比は M の酸性度によっている。

CI-MS は医薬品代謝への研究に非常に有用である。たとえばフェノバルビタールの代謝について述べると、われわれはまず主代謝物を研究し、ついでマイナーな代謝物を追跡しているが、この場合主代謝物は *p*-ヒドロキシフェノバルビタールである。この CI-MS は $\text{M}+1$

のピークが主ピークでそのほか二、三のピークが出るにすぎず、同定は非常に容易である。したがって GC 分析で他の化合物の大きなピークにかくれているような薬物またはその代謝物の微量を検出することができる。このようにして GC-MS-COM を用いれば非常に特異的検出器を直結したことになる。こうして MID (多重イオン検出) または SIM (単一イオンモニター) のテクニックによるハードウェアによるか、またはくりかえしスキャンニングするプログラム分析によって生体成分の超微量分析が可能になるのである。

4 む す び

最後にこのような生化学および医学の分野での気相分析の将来について少し述べてみたい。まず将来臨床化学分析として全自動装置がどうしても必要である。分離の問題は目下もっぱら充てんカラムを用いているが、近く 250~300°C まで安定な再現性のあるガラスキャピラリーカラムができるであろう。これは生化学の目的に非常に役にたつ。マスペクトルとしては CI が必要であるが、さらに新たに設計されたコンピューターが必要になるだろう。

もう一つの大きな問題は診断に用いる安定な同位元素すなわち ^{13}C である。 ^{13}C の同位元素比の測定にマスのテクニックが必要になる。これは将来医学的診断に非常に重要である。それには相当量の ^{13}C が必要になるが 3 年前米国原子力委員会が ^{13}C の分離プロセスを決定し、今年度は 9 kg の ^{13}C を生産することになっているが、この量はさらにスケールアップされるであろう。以上、生体成分の気相分析はますます発展するにちがいない。

(東京工業大学天然物化学研究施設 池川信夫)