報 文

液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析法
による血清デヒドロエピアンドロステロンサルフェートの定量中島 正晴*, 若林 広行*, 大 和 進*, 嶋田 健次^{®*}Quantification of serum dehydroepiandrosterone sulfate by liquid chromatography/
atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry

Masaharu NAKAJIMA, Hiroyuki WAKABAYASHI, Susumu YAMATO and Kenji SHIMADA *

*Department of Analytical Chemistry, Niigata College of Pharmacy,
5-13-2, Kamishin'ei-cho, Niigata 950-21

(Received 11 January 1996, Accepted 22 February 1996)

Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/APCI-MS) combined with a column switching technique was applied to the quantification of serum dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S). Human serum samples were directly injected into the sample preparation column (TSK precolumn BSA-ODS), and then DHEA-S was separated by an analytical column of Inertsil ODS-2. DHEA-S was detected on-line by a Hitachi M 1000 mass spectrometer equipped with an APCI interface. For the detection of DHEA-S, the drift, focus, and multiplier voltages were set at -70 V, -120 V and 2.4 kV, and the vaporizer and the desolvation temperatures were set at 280 and 399°C, respectively. The applied potential for the needle electrode was -10 μ A. The detection limit of DHEA-S was 10 ng on-column with a signal-to-noise ratio of 3. The calibration curve was linear over the range of 50~300 ng on-column. The proposed method was successfully developed for the determination of DHEA-S in human serum.

Keywords : LC/APCI-MS; column switching; quantification; dehydroepiandrosterone sulfate; serum.

1 緒 言

ヒト血清中には遊離型ステロイドとともに硫酸又はグルクロン酸抱合型のステロイドも存在する。デヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEA-S) はヒト副じん (腎) 網状帯由来の副腎アンドロゲン中の主要ステロイドの一つで、血中半減期が長く血中濃度の日内変動

が少ないことから、DHEA-S の濃度測定は副腎皮質機能を判断する指標として有用視されている¹⁾。従来、DHEA-S の測定法は主としてラジオイムノアッセイ (RIA) が採用されてきたが²⁾、RIA は抗体の差異に伴い測定値に大きな変動を生じる³⁾。最近、RIA に代わる方法としてガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS)、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) による測定法が報告されている^{4)~6)}。GC/MS による血清 DHEA-S の測定は高選択性、高精度、高感度を得られ

* 新潟薬科大学薬品分析化学教室: 950-21 新潟県新潟市上新栄町 5-13-2

る反面、血清試料からの抽出の際に、遊離型との分画、抱合体の加水分解、更には誘導体化などの煩雑な前処理操作が必要となる⁴⁾。又、既に報告されているサーモスプレー (TSP) 法あるいは高速電子衝撃 (FAB) 法を用いた LC/MS においても、前処理カートリッジあるいは修飾セファロースカラムを用いて血清から抽出して測定している⁵⁾⁶⁾。

煩雑な前処理を行わずに分離分析できる前処理カラムを接続したカラムスイッチング法は、再現性のよい抽出が可能となり精度の向上にも役立つ。又、不安定薬物の分析にも利用可能な方法であり、LC/MS との組み合わせは簡易な定量法となりうる。大気圧化学イオン化法 (APCI) はソフトなイオン化法としてエレクトロスプレー法とともに、幅広い応用性と高い安定性を有する LC/MS のインターフェースとして利用されるようになっている。著者らは、カラムスイッチング法を用いた HPLC と APCI-MS を組み合わせて、血清試料をなんら前処理せずに直接注入し、ヒト血清中の DHEA-S を簡易・迅速に定量する方法を確立し、更にヒト血清中の DHEA-S の定量に適用した。

2 実 験

2.1 試 薬

酢酸アンモニウム、アセトン、アセトニトリルなどの試薬及び溶媒は、いずれも市販の特級又は HPLC 用 (関東化学) を用いた。DHEA-S、アンドロステロンサルフェート、エピアンドロステロンサルフェートの各ナトリウム塩は Sigma 製を用いた。テストステロンサルフェートは既知の方法により合成した⁷⁾。

2.2 装 置

Fig. 1 に本研究で使用した HPLC システムの流路図を示す。HPLC ポンプには日立 L-6200 及び日立 L-6000 ポンプを、インジェクターには Rheodyne 7125 を、又バルブ切り替えにはジョーエルサイエンス製の自動六方高圧バルブをそれぞれ用いた。

分離カラムには、Inertsil ODS-2 (150×4.8 mm i.d., ジョーエルサイエンス製) を、前処理カラムとしては TSK precolumn BSA-ODS カラム (3.5×4.6 mm i.d., 東ソー製) を用いた。

質量分析装置として APCI を装着した四重極質量分析器 M-1000 を用いた (日立製)。MS 条件はドリフト電圧 (D. V.): -70 V, フォーカス電圧 (F. V.): -120 V, マルチプライヤー電圧 2.4 kV, 噴霧温度 (V. T.): 280°C, 脱溶媒温度 (D. T.): 399°C, 針電極:

Fig. 1 Flow system for determination of dehydroepiandrosterone sulfate

Pump: P-1, L-6200; P-2, L-6000; P-3, L-6000; Mobile phase: A, CH₃CN: 0.1 M ammonium acetate (pH 3.5) (5 : 95, v/v), B, CH₃CN: H₂O (15 : 85, v/v) containing 5 mM ammonium acetate; C, CH₃CN: H₂O (65 : 35, v/v) containing 5 mM ammonium acetate; D, CH₃CN: H₂O (5 : 95, v/v) containing 5 mM ammonium acetate; E, 100% acetone; S: sample injector; Column: C-1, TSK precolumn BSA ODS column; C-2, Inertsil ODS-2; Time program: an isocratic elution with eluent A for 7 min, and then a linear gradient from eluent B to eluent C for 18 min. The flow was first conducted as shown by the solid line, and then the flow was changed using a six-port switching valve as shown by the dotted line

—10 μA にそれぞれ設定して測定した。

定量は絶対検量線法により行い、DHEA-S 溶液 (500 μg/ml) を適宜希釈して注入し、選択イオン検出 (SIM) モードで測定した。添加回収実験は活性炭処理により内在性の DHEA-S を除去したヒト血清 (100 μl) に、DHEA-S 溶液 100 μl (各 100, 200 ng 含有) を添加して行った。ヒト血清中の DHEA-S の定量は水で 2 倍希釈した試料 200 μl を注入して行った。

2.3 分析条件

移動相として、溶離液 A: アセトニトリル-0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5) (5 : 95, v/v), 溶離液 B: 5 mM 酢酸アンモニウムを含有するアセトニトリル-水 (15 : 85, v/v), 溶離液 C: 5 mM 酢酸アンモニウムを含有するアセトニトリル-水 (65 : 35, v/v), 溶離液 D: 5 mM 酢酸アンモニウムを含有するアセトニトリル-水 (5 : 95, v/v) を用い、流量は 1.0 ml/min とし、これにイオン化を促進するためにポストカラム溶媒としてアセトンを送液 (0.5 ml/min) した。カラム温度は 40°C とした。Fig. 1 において血清中のタンパク質を溶出除去する状態 (カラムスイッチングバルブの流路が実線の状態) で血清を注入して溶離液 A を 7 分間送液

し、血清中のタンパク質を溶出除去後、前処理カラムを分析カラムと接続し、溶離液 B 100% から溶離液 C 100% へのグラジエント (18 分間) 法により DHEA-S を分離定量した。

3 結果と考察

3・1 フローインジェクション法による MS 測定条件の検討

Fig. 2 は実験の部に記した条件で測定した DHEA-S の正及び負イオン化測定による質量スペクトル (各 10, 100 μ g 注入) である。負イオン化測定においては Na 原子の脱離に基づく m/z 367 $[M-Na]^-$ が、正イオン化測定ではフラグメントイオンによる m/z 270 がそれぞれベースピークとして観察され、更に、正負イオン化スペクトルを比較したところ、負イオン化測定のほうが高感度であった。従って、DHEA-S の m/z 367 $[M-Na]^-$ の偽分子イオンを指標とする APCI-MS 検出を行うこととし、この検出系に影響を及ぼす因子として想定される、1) 溶出液に添加する揮発性電解質並びにその濃度、2) V. T., 3) D. T., 4) D. V., 5) F. V., 6) イオン化促進のためのポストカラム添加溶媒についてアセトニトリル-水 (45:55, v/v) を移動相とするフローインジェクション法によって検討した。

まず、移動相に添加する電解質のうち揮発性の高いアンモニウム塩につき、構成する酸の種類と濃度についてその影響を検討した。アンモニウム塩を構成する酸を酢酸から pK_a の小さいギ酸、トリフルオロ酢酸に変えて、 $[M-Na]^-$ イオンのイオン強度に及ぼす電解質の影響を検討したところ、 pK_a 値が小さい酸ほど $[M-Na]^-$ イオンのイオン強度が低下することが判明し、酢酸アンモニウムがその中では良好であるので添加塩として用いることとした。又、酢酸アンモニウムの濃度の影響について検討した結果を Fig. 3 に示す。酢酸アンモニウムの濃度はより希薄なほうが偽分子イオン強度が強くなることが判明したので、 $[M-Na]^-$ イオンのイオン強度及び後述する HPLC の分離状況から、本実験では 5 mM 酢酸アンモニウムを用いることとした。又、LC/APCI-MS のイオン化効率を向上させるためには、ポストカラム方式によって各種の溶媒を導入するとイオン化効率の向上に好結果が得られることから、メタノール、アセトニトリル、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトンなどの溶媒を Fig. 1 の P-2 から導入し、その効果について検討した。その結果、溶媒としてアセトンが最良であることが確認されたので、移動相 1.0 ml に対してアセトンを 0.5 ml の割合で添加する

Fig. 2 Mass spectrum of dehydroepiandrosterone sulfate

A: negative mode; B: positive mode. A portion (100 μ l) of a standard solution of DHEA-S (A: 10 μ g; B: 100 μ g) was applied to the APCI-MS by the flow injection mode

Fig. 3 Effect of concentration of ammonium acetate in mobile phase on the ionization of dehydroepiandrosterone sulfate

Portions (100 μ l) of a standard solution of DHEA-S (500 ng) were applied to the APCI-MS by the flow injection mode

こととした。至適 V. T., D. T. については、V. T.: 280°C, D. T.: 399°C の条件のときに m/z 367 $[M-Na]^-$ の偽分子イオンを最も感度よく検出でき (Fig. 4), 又 D. V. については、D. V.: -70 V におい

Fig. 4 Effect of vaporizer and desolvation temperature on the ionization of dehydroepiandrosterone sulfate

○: vaporizer temperature; □: desolvation temperature. Portions (100 μ l) of a standard solution of DHEA-S (500 ng) were applied to the APCI-MS by the flow injection mode

Fig. 5 Effect of drift and focus voltage on the ionization of dehydroepiandrosterone sulfate

○: drift voltage; □: focus voltage. Portions (100 μ l) of a standard solution of DHEA-S (500 ng) were applied to the APCI-MS by the flow injection mode

て $[M-Na]^+$ イオンのイオン強度が最も強くなり、それより高い D. V. ではフラグメンテーションが起こり、 $[M-Na]^+$ イオン強度は弱まった。F. V. についても -120 V が最も良い結果を与え、MS の測定条件として D. V.: -70 V, F. V.: -120 V で測定することとした (Fig. 5)。なおメタノールをアセトニトリルの代わりに用いて同様の検討を試みたが、アセトニトリルのほうが

高感度であった。

既に粟田らは、APCI をインターフェースとした二重収束型質量分析計を用いて DHEA-S の測定を検討しているが、測定条件並びに得られた質量スペクトルは著者らの実験結果とはかなり異なっている⁸⁾。又、岩淵らは、二重収束型質量分析計を用いた薬物代謝の研究において、薬物の硫酸抱合体のような高極性で、難揮発性な物質の測定には APCI インターフェースは適さないと報告している⁹⁾。しかし、著者らの本報における詳細な条件検討や、甲斐らが高極性化合物であるエンケファリンペプチドの LC/APCI-MS 定量において到達した条件¹⁰⁾などから明らかなように、被検物質によって至適測定条件はそれぞれ異なる。従って LC/MS による分析を行うためには、個々の被測定物質に対する至適測定条件を十分に検討する必要があると考えられる。

3.2 分離条件の検討

前処理カラムとして TSK プレカラム BSA-ODS カラム、カプセルパック MF-Ph-1 (資生堂製)、L-1180 (化学品検査協会製) を、分離カラムとして Inertsil ODS-2 を用いて、DHEA-S、アンドロステロンサルフェート、エピアンドロステロンサルフェート、テストステロンサルフェート混合物、及び DHEA-S を添加したヒト血清について、分離とその回収率より至適分析条件を検討した。その結果、実験の部で記した条件で最も良好な結果が得られ、DHEA-S、アンドロステロンサルフェート、エピアンドロステロンサルフェート、テストステロンサルフェート混合物 (各 200 ng 注入) について SIM モードで測定したとき、Fig. 6 に示すマス chromatogram が得られた。

3.3 定量

この分析条件における検出限界は、 $S/N=3$ としたときに 10 ng であり、検量線は DHEA-S 量として、50 ng から 300 ng の範囲内で直線性を示し、回帰直線式は $Y=20.558X-929.5$ ($r=0.977$, X =DHEA-S の注入量, Y =ピーク高さ) であった。又、200 ng の標準試料を繰り返し 4 回注入したときの相対標準偏差 (RSD, %) は、3.5% であった。

Fig. 7 にヒト血清より得られた DHEA-S の典型的なマス chromatogram を示した。既知量の DHEA-S (各 100 又は 200 ng) を活性炭処理したヒト血清 100 μ l に添加し、回収率を求めた結果、回収率 (mean $\pm$ S.D., $n=4$) はそれぞれ 89.6 $\pm$ 3.8, 86.3 $\pm$ 5.7% であった。又、本法によりヒト血清中の DHEA-S 量を測定した結

Fig. 6 Standard mass chromatogram of dehydroepiandrosterone sulfate, testosterone sulfate, epianandrosterone sulfate and androsterone sulfate

Peaks: 1, testosterone sulfate; 2, DHEA-S; 3, epianandrosterone sulfate; 4, androsterone sulfate. A portion (200 μ l) of a standard solution of steroid sulfates (200 ng, respectively) was applied to the LC/APCI-MS through a precolumn and an analytical column

Fig. 7 Mass chromatogram obtained with normal human serum

Peaks: 1, DHEA-S; 2, androsterone sulfate. A portion (200 μ l) of serum sample was applied to the LC/APCI-MS with a precolumn and an analytical column.

果 (Table 1) は 1.61~2.77 μ g/ml で、それぞれの値はこれまでに報告されている LC/MS, GC/MS の結果とよく一致している^{4)~6)}。

以上、本法は Wudy らの GC/MS 法⁴⁾に比べて多量のサンプルを使用する反面、抽出、加水分解、誘導体化

Table 1 Concentrations of dehydroepiandrosterone 3-sulfate in normal human sera

Sex ^{a)}	DHEA-S/ μ g ml ⁻¹ mean $\pm$ S. D. ^{b)}
M	2.54 $\pm$ 0.15
M	2.77 $\pm$ 0.06
M	2.48 $\pm$ 0.07
M	2.26 $\pm$ 0.03
M	1.61 $\pm$ 0.11
F	1.76 $\pm$ 0.07

a) M: male; F: female; b) n=4

など煩雑な前処理操作を必要とせず、ほかの測定法と比べて短時間に血清 DHEA-S を測定することができるが、検量線のダイナミックレンジはそれほど大きくなかった。その一因として想定されることは、DHEA-S のイオン化効率が試料濃度に依存することであり、イオン化効率は日間でも変動した。これらを改善するためには、同じイオン化効率を示す被測定物質の安定同位体標識化合物を用いる内標準法を検討する必要がある。カラムスイッチング法と組み合わせた LC/APCI-MS 法は、被測定物質について適切な測定条件が設定できれば、GC/MS 法では直接測定が不可能な抱合体などの極性化合物でも、生体試料から抽出、加水分解などの煩雑な前処理操作を施すことなく直接分析することが可能となり、応用範囲の広い測定法となりうると考えられる。

文 献

- 樋口和己, 井林 博: 臨床と研究, **62**, 764 (1985).
- J. E. Buster, G. E. Abraham: *Anal. Lett.*, **5**, 543 (1972).
- F. I. Chasalow, S. L. Blethen, D. Duckett, S. Zeitlin, J. Greenfield: *Steroids*, **54**, 373 (1989).
- S. A. Wudy, U. A. Wachter, J. Homoki, W. M. Teller: *Horm. Res.*, **39**, 235 (1993).
- C. H. L. Shackleton, C. Kletke, S. A. Wudy, J. H. Pratt: *Steroids*, **55**, 472 (1990).
- S. J. Gaskell: *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.*, **15**, 99 (1988).
- H. Eriksson, J. Gustafsson: *Eur. J. Biochem.*, **13**, 198 (1970).
- 栗田則男, 能海和宣: 第 14 回 BMS 談話会講演要旨集, p. 69 (1987).
- 岩淵晴男, 北沢栄一, 中川明彦, 中村皖一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 181 (1995).
- 甲斐雅亮, 高野智佳, 大倉洋甫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 757 (1995).

要 旨

血清中のデヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEA-S) をなんら通常の前処理操作を行わずに、液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析法 (LC/APCI-MS) によって測定する方法を検討した。本法はカラムスイッチング法を組み合わせた液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) であり、ヒト血清試料を直接カラムに注入し、内標準物質を使わずに DHEA-S を定量するものである。除タンパク操作と DHEA-S の吸着の目的に BSA-ODS カラムを、分析カラムには Inertsil ODS-2 を用いた。検出には APCI をインターフェースとした四重極質量分析器 M-1000 を用い、MS の測定条件は、ドリフト電圧: -70 V, フォーカス電圧: -120 V, マルチプライヤー電圧 2.4 kV, 噴霧温度: 280°C , 脱溶媒温度: 399°C , 針電極: -10 μA に設定した。本法による DHEA-S の検出限界 ($S/N=3$) は 10 ng であり、更に 100 μl のヒト血清を用いたときの検量線は DHEA-S 量として $50\sim 300$ ng の範囲内で直線性を示し、定量可能であることが確認され、ヒト血清中の DHEA-S の定量に応用できた。