17-ketosteroids の GC-MS による分析のための揮発性誘導体の研究

Studies of Volatile Derivatives of 17-Ketosteroids for GC-MS Analysis

正田 芳郎*・橋本 圭二*・井上 武久*・正木 清孝*

YOSHIRO MASADA, KEIZI HASHIMOTO, TAKEHISA INOUE AND KIYOTAKA MASAKI

(1970年11月19日受理)

The use of volatile derivatives of 3 α -hydroxy-17-ketosteroids for gaschromatographic separation have been recommended.

Mass spectra of 3 α -hydroxy-17-ketosteroids, trifluoroacetate and trimethylsilylether derivatives were investigated, and trimethylsilyl ether derivatives were found particularly suitable for combined gaschromatography and mass spectrometry.

17-ケトステロイド(17KS)は副腎皮質のステロイドや testosterone で示される男性ホルモンの終末代謝産物で尿中に排泄される。

尿中17KSの測定は副腎皮質、性腺および脳下垂体などの機能の指標として臨床的な意義があり、広く測定されている。

ガスクロマトグラフィー(GLC)による17KSの分析についても報告は膨大なもので、分離成分はsteroid Number,¹⁾ Methylene Unit²⁾などにより同定されている。しかしこれらの方法はいずれも保持時間のみに基づいているため、分析条件など多くの困難を伴う。

近年ガスクロマトグラフを直結した質量分析計(GC-MS)による分析方法の開発により、GLCによる分離成分の同定は、GC-MS法による質量スペクトルから多くの情報を得て、より確実にできるようになった。

GLCによる17KSの分析は通常 trimethylsilyl (TMS) ether などの揮発性誘導体としたのち行ない良好な結果を得ている。

GC-MSにおいてもまず良好な分離を得るため GLC と同様に揮発性誘導体とする必要がある。

著者らは GLCのための17KSの揮発性誘導体——TMS および trifluoroacetate (TFA) 誘導体のマススペクトルの検討を行なった。

ステロイドの立体異性体のマススペクトルについては Djerassi ら,^{3), 4), 5)} Egger ら⁶⁾ などの報告があり、Fragmentation mechanism についてもすでに多くの報告があるが、著者らは17KSのTMS, TFA誘導体の5 α -androstane型(A環/B環 trans型)、(I)と5 β -androstane型(A環/B環 cis型)(II)の異性体について、そのマススペクトルを検討し2, 3の知見を得たので報告する。

* 京都薬科大学, 正田研究室
 Kyoto College of Pharmacy (Yamashina-Misasagi, Higashiyama-ku, Kyoto).

androsterone (Ⅲ), etiocholanolone (Ⅳ), 11-ketoandrosteron (Ⅴ), 11-ketoetiocholanolone (Ⅵ), 11-hydroxyandrosterone (Ⅶ) および 11-hydroxyetiocholanolone (Ⅷ) など 6 種, すなわち (Ⅲ) と (Ⅳ), (Ⅴ) と

(Ⅵ) および (Ⅶ) と (Ⅷ) の 3 組の立体異性体およびその TMS 誘導体 ($R_1 = (CH_3)_3Si-$), TFA 誘導体 ($R_1 = CF_3CO-$) を GC-MS および MS により, 各々のマススペクトルを得た (Fig. 1 ~ Fig. 6) (Table 1).

Fig. 1. Mass spectra of androsterone (Ⅲ) derivatives.

a) androsterone. b) androsterone trimethylsilylether.
c) androsterone trifluoroacetate.

Fig. 2. Mass spectra of etiocholanolone (Ⅳ) derivatives.

a) etiocholanolone b) etiocholanolone trimethylsilylether
c) etiocholanolone trifluoroacetate

Fig. 3. Mass spectra of 11-ketoandrosterone (V) derivatives
 a) 11-ketoandrosterone b) 11-ketoandrosterone trimethylsilylether
 c) 11-ketoandrosterone trifluoroacetate

Fig. 4. Mass spectra of 11-ketoetiocholanolone (VI) derivatives.
 a) 11-ketoetiocholanolone b) 11-ketoetiocholanolone trimethyl-
 silylether c) 11-ketoetiocholanolone trifluoroacetate

Fig. 5. Mass spectra of 11-hydroxyandrosterone (VII) derivatives.
a) 11-hydroxyandrosterone b) 11-hydroxyandrosterone trimethyl-
silylether c) 11-hydroxyandrosterone trifluoroacetate

Fig. 6. Mass spectra of 11-hydroxyetiocholanolone (VIII) derivatives.
a) 11-hydroxyetiocholanolone b) 11-hydroxyetiocholanolone trimeth-
ylsilylether c) 11-hydroxyetiocholanolone trifluoroacetate

17-ketosteroids の GC-MS による分析のための揮発性誘導体の研究

Table 1.

17-ketosteroids	R ₁	m/e (Relative intensity %)			
		Molecular Ion	Base Peak	M-R ₁ OH*	M-(R ₁ OH + CH ₃)*
androsterone (Ⅲ)	H	290(100)	290	272(18)	257(22)
	TMS	362(40)	272	272(100)	257(14)
	TFA	386(100)	386	272(25)	257(15)
etiocholanolone (Ⅳ)	H	290(100)	290	272(63)	257(10)
	TMS	362(16)	272	272(100)	257(48)
	TFA	386(100)	386	272(42)	257(26)
11-keto-androsterosterone (Ⅴ)	H	304(100)	304	286(15)	271(12)
	TMS	376(68)	129	286(34)	271(33)
	TFA	400(50)	286	286(100)	271(25)
11-keto-etiocholanolone (Ⅵ)	H	304(43)	232	286(52)	271(51)
	TMS	376(20)	271	286(66)	271(100)
	TFA	400(22)	232	286(63)	271(30)
11β-hydroxy-androsterone (Ⅶ)	H	306(100)	306	288(60)*	273(74)
	TMS	378(64)	270	288(71)	273(32)
	TFA	402(22)	107	288(77)	273(11)
11β-hydroxy-etiocholanolone (Ⅷ)	H	306(100)	306	288(72)*	273(89)
	TMS	378(20)	288	288(100)	273(64)
	TFA	402(45)	107	288(669)	273(46)

* contained elimination of 11-OH

これらのマスペクトルから(Ⅲ)～(Ⅷ)の各々誘導体の 5α-androstane 型(Ⅰ)と 5β-androstane 型(Ⅱ)の異性体のマスペクトルを比較したが、いずれもフラグメンとイオンは同じでイオン強度が異なるだけで両者の区別は困難である。

未知物質の同定の際はまず分子イオンピーク(M⁺)により推定することが多い、M⁺の強度については Free の型(R₁=H)のものが、TMS および TFA 誘

導体に比べて大きい異性体を区別することは困難である。

これら各々の分子イオンの強度に対する脱水イオンまたは脱水に相当する M-R₁OH (M-(CH₃)₃SiOH など) および M-(R₁OH+CH₃) のイオン強度の比 (M-R₁OH/M, M-(R₁OH+CH₃)/M) を求めると各々異性体間の値にかなりの差が認められた (Table II～IV)

Table 2.

	androsterone derivatives			etiocholanolone derivatives		
	R ₁ =H	R ₁ =(CH ₃) ₃ Si	R ₁ =CF ₃ CO	R ₁ =H	R ₁ =(CH ₃) ₃ Si	R ₁ =CF ₃ CO
$\frac{M-R_1OH}{M}$	0.18	2.50	0.25	0.63	6.25	0.42
$\frac{M-(R_1OH+CH_3)}{M}$	0.22	0.35	0.15	0.10	3.00	0.26

Table 3.

	11-ketoandrosterone derivatives			11-ketoetiocholanolone derivatives		
	$R_1 = H$	$R_1 = (CH_3)_3 Si$	$R_1 = CH_3 CO$	$R_1 = H$	$R_1 = (CH_3)_3 Si$	$R_1 = CF_3 CO$
$\frac{M-R_1 OH}{M}$	0.15	0.50	2.00	1.20	3.30	7.00
$\frac{M-(R_1 CH + CH_3)}{M}$	0.12	0.50	0.50	1.20	5.00	3.20

Table 4.

	11 β -OH-androsterone derivatives			11 β -OH-etiocholanolone derivatives		
	$R_1 = H$	$R_1 = (CH_3)_3 Si$	$R_1 = CF_3 CO$	$R_1 = H$	$R_1 = (CH_3)_3 Si$	$R_1 = CF_3 CO$
$\frac{M-R_1 OH}{M}$	0.60	1.10	3.50	0.72	5.00	1.54
$\frac{M-(R_1 OH + CH_3)}{M}$	0.74	0.50	0.50	0.89	3.20	1.00

free の形 ($R_1 = H$) については $M-R_1 OH/M$ の値はいずれも (I) < (II) であるが (V) と (VI) は 11 位に水酸基があるため両者の値は接近し、この値から (V) と (VI) の区別は困難である。

また $M-(R_1 OH + CH_3)/M$ の値は (III) > (IV), (V) < (VI), (VII) < (VIII) であった。

TMS 誘導体 ($R_1 = (CH_3)_3 Si$) については $M-R_1 OH/M$, $M-(R_1 OH + CH_3)/M$ の値は (I) < (II) でかなりの差が認められた。特に (I) は $M-(R_1 OH + CH_3)/M > 3.00$, (II) では $M-(R_1 OH + CH_3)/M < 0.50$ と著しい差が認められた。

この値は別に測定したマススペクトルからも同様な結果が得られどちらか一方のマススペクトルからだけでも、充分両者の区別ができる。

TFA 誘導体 ($R_1 = CF_3 CO$) の混合物は XE-60 のカラムでは分離不十分のため、誘導体個々について加

熱試料導入系より測定した。

(III), (IV), (V) および (VI) のマススペクトルはいずれも $M-18$ などのイオンが認められることから 17 位の keto 型, enol 型の混合スペクトルであろうと推定した, $M-R_1 OH/M$, $M-(R_1 OH + CH_3)/M$ の値は (I) と (II) ではかなりの差が認められた。

GC-MS による分析のための 17KS の揮発性誘導体としては、無水トリフルオロ酢酸による 17KS の TFA 化は上述のように enol 化が推定されたのであまり好ましくない。

TMS 誘導体は GLC で良好な分離像 (Fig. 7) を示し、またマススペクトルにおいては 5 α -androstane 型 (I) と 5 β -androstane 型 (II) の差が著しく、17KS の GC-MS による分析のための誘導体としてすぐれたものである。

Fig. 7. Chromatogram of trimethylsilyl ether derivatives of 17-ketosteroids.

Column: 2% XE-60 4mm $\times$ 2 mTemp. 215 $^{\circ}C$

1. androsterone-TMS, 2. etiocholanolone-TMS
3. 11-ketoandrosterone-TMS, 4. 11-ketoetiocholanolone-TMS,
5. 11-hydroxyandrosterone-TMS, 6. 11-hydroxyetiocholanolone-TMS.

実験の部

装置は日立 RMU-6E 型単収束質量分析計を用いた。GC-MS は日立 K-53 型ガスクロマトグラフを Watson-Biemann 型キャリヤーガスセパレーターにより直結した。TFA 誘導体は GC-MS および各々の誘導体を個々に加熱試料導入系により測定した。主な測定条件は次のとおりである。

イオン加速電圧	1800V
イオン化電圧	70eV
全放射電流	80 μ A
イオン化室温度	235°C

GC-MS

カラム 2% XE-60 内径 4 mm, 長さ 2 m, ガラス製。

カラム温度 215°C, キャリヤーガス He 2.0 kg/cm²

キャリヤーガスセパレーター温度 220°C

TMS 化

試料約 3mg に N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide 40 μ l を加え 80°C で約 15 分間ときどき振盪したのち、マイクロシリンジで 3 μ l を採り GC-MS に注入した。

TFA 化

試料約 3mg を無水トリフルオロ酢酸 50 μ l を加えたものを GC-MS の試料とした。

また加熱試料導入法の試料は 17KS の個々を同様の方法により TFA 化した。

17KS はいずれも sigma 社 (U. S. A.) の標準品を用いた。

文 献

- 1) W. J. A. Vanden Heuel, E. C. Horning: *Biochim. Biophys. Acta.*, **64**, 416 (1962).
- 2) W. J. A. Vanden Heuel, W. C. Gardiner, E. C. Horning, *J. Chromatog.* **19**, 263 (1967).
- 3) J. Karlinar, H. Budzikiewicz, C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **31**, 710 (1966).
- 4) M. Fisher, C. Djerassi, *Chem. Ber.* **99**, 750 (1966).
- 5) L. Tökés, R. T. LaLonde, C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **32**, 1012 (1967).
- 6) H. Egger, G. Spiteller, *Mh. Chem.*, **97**, 579 (1966).