

28T-am07

プロトン親和性ボロン酸を用いたビシナルジオールステロイドの高感度 LC/ESI-MS/MS

○川崎 勝己¹, 松本 奈宜砂¹, 小川 祥二郎¹, 東 達也¹(¹東京理大薬)

【目的】臨床診断や薬物治療におけるマーカーステロイドの中には、ビシナルジオールを有するものも多い。例えば、尿中pregnanetriol (PT) は先天性副腎過形成症の診断や治療において、また血中4 β -hydroxycholesterol (4 β -HCh) はCYP3A4が関わる薬物相互作用において、そのレベル変動は有用な情報となる。本研究では、このようなビシナルジオールを有するステロイドに対し、高感度・高選択性をもたらす新規LC/ESI-MS/MS用誘導体化法の開発を試みた。

【実験・結果】誘導体化試薬には、ESI活性原子団 (ジメチルアミノ基) とビシナルジオールに対する反応活性基 (ジヒドロキシボリル基) を合わせ有する (3-dimethylamino-phenyl)dihydroxyborane (DAPB) を選択し、その10 μ gをピリジン中でステロイド (PT, 4 β -HCh及び20R,22R-dihydroxycholesterol) と反応させた (50°C, 1 h)。得られたボロネートは正イオン検出ESI-MSに高い応答性を示すとともに、MS/MSにおいてDAPB由来の特徴的なフラグメントイオンを与え、検出限界 (0.45–1.4 fmol, S/N = 5) は誘導体化前に比べ20–160倍向上した (装置: Applied Biosystems API 2000)。また、本研究ではギ酸アンモニウム含有MeCN-H₂O混液を移動相に用いたが、MeCN含有率が95%以上では各ボロネートの加水分解は認められなかった。次に、健常人尿 (200 μ L) を除蛋白及び固相抽出後 (PTの回収率: 93.4 \pm 2.8%, n = 5), DAPB誘導体化に付したところ、極めて大きいS/N比でPT由来のピークが観察された。なお、誘導体化なしではPTのピークはノイズレベルであった。また、²H₆-DAPBを用いて日内再現性 (RSD) を評価したところ、5.4%と良好な結果を得た。さらに健常人血漿 (10 μ L) を除蛋白後、液-液抽出し (4 β -HChの回収率: 76.0 \pm 4.6%, n = 5), DAPB誘導体に導くと、誘導体化なしでは検出できなかった4 β -HChが高感度かつ再現性よく (RSD: 6.7%, n = 5) 分析可能であった。