

Title	分離難易度の高い尿中ステロイド代謝物のLC-MS/MS分析
Sub Title	
Author	中川, 央充(Nakagawa, Terumichi)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)による尿中ステロイド代謝物の一斉分析は、様々な疾患の精査に利用されている。一方で、GC-MS測定 of 迅速性には限界があり、1)難揮発性ステロイドの前処理に2日要すること、2) GC-MS分析時間に80分/件かかることが理由である。本研究は、誘導体化を行わない液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) で測定する系を構築し、これまでGCでのみ分離が可能であった項目の分離を成功させた。
Notes	研究種目：奨励研究 研究期間：2023～2023 課題番号：23H05346 研究分野：質量分析
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23H05346seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 9 月 8 日現在

機関番号： 3 2 6 1 2
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2023 ~ 2023
課題番号： 2 3 H 0 5 3 4 6
研究課題名 分離難易度の高い尿中ステロイド代謝物のLC-MS/MS分析

研究代表者

中川 央充 (Nakagawa, Terumichi)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・臨床検査技師

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 480,000 円

研究成果の概要：ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による尿中ステロイド代謝物の一斉分析は、様々な疾患の精査に利用されている。一方で、GC-MS測定迅速性には限界があり、1) 難揮発性ステロイドの前処理に2日要すること、2) GC-MS分析時間に80分/件かかることが理由である。本研究は、誘導体化を行わない液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) で測定する系を構築し、これまでGCでのみ分離が可能であった項目の分離を成功させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から尿中ステロイド代謝物の一斉分析に最適なカラムをPhenyl hexylカラムであると結論づけた。このカラムは、環状構造をもつ化合物の分離に優れた π - π 結合を原理とするカラムであり、分離に有利であると予測した結果と合致する。加えて、溶離液として、0.2mM Ammonium fluoride, 0.2mM Ammonium fluoride Methanolの組み合わせが感度、分離にとって最適であった。これまで、これらのステロイドをLC-MS/MSで効率よく分離し、それぞれのカラムとステロイドの分離の関係についての情報は多くないため、重要な情報であると考えられる。

研究分野： 質量分析

キーワード： LC-MS/MS 尿中ステロイド代謝物

1. 研究の目的

申請者が所属する慶應義塾大学医学部では日本で唯一尿中ステロイド代謝物をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) により一斉分析しており、全国から多くの検体を受託している。本検査は網羅的なステロイド動態情報を提供できるため、様々な疾患の精査に利用されている。なかでも、新生児マススクリーニング 17α -hydroxyprogesterone (17-OHP) 高値や外陰部異常などを呈し、21 水酸化酵素欠損症等の先天性副腎過形成の鑑別を必要とされる新生児・乳児症例の精査を依頼されることが多く、全体の半数以上を占める。これら疾患は診断治療に緊急性を求められるため、至急報告を要望されることが多いが、現行の GC-MS 測定では迅速性に限界がある。理由は、1) GC-MS の原理上、難揮発性ステロイドを気化可能な分子への変換前処理が必要であり、この操作に 2 日要すること、2) GC-MS 分析時間に 80 分/件かかることである。

これに対し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 測定では必ずしも誘導体化を実施する必要はなく、一般的なプロトコルでは 1 件あたりの分析時間は約 30 分以下である。LC の理論段数は GC のそれに比べると小さいため、一部分離困難なステロイドの存在が予見されるものの、至急分析には適している。当検査室で長年かけて特定してきた各種ステロイド産生異常症の診断指標ステロイドを LC-MS/MS で測定する系の構築ができれば、結果の迅速返却による臨床への貢献が可能となる。

本研究の目的は、ステロイドのような環状構造をもつ化合物の分離に優れた π - π 結合を原理とするカラムと、所有する LC-MS/MS を組み合わせることで、臨床的有用性の高い項目の分離・検出を実現し、診療貢献することにある。

2. 研究成果

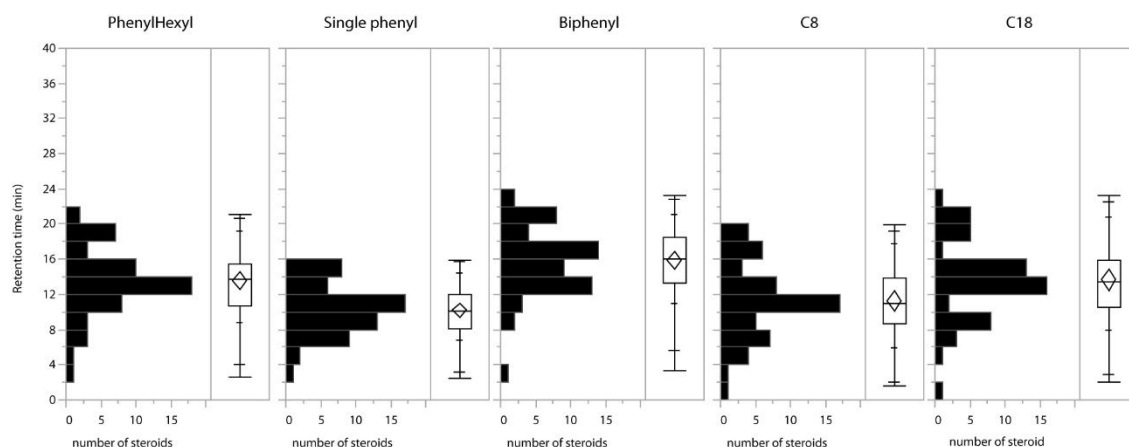
方法として、当院で保有するステロイド標準品 56 種類と、安定同位体置換ステロイド標準品 16 種類を使用した。また、水は、Puric- α (Organo Corp, Tokyo, Japan) を用いて都度採水した。LC-MS/MS 前処理ならびに分析には、Methanol (Kanto chemical, Tokyo, Japan) と、Ammonium fluoride (Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany), Acetonitrile (Fujifilm Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) を利用した。

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置には、LCMS8060NX (Shimadzu, Kyoto, Japan) を利用した。また、カラムとして次に示す 6 本を用意した。Aquity UPLC BEH phenyl $1.7\mu\text{m} \times 2.1 \times 150\text{mm}$ (Waters, MA, US) (hereinafter referred to as Phenyl hexyl), Shim-pack GIST Phenyl $2\mu\text{m} \times 2.1 \times 150\text{mm}$ (Shimadzu, Kyoto, Japan) (hereinafter referred to as Single phenyl), Kinetex C8 $2.6\mu\text{m} \times 2.1 \times 150\text{mm}$ (Phenomenex, CA, US) (hereinafter referred to as C8), Aquity UPLC BEH C18 $1.7\mu\text{m} \times 2.1 \times 150\text{mm}$ (Waters, MA, US) (hereinafter referred to as C18), Kinetex $1.7\mu\text{m}$ Biphenyl $2.1 \times 150\text{mm}$ (Phenomenex, CA, US) (hereinafter referred to as Biphenyl), Shim-pack Velox Biphenyl $1.8\mu\text{m} \times 2.1 \times 150\text{mm}$ (Shimadzu, Kyoto, Japan) (hereinafter referred to as Shimadzu-biphenyl) を利用した。なお、サンプルバイアルには、High-purity polypropylene (PP) vials (1030-14101, GL science, Tokyo, Japan), TORAST-H Glass Vial (370-04301-02, Shimadzu GLC, Tokyo, Japan), TORAST Glass Vial (GLCTV-802, Shimadzu GLC, Tokyo, Japan), LCMS Certified Clear Glass $12 \times 32\text{ mm}$ Screw Neck Total Recovery Vial (600000671CV, Waters, MA, US), TruView LCMS Certified Clear Glass $12 \times 32\text{ mm}$ Screw Neck Max Recovery Vial (186005662CV, Waters, MA, US) を使用した。LC-MS/MS のソフトウェアには Labsolutions (5.99 SP2), Labsolutions Connect MRM (ver2.11) を利用した。

LC-MS/MS でのイオン検出を可能にするため、保有するすべてのステロイド標準品 (安定同位体置換ステロイド標準品を含む) の MRM 情報を取得した。取得を行ったステロイドの総数は 72 種類 (ステロイド 56 種類・安定化同位体置換標識ステロイド 16 種類) であり、それぞれのステロイドからプリカーサーイオンとして、 $[M+H]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+NH_4]^+$ and $[M-H]^-$ の 5 つを探索した。このそれぞれのプリカーサーイオンから、シグナルの強度順にそれぞれ 5 個のプロダクトイオンを検出した。1 つのステロイドに対して最大 5 個のプリカーサーイオンと各最大 5 個のプロダクトイオンが得られるため、そのうち感度、特異度に優れたイオンを 2 つ選択した (1 つのステロイドでは $[5C1 \times 5P2]$ 通りの組み合わせ)。

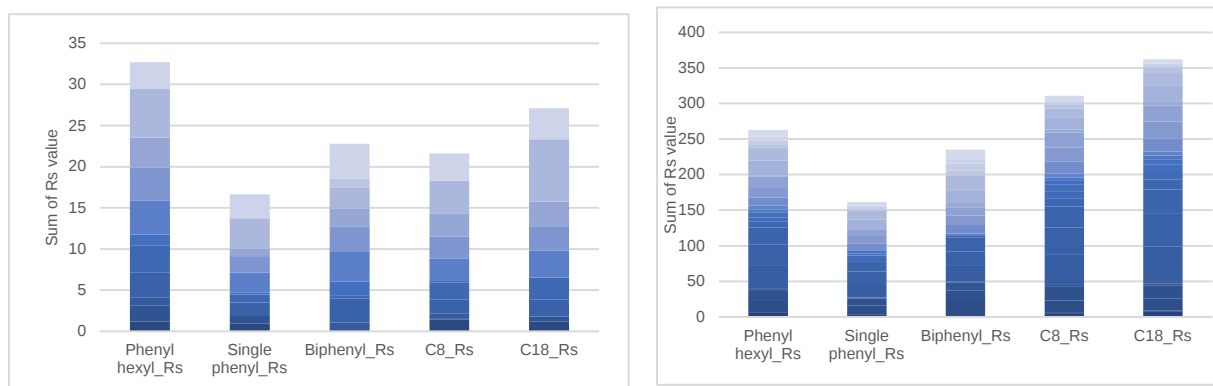
分離可能性のある 5 本のカラムで同一グラジエント条件にて、分析対象のステロイドそれぞれを分離し、RT、half width を調査した。性質の異なる 5 つのカラムを比較することで、いくつかの特徴を確認した。これらの情報を元に、各ステロイドの RT より、度数分布図を作成した (Fig.1)。

Fig.1 各カラムにおける測定対象ステロイド溶出時間の度数分布図



また、尿中ステロイド測定で重要となる立体異性体の分離度を確認するため、それぞれの立体異性体毎の Rs 値を算出し、それらの積算値をグラフにした (Fig.2)。また位置異性体についても同様に Rs 値を算出し、それらの積算値をグラフにした (Fig.3)。Rs 値は日本薬局方ならびに JIS HPLC 通則に従い、下記の式を用いて計算した。

$$Rs = 1.18 \times \frac{|RT_1 - RT_2|}{half\ width_1 + half\ width_2}$$



左 : Fig.2 立体異性体グループ毎の Rs 値の積算値のカラム毎積み上げ棒グラフ

右 : Fig.3 位置異性体グループ毎の Rs 値の積算値のカラム毎積み上げ棒グラフ

これらの結果から、Single Phenyl カラムの保持は全ステロイドで弱く (Fig.1) 立体異性体の分離には、Phenyl hexyl が最も有利であった (Fig.2)。加えて、位置異性体の分離には C18 カラムが最も有利であった (Fig.3)。尿中のステロイドでは、立体異性体の違いは、疾患の鑑別に重要な情報をもたらす場合があり、立体異性体の分離を優先すべきであると判断した。このことから、今回の研究成果から尿中ステロイド代謝物の一斉分析に最適なカラムを Phenyl hexyl カラムであると結論づけた。このカラムは、環状構造をもつ化合物の分離に優れた $\pi - \pi$ 結合を原理とするカラムであり、分離に有利であると予測した結果と合致する。加えて、溶離液として、0.2mM Ammonium fluoride, 0.2mM Ammonium fluoride Methanol の組み合わせが感度、分離にとって最適であった。これまで GC でのみ分離が可能であった保険適用項目 (17-KS 分画) の分離を成功させたことは、誘導体化の不要な LC-MS/MS での測定を可能とさせ、報告日数を大幅に低下させることを可能とした。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------