

博士学位論文

液体クロマトグラフィータンデム質量分析による脳卒中易発性高血圧ラットの
血中エルゴステロールの定量と ISO 11843-7 に基づく精度評価

**Determination of blood ergosterol in stroke-prone spontaneously hypertensive rat
by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and precision assessment
based on ISO 11843-7.**

東京薬科大学
2023 年度

町田 晃一

目次

序論	1
第 1 章 Ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の合成	6
1-1 緒言	6
1-2 実験材料・方法	8
1-3 Ergosterol- d_1 の合成	9
1-3-1 Ergosterol- d_1 の合成経路	9
1-3-2 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン保護エルゴステロール の合成	10
1-3-3 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン保護エルゴステロンの 合成	11
1-3-4 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン保護 ergosterol- d_1 の合 成	12
1-3-5 Ergosterol- d_1 の合成	13
1-3-6 結果と考察	14
1-4 Brassicasterol- d_1 の合成	17
1-4-1 Brassicasterol- d_1 の合成経路	17
1-4-2 ブラジカステロンの合成	18
1-4-3 Brassicasterol- d_1 の合成	19
1-5 小括	20
第 2 章 SHRSP における重水素標識エルゴステロールの血中動態の解析	21
2-1 緒言	21
2-2 実験材料・方法	22
2-2-2 UHPLC-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の定量	22
2-2-3 SHRSP への ergosterol- d_1 の経口投与及び採血	23
2-2-4 血清試料の前処理	24
2-2-4-1 検量線及び添加回収試験のためのケン化処理	24
2-2-4-2 SHRSP 血清試料のケン化処理	24
2-2-4-3 ステロール脂質の抽出	24
2-2-4-4 誘導体化反応及び後処理	25
2-2-4-5 薬物動態パラメータの算出	27
2-3 結果と考察	28
2-3-1 UHPLC-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の高感度	

定量.....	28
2-3-2 検量線及び添加回収試験.....	32
2-3-3 Ergosterol- <i>d</i> ₁ 経口投与後の ergosterol- <i>d</i> ₁ 及び brassicasterol- <i>d</i> ₁ の血 中動態.....	37
2-4 小括.....	44
第3章 ISO 11843-7 の活用による超高速液体クロマトグラフィー-タンデ ム質量分析の精度評価の省力化.....	45
3-1 緒言.....	45
3-2 実験材料・方法.....	47
3-2-1 ピコリン酸エステル化エルゴステロールの UHPLC-MS/MS.....	47
3-2-2 エルゴステロールの UHPLC-UV.....	47
3-2-3 ソフトウェア.....	48
3-3 ISO 11843-7 に基づく精度評価の概要.....	49
3-4 結果と考察.....	50
3-4-1 MRM クロマトグラムのピーク面積の RSD の算出.....	50
3-4-2 <i>S</i> _B の算出における必要最小限のデータポイント数 (<i>n</i>) の検討.....	54
3-4-3 精度評価におけるサンプリング速度の検討.....	58
3-4-4 UHPLC-UV の精度評価におけるノイズフィルタ処理の影響.....	62
3-4-5 UHPLC-MS/MS の精度評価における移動平均の影響.....	65
3-4-6 UHPLC-MS/MS の精度評価におけるクロマトグラムの積算処理の 影響.....	74
3-5 小括.....	79
総括.....	80
謝辞.....	82
引用文献.....	83
研究結果の掲載誌.....	87

略語表

ABCG5	ATP binding cassette transporter G5
ABCG8	ATP binding cassette transporter G8
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
AUC	area under the curve
C_{\max}	maximum observed concentration
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene
ESI	electrospray ionization
FUMI	function of mutual information
GC	gas chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
IS	internal standard
LC	liquid chromatography
LMSD	LIPID MAPS structure database
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry
MS/MS	mass spectrometry/mass spectrometry
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
NMR	nuclear magnetic resonance
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like intracellular cholesterol transporter 1
ODS	octadecyl silyl
PCC	pyridinium chlorochromate
PE	picolinyl ester
PK	pharmacokinetics
PTAD	4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione
PTFE	polytetrafluoroethylene
RSD	relative standard deviation
<i>S/N</i>	signal-to-noise ratio
SD	standard deviation
SHRSP	stroke-prone spontaneously hypertensive rat
$t_{1/2}$	terminal half life
t_{\max}	maximum observed time
TMS	tetramethyl silane

TSIM

N-(trimethylsilyl)-imidazole

UHPLC

ultra-high performance liquid chromatography

UV

ultraviolet

序論

脂質は、水に溶けない生体物質を総称し、エネルギー源や生体膜の構成成分、生理活性物質として機能する^{1,2)}。脂質の特徴の一つは、その構造の多様性であり、現在までに発見された化合物の情報から10万化合物以上存在すると推測されている^{3,4)}。実際、世界最大規模の脂質のデータベースの一つであるLIPID MAPSには2023年3月時点で約4万7千以上の化合物が登録されている^{5,6)}。LIPID MAPSの中で構造に基づく分類を行うLIPID MAPS structure database (LMSD)は、脂質を8つのカテゴリーに分類し、更に、メインクラス、サブクラス、各化合物の順に詳細に分類している。脂質はカテゴリーやクラスごとに高極性のものから低極性のものまで存在し、物理化学的な特性は多種多様である。一方、同一クラス内の化合物同士の構造の類似性は非常に高く、また、生体内での化合物毎の存在量が大きく異なるため、定量分析法の開発は分析化学的にチャレンジングである⁷⁾。

ステロール脂質は、LMSDの8つの脂質カテゴリーの1つであり、現在までに約3600種類の化合物が同定されている。ステロール脂質は5つのメインクラスに分類されており、ステロール(1601種)、ステロイド(362種)、セコステロイド(761種)、胆汁酸(811種)、ステロイド抱合体(233種)が確認されている。遊離型のステロールは、多くの生物の生体膜の主要な構成成分として利用されており、生物の違いによって主に利用するステロールが異なる(Figure 1)。動物細胞では、コレステロールが主に利用される。植物細胞では β -シトステロールに加え、カンペステロール、スティグマステロール、ブラジカステロールなどの複数の化合物が利用されており、これらは植物ステロールと総称される⁸⁾。菌類の細胞では、エルゴステロールが主に利用されている⁹⁾。各ステロールは、基本骨格として3つの六員環と1つの五員環からなるA~D環を有し、A環にヒドロキシ基が結合しており、側鎖の構造、側鎖を構成する炭素の数、環又は側鎖の不飽和結合の位置などが異なる。各ステロールは、細胞膜中ではヒドロキシ基を細胞外、又は細胞質側に向けるように配向して脂質二重層を形成しており、細胞膜の構造と機能の維持に非常に重要である。

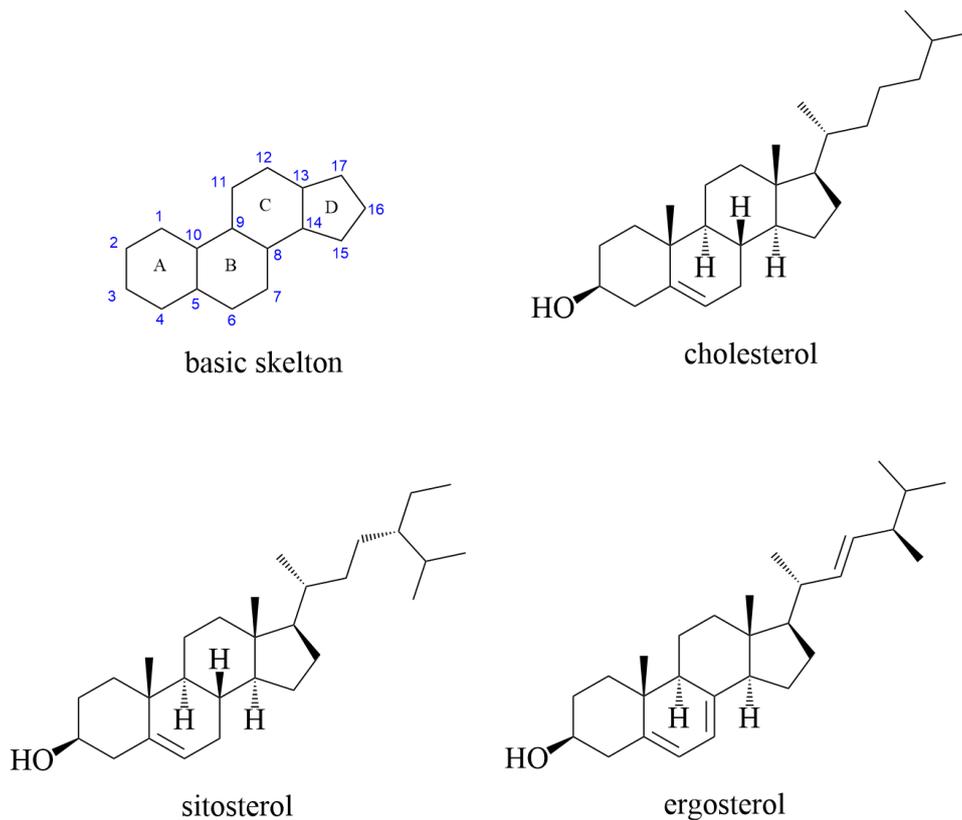


Figure 1 Basic skeleton of sterol lipid and typical sterol structure.

ステロールが関与する難治性疾患の一つにシトステロール血症がある。シトステロール血症は、常染色体劣性遺伝形式の遺伝性脂質代謝異常であり、ABC (ATP binding cassette) トランスポーターのサブファミリーの ABCG5 又は ABCG8 の遺伝子変異が原因であることが報告されている^{10, 11)}。近年の遺伝学的研究から、国内には 600 名程度のシトステロール血症患者が存在していると考えられている¹⁰⁾。

コレステロール及び植物ステロールの吸収経路の概略図を Figure 2 に示す。ヒトでは、食事から摂取したステロールは、小腸のステロール輸送タンパク質の Niemann-Pick C1-like intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1L1) によって小腸上皮細胞内に取り込まれる。小胞体に輸送されたコレステロールは acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-2 によってエステル化され、カイロミクロンにパッケージされてリンパ管へと吸収される。一方、一旦細胞内に取り込まれた植物ステロールは、細胞膜の ABCG5/8 を介して腸管内腔へと戻される。シトステロール血症患者では、遺伝子変異に基づく ABCG5/8 の発現や機能の低下によって、植物ステロールがコレステロールと同様の吸収経路をとり、血中の植物

ステロール濃度が顕著に増加する。その結果、 β -シトステロールなどの植物ステロールが、組織に沈着或いは蓄積し、皮膚・腱黄色腫や早発性の冠動脈疾患を引き起こす。シトステロール血症のモデル動物には、ABCG5 又は G8 のノックアウトマウス^{12, 13)}と脳卒中易発性高血圧ラット (SHRSP)¹⁴⁾が知られている。SHRSP は、ゲノム解析によって ABCG5 及び ABCG8 の遺伝子変異が確認されており¹⁵⁾、高植物ステロール食を負荷すると血中濃度が上昇する。これらのモデル動物は、現在、食事制限やエゼチミブ、コレステリドなどの薬物による対症療法しか存在しないシトステロール血症に対して、その病態解析や治療法開発を研究する際にとっても重要な役割を果たしている。

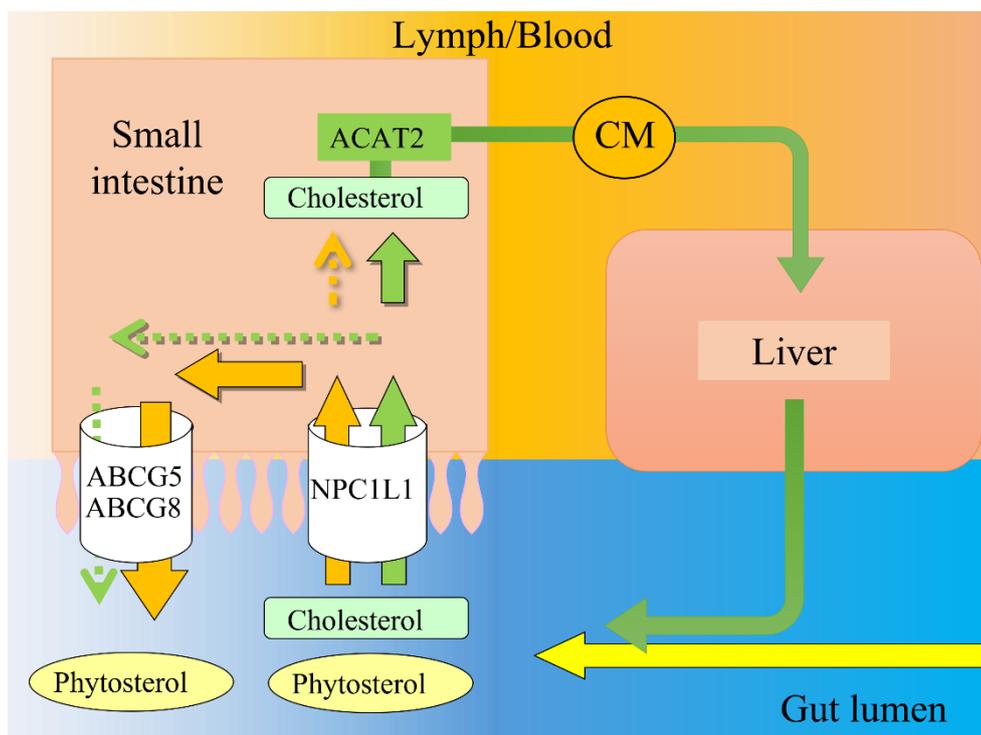


Figure 2 Difference between cholesterol and phytosterol in terms of intestinal absorption and biliary secretion. ABCG5/8, A complex of ATP binding cassette co-transporters G5 and G8; ACAT2, acetylcoenzyme-A cholesterol acyl transferase 2; CM, chylomicron; NPC1L1, Niemann Pick C1-like 1 protein.

大坪らは、シトステロール血症のモデル動物におけるエルゴステロール代謝を解析する目的で、SHRSP に高エルゴステロール食を 2 週間負荷し、高エルゴステロール血症の誘導を試みた。しかし、エルゴステロール自身の血中濃度は上昇

せず、7位と8位の炭素-炭素間の二重結合が還元されたブラジカステロールの血中濃度が上昇した²⁰⁾。この結果は、食餌由来のエルゴステロールがブラジカステロールに変換された可能性に加え、食餌中のブラジカステロールの吸収の上昇、腸内細菌叢への影響など、複数の可能性を示唆したが、詳細な議論に必要な実験結果は得られていない。これらの結果が明らかになれば、エルゴステロールの代謝物について現在よりも詳細に議論し、疾患の理解に繋がると考えられる。そこで本研究では、シトステロール血症モデル動物におけるステロール代謝解析の一環として、SHRSPにおけるエルゴステロールの血中動態とその代謝物がブラジカステロールであることを定量的に評価可能とする高感度定量分析法の開発に取り組むことにした。

エルゴステロールとその代謝物の血中動態に関する研究は、方法論の力不足のために多くはなく、近年の主要な研究は次の3つに限定される。まず、1992年に津川らは、トリチウム標識エルゴステロールを単回経口投与したWistarラットの血漿中に放射活性を持つ代謝物が出現し、その化合物の分子量はエルゴステロールよりも2小さいことを示した¹⁶⁾。次に、2011年にZhaoらは、Sprague Dawleyラットに非標識エルゴステロールを単回経口投与し、大気圧化学イオン化(APCI)MSをLCに接続したLC-MSによる定量を行い、血中濃度-時間曲線及び尿・糞中濃度について報告した¹⁷⁾。また、2016年にZhangらは、エルゴステロールを含むナノ粒子をSprague Dawleyラットに単回経口投与し、HPLC-UVによって定量し、血中濃度-時間曲線を報告した¹⁸⁾。一方、本研究で注目しているシトステロール血症のモデル動物におけるエルゴステロールの血中動態に関する報告はこれまで存在しない。ステロール脂質の定量分析のゴールドスタンダードはガスクロマトグラフィー(GC)であり、分析法としてはほぼ完成されている。一方、移動相、カラム、検出器の多彩な組み合わせが可能な液体クロマトグラフィー(LC)は、MSを組み合わせることによってGCと比較して幅広い極性の化合物(例えばステロールエステルや抱合体などの代謝物)を一度の分析で同定することが可能であり、その潜在的なポテンシャルの高さから脂質分析法として注目されている。本研究では、汎用される超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)と高感度で特異的な分析が可能なタンデム質量分析(MS/MS)を利用して、新たに分析法を開発した。

MS/MSは、汎用されるUV検出とは対照的に、製造会社毎に独自の複雑な構造を有するため、最適化すべき測定条件のパラメータが多く、最適化には多くのリソースを要する。研究の過程で、UHPLC-MS/MSによるメソッド構築の効率化の必要性を実感したことから、精度評価に注目して省力化にも取り組んだ。一般に測定精度は、同一サンプルについて繰り返し測定を行い、統計学的に求めた相対標準偏差(RSD)などを指標として評価される。近年、1回のクロマトグラム

測定によって得られたクロマトグラムのベースラインノイズを確率論的に取り扱ひ、精度評価へ応用可能な Function of Mutual Information (FUMI) 理論が注目されている。FUMI 理論に基づく機器の精度評価は ISO 11843-7 に採用されており、ISO 11843-7 が UHPLC-MS/MS の精度評価に適用できれば、最適化に要するリソースの削減と省力化が期待できる。そこで、ISO 11843-7 による精度評価の UHPLC-MS/MS への適用の可否について、実験的に明らかにすることにした。

以上から、本研究では SHRSP におけるエルゴステロールの血中動態を追跡可能な定量分析法の開発と応用を行い、更に UHPLC-MS/MS の精度評価の効率化を目的として以下の 3 章の内容を取り扱った。

第 1 章では、エルゴステロール及びブラジカステロールの重水素標識体を合成した。

第 2 章では、SHRSP の血中エルゴステロール及びブラジカステロールを定量可能な UHPLC-MS/MS による高感度定量法を開発した。更に、SHRSP に重水素標識エルゴステロールの単回投与を行い、血中濃度推移を求めた。

第 3 章では、確率論 (ISO 11843-7) に基づく UHPLC-MS/MS の精度評価を行った。さらに、ISO 11843-7 において表記されていないデジタル処理やサンプリング速度などを検討し、これらが UHPLC-MS/MS の精度評価に及ぼす影響を明らかにした。

第 1 章 Ergosterol-*d*₁ 及び brassicasterol-*d*₁ の合成

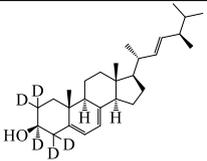
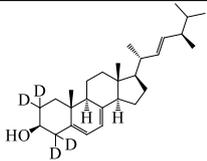
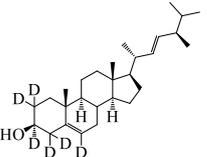
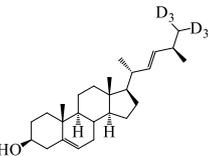
1-1 緒言

医薬品や食品成分の *in vivo* での代謝等を定量的に明らかにしたい場合、生体内に存在する内因性化合物と投与化合物とを区別することが望ましい。一般に、それらを区別するには、同位体標識した化合物を調製し、質量分析又は放射活性測定による定量を行う¹⁹⁾。質量分析では、化合物の構成原子を ²H (重水素), ¹³C, ¹⁵N などの安定同位体で置換した化合物を利用することが多い。

本研究では、過去の研究²⁰⁾と予備的検討の結果から、エルゴステロールの代謝物はブラジカステロールであるという仮説を立てた。この仮説に基づき、エルゴステロールの安定同位体標識体に加え、ブラジカステロールの安定同位体標識体も用意することにした。まず、購入可能なエルゴステロールの安定同位体標識体とブラジカステロールの安定同位体標識体の利用の可否について検討した。Table 1 に市販されている両ステロールの重水素標識体の構造式を示す。重水素の数と位置に着目し、エルゴステロールの 7 位の二重結合が還元された構造を、対応する代謝物のブラジカステロールと想定した。両者を比較すると、代謝の前 (エルゴステロール) と後 (ブラジカステロール) で構造中の同一箇所を標識したものはないことが分かった。したがって市販の重水素標識体は、SHRSP に投与後の血中濃度推移を追跡する実験には利用できないと考えた。

エルゴステロールの安定同位体標識体を SHRSP へ投与することを考慮すると、少なくとも 1 g の標識体が必要であった。一方、市販品の販売単位はミリグラムスケールであり、必要量を手入手するには相応のコストを要する。そこで、文献を精査し、エルゴステロールの安定同位体合成法を比較検討した。その結果、非標

Table 1 Comparison of commercially available deuterium-labelled ergosterol and its corresponding reduced form of brassicasterol.

Ergosterol	 Ergosterol- <i>d</i> ₅ Toronto Research Chemicals Inc.	Not available	Not available	 Ergosterol- <i>d</i> ₄ Medical isotopes Inc.
Brassicasterol	Not available	 Brassicasterol- <i>d</i> ₆ Toronto Research Chemicals Inc.	 Brassicasterol- <i>d</i> ₆ Toronto Research Chemicals Inc.	Not available

識のエルゴステロールを出発物質とし,比較的簡便に必要な重水素標識体を合成可能な方法があることが分かった²¹⁾.本章では,この従来法に基づき,幾つかの改良点を加え,重水素標識エルゴステロール(ergosterol- d_1)の調製を試みた.更に,ergosterol- d_1 の重水素標識の位置に対応する重水素標識ブラジカステロールの調製にも取り組み,非標識のブラジカステロールを出発物質とする brassicasterol- d_1 についても試みた.本章で合成を検討した安定同位体標識化合物の構造を Figure 3 に示す.

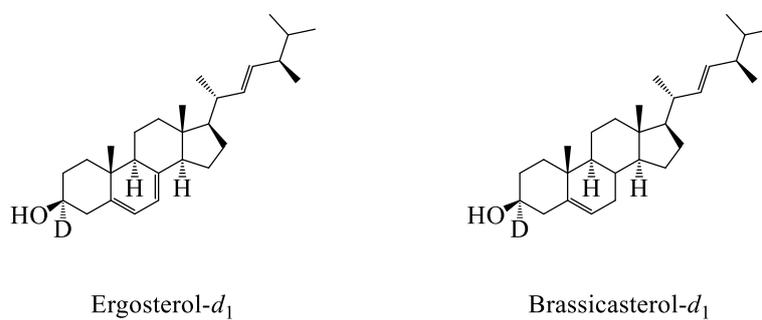


Figure 3 Structure of target compounds.

1-2 実験材料・方法

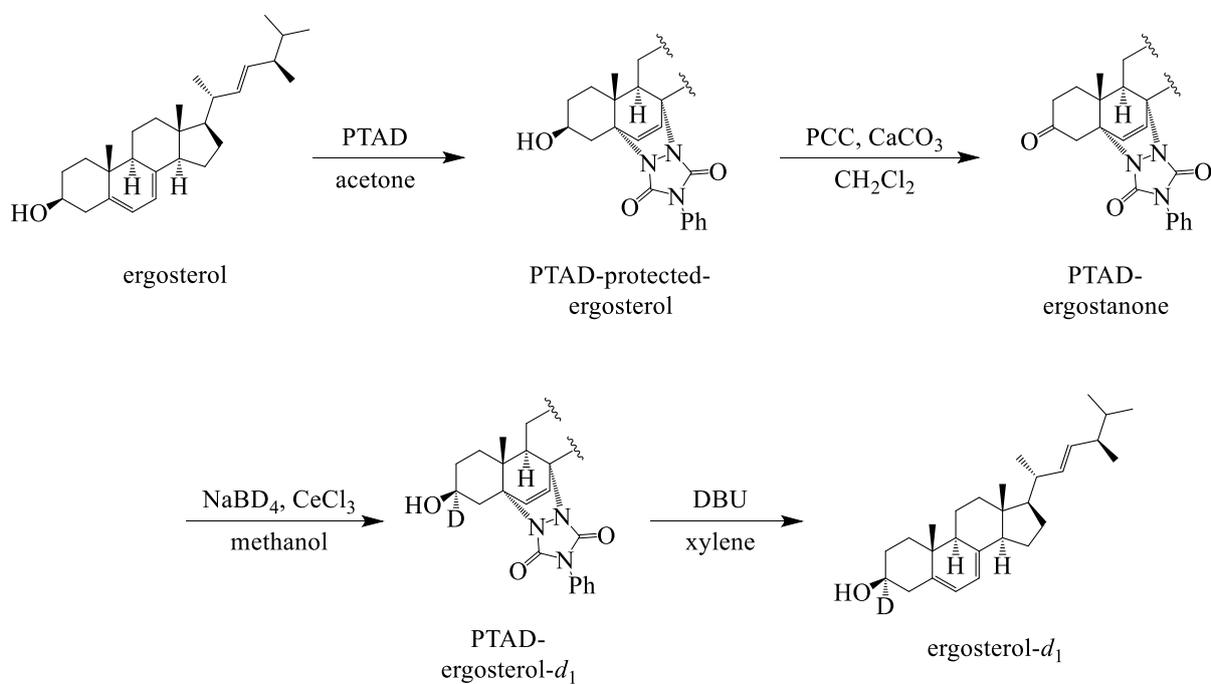
本章では以下の試薬を用いた。エルゴステロール (>95.0%), 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (PTAD, >97%), 重水素化ホウ素ナトリウム (>90%) は Sigma Aldrich 社製, クロクロム酸ピリジニウム (PCC, >98.0%) は東京化成工業株式会社製, フロリジル (粒径 60-100 メッシュ), モレキュラーシーブ 4A はナカライテスク社製, ジクロロメタン (>99.5%), セライトは関東化学株式会社製, 炭酸カルシウム (>99.5%), 硫酸マグネシウム (>98.0%), 硫酸ナトリウム (>99.0%), 塩化ナトリウム (>99.5%), アセトン (>99.5%), 酢酸エチル (>99.5%), ジエチルエーテル (>99.5%) メタノール (>99.8%), ヘキサン (>96.0%), クロロホルム (>99.0%), キシレン (>80%), 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン (DBU, >98.0%) は富士フイルム和光純薬社製を用いた。塩化セリウム (III) 七水和物 (>99.0%) はキシダ化学社製を用いた。ブラジカステロール (>98.3%) はタマ生化学製を用いた。重クロロホルム (重水素化率 99.8%, TMS 0.03 vol% 添加) は Acros Organics 社製を用いた。

核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$, 400 MHz) は Bruker 社製の AvanceTM III HD NanoBay 核磁気共鳴装置を用いて測定した。内部基準は重クロロホルムに含まれるクロロホルム ($\delta = 7.26$ ppm) を用いた。核磁気共鳴スペクトル ($^{13}\text{C-NMR}$, 125 MHz) は, 日本電子株式会社製の JNM-ECZ600R/M1 FT NMR 核磁気共鳴装置を用いて測定した。高分解能質量分析 (HRMS) には ESI イオン源及び飛行時間型検出器を備えたアジレント・テクノロジー株式会社製の 6530 QTOF を用いた。

1-3 Ergosterol-*d*₁ の合成

1-3-1 Ergosterol-*d*₁ の合成経路

松森らの報告²¹⁾を参考に、合成法を改良して Scheme 1 の手順で合成を行うこととした。改良点は、3β位のヒドロキシ基の酸化をジョーンズ試薬から PCC へ変更した点と、PTAD の脱保護を 2 工程要から 1 工程に短縮した点である。変更点については、ミリグラムスケールの少量の合成によって検証した後、グラムスケールでの合成を行った。



Scheme 1 Synthesis of ergosterol-*d*₁.

1-3-2 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン保護エルゴステロールの合成

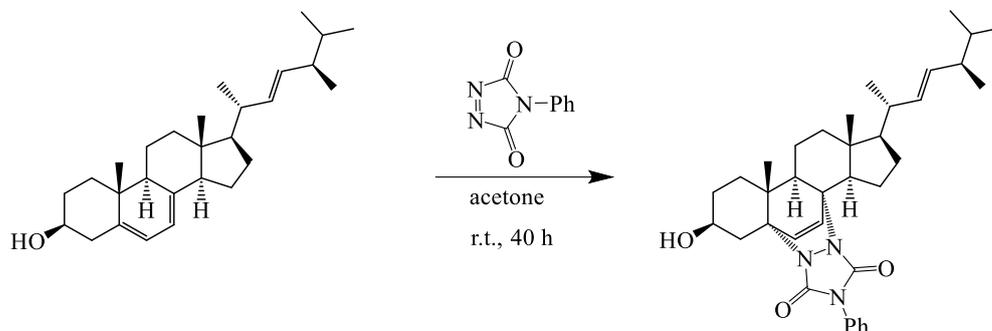


Figure 4 Conversion of ergosterol to PTAD-protected ergosterol.

エルゴステロールは、ステロールの B 環に 5,7-ジエン構造を持つため、重水素置換をする前に保護する必要がある。5,7-ジエンの保護には PTAD を用いた。エルゴステロールから PTAD-protected-ergosterol への合成手順を Figure 4 に示す。エルゴステロール (10.8 g, 27.2 mmol) をアセトン (456 mL) に溶解した。エルゴステロールの溶液にアセトン (273 mL) に溶解した PTAD 5.1 g を加え、室温で 40 h 攪拌した。反応混合物を水でクエンチし、酢酸エチルで 3 回抽出した。酢酸エチル層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過した。ろ液を減圧下に置き、抽出液から溶媒を除去した結果、黄色固体として PTAD 保護エルゴステロールの粗生成物 (16.15 g) を得た。粗生成物は未精製のまま次の工程に進めた。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (m, 4H, Ph), 7.29 (m, 1H, Ph), 6.38 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H6), 6.21 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H7), 5.19 (m, 2H, H22 and 23), 4.43 (m, 1H, H3), 3.15 (dd, 1H, $J = 13.8, 13.9$ Hz, H4e), 1.02 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, H21), 0.95 (s, 3H, H19), 0.89 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, H28), 0.81 (m, 6H, H26 and 27), 0.79 (s, 3H, H18).

1-3-3 4-フェニル-1,2,4-トリアズリン-3,5-ジオン保護エルゴステロンの合成

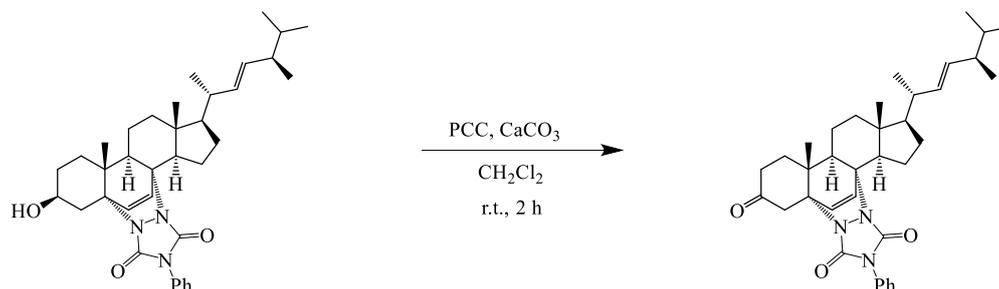


Figure 5 Conversion of PTAD-protected ergosterol to PTAD-ergostanone

3 α 位の水素を重水素へ置換するため、一度3 β 位のヒドロキシ基の酸化を行い、カルボニル基とした。松村らの報告で使用していたジョーンズ試薬によるヒドロキシ基の酸化は、試薬の調製、廃液の処理が煩雑である。今回はPCC酸化と反応後の残渣のフロリジルへの吸着を利用し、簡便に生成物を単離できた²²⁾。PTAD保護エルゴステロンの合成手順をFigure 5に示す。PTAD保護エルゴステロール (16.15 g, 28.34 mmol) はジクロロメタン (800 mL) に溶解した。その後、炭酸カルシウム (9.09 g)、モレキュラーシーブ 4A (11.7 g) を加えて攪拌した後、PCC 18.3 g を加え、室温で 2 h 攪拌し反応させた。反応後の溶液は上層にフロリジル、下層にシリカゲルを積層したカラムに移し PCC をフロリジル層へ吸着させた。その後、ジエチルエーテル 1500 mL とクロロホルム 2500 mL を通液し、減圧濃縮を行い PTAD 保護エルゴステロン (14.7 g, 25.1 mmol) を 91% の収率で得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (m, 4H, Ph), 7.28 (m, 1H, Ph), 6.57 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H6), 6.23 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H7), 5.20 (m, 2H, 22 and 23), 3.58 (d, 1H, J = 18.5 Hz, H4e), 2.78 (d, 1H, J = 18.5 Hz, H4a), 1.08 (s, 3H, H19), 1.01 (d, 3H, J = 6.6 Hz, H21), 0.90 (d, 3H, J = 6.8 Hz, H28), 0.88 (s, 3H, H18), 0.83 (m, 6H, H26 and 27)

1-3-4 4-フェニル-1,2,4-トリアズリン-3,5-ジオン保護 ergosterol-*d*₁ の合成

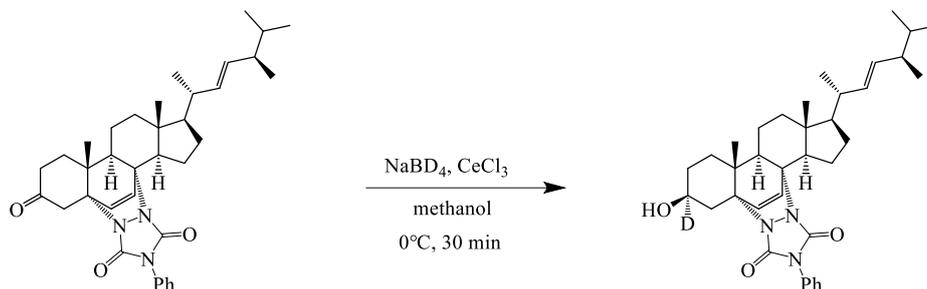


Figure 6 Conversion of PTAD-ergostanone to PTAD-ergosterol-*d*₁

PTAD 保護エルゴステロンから PTAD 保護 ergosterol-*d*₁ への合成手順を Figure 6 に示す. PTAD 保護エルゴステロン (14.7 g, 25.7 mmol) をメタノール (900 mL) に溶解し, 重水素化ホウ素ナトリウム (2.15 g) と塩化セリウム (III) 七水和物 (19.1 g) を加え, 0°C 下で 30 min 攪拌した. 反応混合物を水でクエンチし, クロロホルムで 3 回抽出した. クロロホルム層から減圧下で溶媒留去し, α 位及び β 位にヒドロキシ基を持つ PTAD 保護 ergosterol-*d*₁ を含む混合物が得られた. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し, β 位にヒドロキシ基を持つ PTAD 保護 ergosterol-*d*₁ (3.36 g, 5.71 mmol) を収率 23% で得た. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画は, 移動相に酢酸エチル (A) -ヘキサン (B) 混合液, B の組成が 60% のイソクラティック溶出とし, 検出波長 220 nm で行った.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38 (m, 4H, Ph), 7.27 (m, 1H, Ph), 6.38 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H6), 6.22 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H7), 5.19 (m, 2H, H22 and 23), 3.15 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, H4e), 1.02 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, H21), 0.96 (s, 3H, H19), 0.88 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, H28), 0.80 (m, 6H, H26 and 27), 0.79 (s, 3H, H18)

1-3-5 Ergosterol-*d*₁ の合成

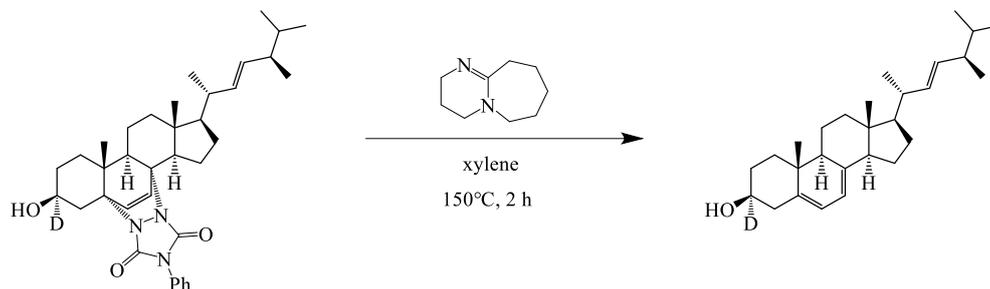


Figure 7 Conversion of PTAD-ergosterol-*d*₁ to ergosterol-*d*₁

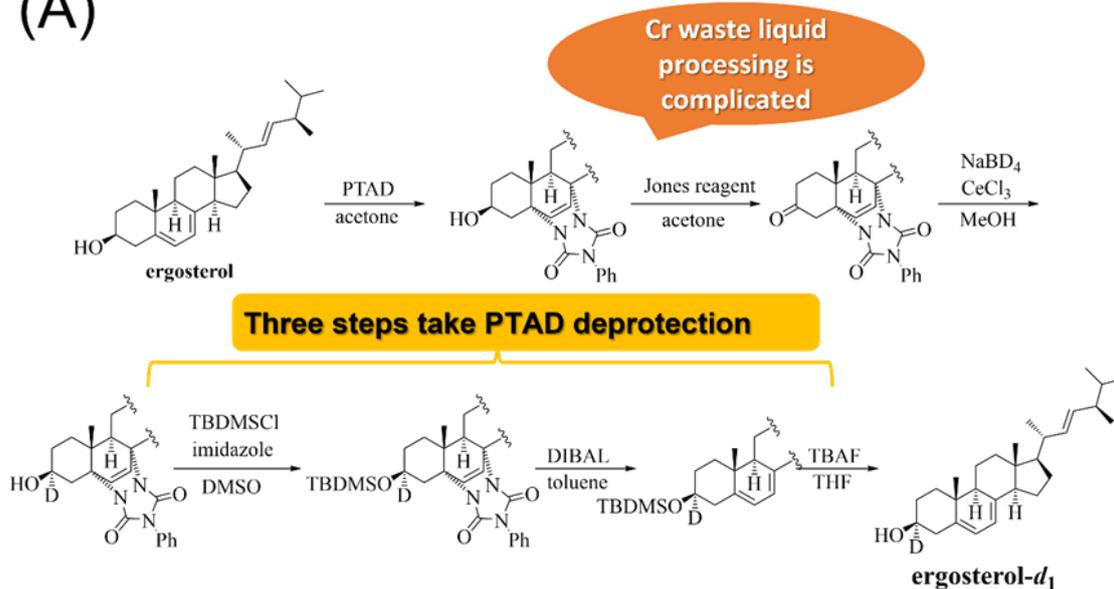
PTAD 保護 ergosterol-*d*₁ から ergosterol-*d*₁ への合成手順を Figure 7 に示す. PTAD 保護 ergosterol-*d*₁ (3.36 g, 4.16 mmol) をキシレン (100 mL) に溶解し, DBU 3.10 g を加え, 150°C で 2 時間攪拌した. 反応後の混液を減圧下で蒸発させ, ergosterol-*d*₁ を含む混合物を得た. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した後, ヘキサンで再結晶を行い, ergosterol-*d*₁ (重水素化率 92%, 1.74 g, 4.38 mmol) を収率 74.6% で得た. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画は, 移動相に酢酸エチル (A) -ヘキサン (B) 混合液とし, B の組成が 50% のイソクラティック溶出とし, 検出波長 254 nm で行った.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.53 (dd, 1H, *J* = 5.6, 5.6 Hz, H6), 5.34 (m, 1H, H7), 5.16 (m, 2H, H22 and 23), 2.44 (dd, 1H, *J* = 2.2, 2.2 Hz, H4e), 2.29 (d, 1H, *J* = 0.48 Hz, H4a), 0.99 (s, 3H, H19), 0.89 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, H28), 0.80 (m, 6H, H26 and 27), 0.59 (s, 3H, H18).

1-3-6 結果と考察

松森らの報告した合成スキームと、本法の合成スキームを Figure8 に示す。松森らは、エルゴステロールを出発物質として 6 工程で ergosterol- d_1 の合成を達成した。PTAD による保護の後にジョーンズ試薬を使用しており、クロム廃液の処理が煩雑である点と PTAD の脱保護に 3 工程を要する点に改良の余地があると考えた。上記の 2 点について改良法を考案し、新たな合成スキームを開発することができた。具体的には、松森らが使用していたジョーンズ試薬について PCC を代替試薬として活用し、さらに PCC の残渣をフロリジルに含まれるマグネシウムに吸着させることによって簡便にケトンを単離した。さらに、PTAD の脱保護を DBU と反応させることによって、3 工程要していた反応工程を 1 工程に短縮し、脱保護することに成功した。次に、松森らの方法と本研究で改良した合成過程の収率を比較した結果を Table2 に示す。PTAD 保護エルゴステロンの合成では、収率を 80% から 91% に改善することができた。また、PTAD 保護 ergosterol- d_1 から ergosterol- d_1 への合成では、3 工程で収率 54% から 1 工程で 81% に大幅に改善することができた。

(A)



(B)

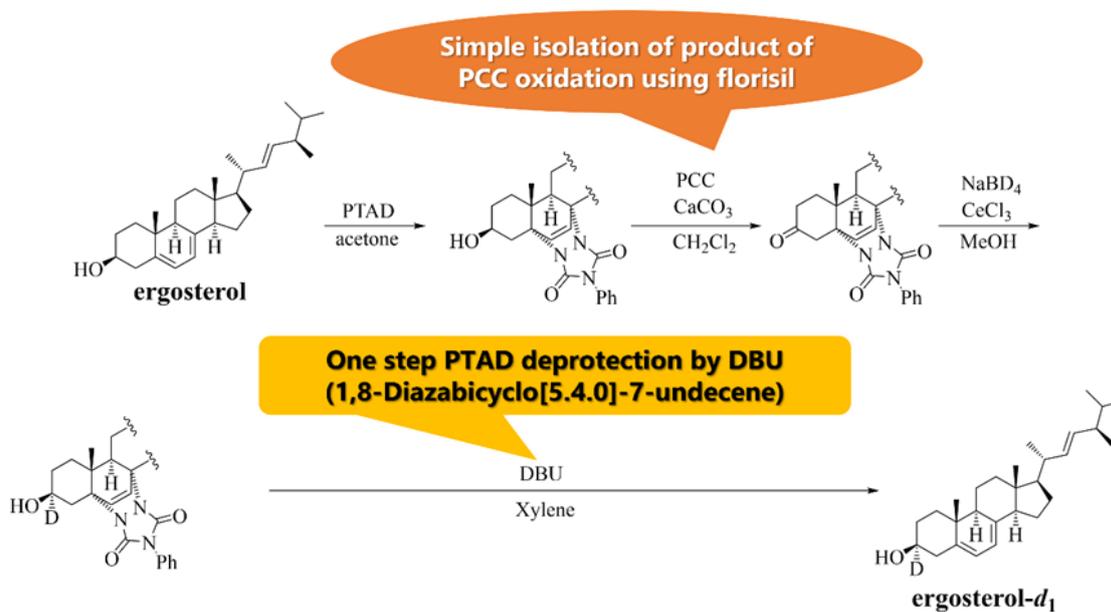


Figure 8 (A) The existing method for ergosterol-*d*₁ synthesis by Matsunori²¹), (B) The current method for synthesis. Balloons indicate the difference between existing scheme and our scheme.

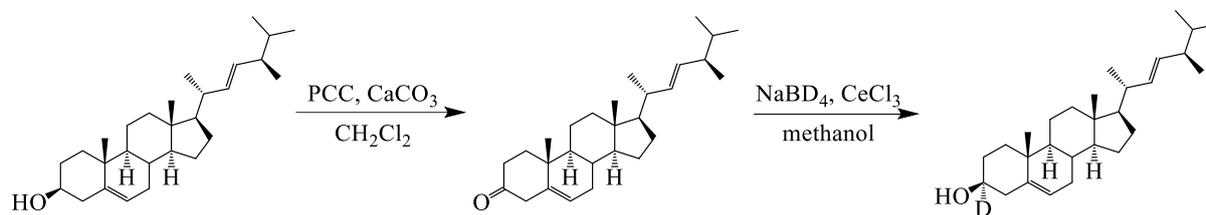
Table 2 Comparison of yields for each step in the synthesis of ergosterol- d_1 by the existing method and the current method.

	yield (%)	
	Existing method	Current method
STEP2	80	91
STEP4	81	80
STEP5	70	
STEP6	96	
Ergosterol to Ergosterol- d_1	9.5	16.1

1-4 Brassicasterol-*d*₁ の合成

1-4-1 Brassicasterol-*d*₁ の合成経路

ブラジカステロールは、定量法の開発に必要十分な 50 mg を目標に合成した。具体的には、ergosterol-*d*₁ の合成スキームを参考に、ブラジカステロールを原料として 2 工程で 3 α 位の水素を重水素に置換した。Brassicasterol-*d*₁ の合成手順を Scheme 2 に示す。



Scheme 2 Synthesis of brassicasterol-*d*₁

1-4-2 ブラジカステロンの合成

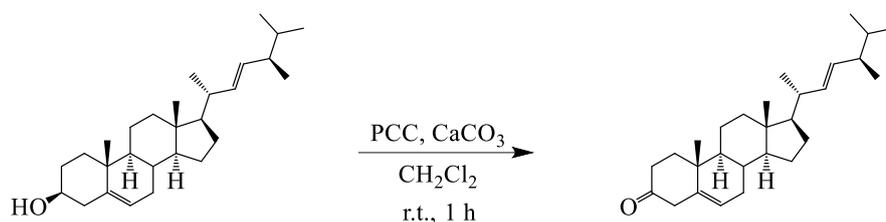


Figure 9 Conversion of brassicasterol to brassicasterone

ブラジカステロールからブラジカステロンへの合成手順を Figure 9 に示す。ブラジカステロール (100 mg, 0.251 mmol) をジクロロメタン (8 mL) に溶解し、炭酸カルシウム (20 mg) とモレキュラーシーブ 4A (96 mg), PCC (170 mg) を加え室温で 1 h 攪拌した。上層にフロリジル, 下層にシリカゲルを積層したカラムに反応後の溶液, ジクロロメタン 20 mL, ジエチルエーテル 30 mL を通液し, 各溶液を回収した。これらの溶液を減圧下で濃縮し, ブラジカステロン (18.1 mg, 0.0456 mmol) を収率 18.2% で得た。ブラジカステロンの収量が想定よりも少なかったため, 新たに 100 mg のブラジカステロールを原料として, 上記の手順を繰り返して, ブラジカステロン (87.5 mg, 0.221 mmol) を収率 87.9% で得た。合計でブラジカステロン 105.6 mg (0.266 mmol) を得ることができた。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.26 (m, 1H, H6), 5.12 (m, 2H, H22 and 23), 3.22 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H4e), 2.45 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H4a), 0.94 (s, 3H, H19), 0.85 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.77 (m, 6H, H26 and 27), 0.65 (s, 3H, H18).

1-4-3 Brassicasterol-*d*₁ の合成

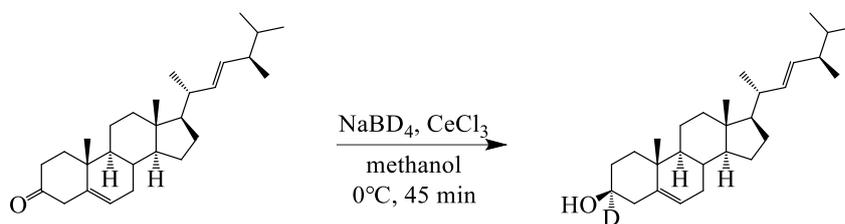


Figure 10 Conversion of brassicasterone to brassicasterol-*d*₁

ブラジカステロンから brassicasterol-*d*₁ の合成手順を Figure 10 に示す. ブラジカステロン (105.6 mg, 0.266 mmol) をメタノール (10 mL) に溶解し, 重水素化ホウ素ナトリウム (26 mg) と塩化セリウム (III) 七水和物 (235 mg) を加え, 0°C 下で 45 min 攪拌した. 反応物を水でクエンチし, セライトカラムを通し, クロロホルムで抽出した. 抽出液を減圧濃縮した後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い, 3β位にヒドロキシ基を持つ brassicasterol-*d*₁ (重水素化率 99%, 62.8 mg, 0.157 mmol) を収率 59.0% で得た. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画は, 移動相にアセトン (A) -ヘキサン (B) 混合液を用い, 0-100 分の間, B の割合が 95%, 100-110 分の間, B の割合が 0% となるステップワイズ溶出とし, 検出波長 220 nm で行った.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (m, 1H, H6), 5.20 (m, 2H, H22 and 23), 2.24 (m, 2H, H4a and 4e), 0.92 (m, 3H, H19), 0.82 (m, 6H, H26 and 27), 0.69 (s, 3H, H18). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 12.2, 17.7, 19.5, 19.7, 20.0, 21.0, 21.2, 24.4, 28.6, 31.6, 32.0, 33.2, 36.6, 37.3, 39.8, 40.2, 42.3, 42.3, 42.9, 50.2, 56.1, 56.9, 121.8, 131.8, 135.9, 140.8. HRMS (ESI-TOF) Calcd for C₂₈H₄₆ [M-D-OH+H]⁺: 382.3600, Found: 382.3631.

1-5 小括

Ergosterol- d_1 は、エルゴステロールを出発物質として 3α 位の水素を重水素に置換して調製した。まず、エルゴステロールの 5,7-ジエン構造の保護のため、PTAD を反応させ、PTAD 保護エルゴステロールを合成した。次に、PCC を用い、3 位のヒドロキシ基をカルボニル基へと酸化した。その後、重水素化ホウ素ナトリウムを反応させ、 3α 位に重水素を導入した PTAD 保護 ergosterol- d_1 を合成した。次に、DBU を用いて PTAD を脱保護し、ergosterol- d_1 を得た。反応スキームを 2 工程短縮したところ、エルゴステロール 10.8 g を出発物質として ergosterol- d_1 1.74 g が得られ、重量収率を従来法の 9.5% から 16.1% に改善できた。

Brassicasterol- d_1 は、ブラジカステロール 200 mg を出発物質として brassicasterol- d_1 を 62.8 mg (重量収率 31%) 合成できた。

第 2 章 SHRSP における重水素標識エルゴステロールの血中動態の解析

2-1 緒言

エルゴステロール (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) は、B 環に 2 つの二重結合と側鎖に 1 つの二重結合を有する。エルゴステロールは、ビタミン D2 の前駆体として知られており、太陽光などの紫外線照射によって B 環が開環し、ビタミン D2 に変換される²³⁻²⁸⁾。また、エルゴステロールは生体内で抗炎症作用²⁹⁾、抗糖尿病作用³⁰⁾、抗利尿作用³¹⁾、抗がん作用³²⁾などの作用を示すことが報告されており、その生物活性が注目されている³³⁾。

本研究では、シトステロール血症モデル動物の SHRSP におけるエルゴステロールの血中動態を求め、更にその代謝物と想定している血中ブラジカステロールを定量する。この目的のために、1 章ではラットへの投与実験に十分な量の両ステロールの重水素標識体 (ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1) を合成した。本章では SHRSP の実験に先立ち、UHPLC-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の高感度定量法を開発する。UHPLC と MS/MS のインターフェイスを構成するイオン源としては、汎用性を考慮し、エレクトロスプレーイオン源 (ESI) とする。コレステロール、エルゴステロール、ブラジカステロールなどのステロールは、分子内に 1 つのヒドロキシ基しか持たないため、ESI でのイオン化効率が低く、強いシグナルを得ることが困難である³⁴⁻³⁷⁾。そこで、ヒドロキシ基を標的とする誘導体化を行って、高感度化を図った。誘導体化の従来法は、ヒドロキシ基と反応試薬を直接反応させる方法³⁴⁾、コレステロールオキシダーゼなどの酵素によってヒドロキシ基を酸化し、カルボニル基と反応させる方法^{38, 39)}などがある。今回取り扱う ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 の重水素を活かし、且つ誘導体化後の化合物のイオン化効率について考慮した結果、既存の誘導体化法では水酸基との縮合反応が最も適していると考えられる。これらの制限を総合的に検討し、定量に際しては、ステロールをピコリン酸エステル体へと誘導体化し、MS/MS による検出感度の上昇を図る。更に、血清への ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 の添加回収試験を行い、血清の前処理法を確立する。その上で、SHRSP への ergosterol- d_1 の経口投与実験を行い、経時的に採血し、血中の ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 を定量する。得られる血中濃度-時間曲線から、PK パラメータを算出しエルゴステロールの血中動態に関して議論する。

2-2 実験材料・方法

2-2-1 試薬

本章では以下の試薬を用いた。酢酸 (>99.5%)、4-ジメチルアミノピリジン (>99%)、テトラヒドロフラン (>99.5%)、トリエチルアミン (>99.0%)、クロロホルム (>99.0%)、メタノール (>98.0%) は富士フイルム和光純薬株式会社製を用いた。6-ケトコレスタノールは Steraloids 社製を用いた。アセトニトリル (>99.9%) は Honeywell 社製を用いた。ピリジン-2-カルボン酸 (ピコリン酸, >99%)、2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (>98%) は東京化成工業株式会社製を用いた。水は、超純水製造装置 RFU666HA (アドバンテック東洋社製) によって精製された (>18.2 M Ω) ものを用いた。

2-2-2 UHPLC-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の定量

1 章で合成した重水素標識体を測定対象物質として UHPLC-MS/MS による超高感度定量法の開発を行った。UHPLC-MS/MS システムは、UHPLC 部にポンプ (quaternary solvent manager)、オートサンプラー (sample manager)、ODS カラム (Acquity UPLC BEH C18, 150 \times 2.1 mm, i.d., 1.7 μ m, Waters)、カラムオーブン (column heater) から構成される Acquity UPLC™ H-class System、MS/MS 部にイオン源をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) イオン源とする Xevo TQD 質量分析計を組み合わせた Waters 製のものを用いた。

移動相には、0.1%酢酸含有メタノール/0.1%酢酸含有水溶液 (95/5, v/v) を用い、0.4 mL/min の流速で送液した。カラム温度は 50 $^{\circ}$ C、注入量は 2 μ L に設定した。MS 条件は、脱溶媒ガス流量 1000 L/h、脱溶媒ガス温度 500 $^{\circ}$ C、キャピラリー電圧 3.00 kV、コーンガス流量 50 L/h に設定した。システムは Masslynx ver.4.1 ソフトウェアで制御した。MS クロマトグラムは ESI ポジティブイオンモードで MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードで取得した。定量には MS クロマトグラム上のピーク面積を算出して解析した。

血清中の ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の定量には内部標準法を用い、内部標準物質 (IS) として 6-ケトコレスタノールを使用した。各化合物の構造式を Figure 11 に示す。

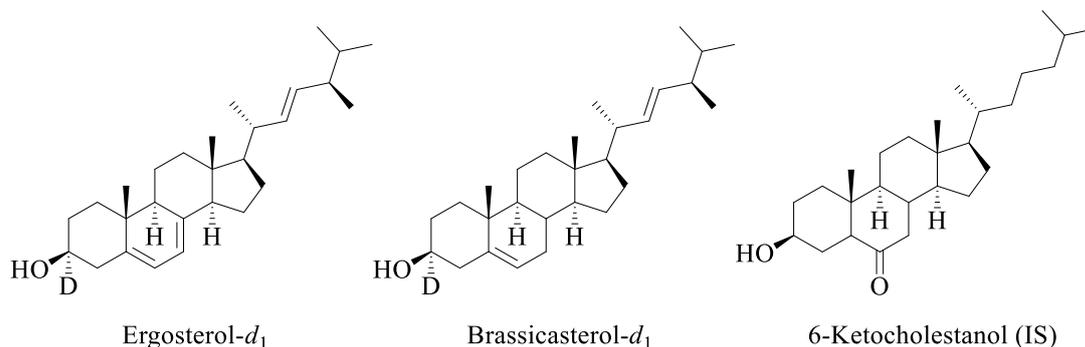


Figure 11 Structures of ergosterol-*d*₁, brassicasterol-*d*₁ and 6-ketocholestanol (IS).

2-2-3 SHRSP への ergosterol-*d*₁ の経口投与及び採血

雄の SHRSP (SHRSP/*Izm*) (9 週齢) は, SHR 等疾患モデル共同研究会のものを, 日本 SLC 社を通じて入手した. ラットは, 温度 (23±1°C) 及び照明 (点灯, 午前 7 時～午後 7 時) を一定の条件下で, 飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社製) 及び水を自由に摂取できるように飼育した. 実験では, ラットを 16 時間絶食させた後, 体重を測定し (214±5 g), パーム油に懸濁した ergosterol-*d*₁ (40 mg/mL) を 100 mg/kg の用量でゾンデを用いて経口投与した (n = 4). コントロールの SHRSP にはパーム油のみを投与した (2.5 mL パーム油/kg, n = 2). 経口投与後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24 及び 36 時間に血中濃度測定用の血液サンプル (約 0.1 mL) を尾静脈から採取した. ラットのエルゴステロールの投与量と採血の間隔は, Zhao らの研究に基づいて決定した¹⁷⁾. 36 時間後, すべてのラットを 150 mg/kg のペントバルビタールの腹腔内注射によって安楽死させた. 注射直後, コントロール SHRSP の尾静脈から血液 (パーム油投与後 36 時間) を数ミリリットル採取した. 2 匹のコントロール SHRSP の血清を合わせて, 検量線作成や添加回収試験などに用いるコントロール SHRSP プール血清として使用した. 血清試料の調製は, 各血液チューブを氷上で 30 分間インキュベートし, 1200×g で 4°C, 30 分間遠心分離した. 血清試料は -20°C で凍結し, 誘導体化するまで保存した. 動物実験は, 東京薬科大学動物実験委員会の承認 (#P17-16, #P21-78) を受け, 同委員会のガイドラインに準拠して実施した.

2-2-4 血清試料の前処理

2-2-4-1 検量線及び添加回収試験のためのケン化処理

コントロール SHRSP プール血清は、検量線及び添加回収試験のマトリックスとして使用した。検量線は血清中に含まれる成分によるマトリックス効果を考慮し、マトリックス添加標準溶液を用いて描いた。Ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 のメタノール標準溶液は、直射日光や紫外線の影響を最小限にするために遮光し、 -20°C で保存した。検量線の定量下限は、繰り返し測定を行い、RSD が 20% 以下となる点を選択した。

検量線用サンプルは、既知濃度の ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 のメタノール溶液 (0.002, 0.004, 0.02, 0.04, 0.2, 0.4, 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL をガラススピッツに加え、 70°C 、窒素気流下で蒸発乾固させた。室温になるまで放置した後、各ガラススピッツに、コントロール SHRSP プール血清を 10 μL ずつ添加した。ブランクは、ガラススピッツにコントロール SHRSP プール血清を 10 μL 添加したものを使用した。次に、1.33 mol/L KOH メタノール溶液 150 μL と 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-ケトコレスタノール (IS) メタノール溶液 50 μL を加えた後、 45°C で 60 分間インキュベートした。

2-2-4-2 SHRSP 血清試料のケン化処理

Ergosterol- d_1 投与実験における各採血時点の SHRSP の血清試料は、使用直前に融解したものを使用した。血清試料 10 μL をガラススピッツに移した。次に、1.33 mol/L KOH メタノール溶液を 150 μL 、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6-ケトコレスタノール (IS) メタノール溶液を 50 μL 添加し、 45°C で 60 分間インキュベートした。

2-2-4-3 ステロール脂質の抽出

脂質抽出には、Bligh-Dyer 法⁴⁰⁾に若干の修正を加えた方法を用いた。先行研究²⁰⁾の手法では中間層のタンパク質を含む層が白濁し、均一に分離しなかったが、ギ酸を加えて試料溶液を酸性にすることによって、上相、中間相、下相の分離が明瞭になり、下相の分取の操作が大幅に改善された。この検討に基づきステロ-

ルの抽出は、ケン化した試料にギ酸 15 μL 、メタノール 800 μL 、クロロホルム 500 μL 、水 400 μL を加え、30 秒間ボルテックスした。更にクロロホルム 500 μL 、水 500 μL を加え、1450 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ にて 5 min 遠心分離した。その後、クロロホルム相（下相）を新しいガラススピッツに移し、水とタンパク質相（上・中相）には 1000 μL のクロロホルムを添加した。水相とタンパク質相を 30 秒間ボルテックスした後、1450 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ で 5 min 遠心分離を行った。下相を回収し、元のクロロホルム相と合わせた。この抽出液を窒素気流下、70 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥させた。

2-2-4-4 誘導体化反応及び後処理

ピコリン酸エステル誘導体化は、本多らの方法⁴¹⁾の改良法とした。

誘導体化反応は、事前に活性中間体を含む誘導体化試液を調製した後にサンプルチューブ内で反応させる。誘導体化試液の調製は、ピコリン酸 25 mg、2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 20 mg、4-ジメチルアミノピリジン 10 mg をテトラヒドロフラン 1500 μL に溶解し 40 $^{\circ}\text{C}$ で 10 min インキュベートした。乾燥した抽出液の入ったガラス試験管に、誘導体化試液 150 μL 、トリエチルアミン 20 μL 、テトラヒドロフラン 200 μL を加え、室温で 60 min 攪拌した。反応終了後、反応液は窒素気流下、70 $^{\circ}\text{C}$ で蒸発乾固させた。次に、脂質抽出のため、Bligh-Dyer 法⁴⁰⁾で抽出した。実際には、蒸発乾固させた試料にメタノール 1000 μL 、クロロホルム 400 μL 、水 500 μL を加え、30 秒間ボルテックスした。ボルテックスした溶液にクロロホルム 500 μL 、水 500 μL を加えた後、1450 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ で 5 min 遠心分離した。クロロホルム相（下相）を新しいガラススピッツに移し、窒素気流下、70 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥した後、移動相 100 μL に溶解した。この溶液を 0.22 μm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) メンブレンフィルターを通過させてから UHPLC-MS/MS システムに注入した。

エルゴステロールを例に誘導体化の反応機構を Figure 12 に示す。ピコリン酸は、4-ジメチルアミノピリジンの反応に続いて 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物と反応し、ピコリン酸と 2-メチル-6-ニトロ安息香酸の活性中間体を形成する。その後、活性中間体とステロール化合物のヒドロキシ基と反応し、ピコリン酸エステル化ステロールを形成すると考えられる。

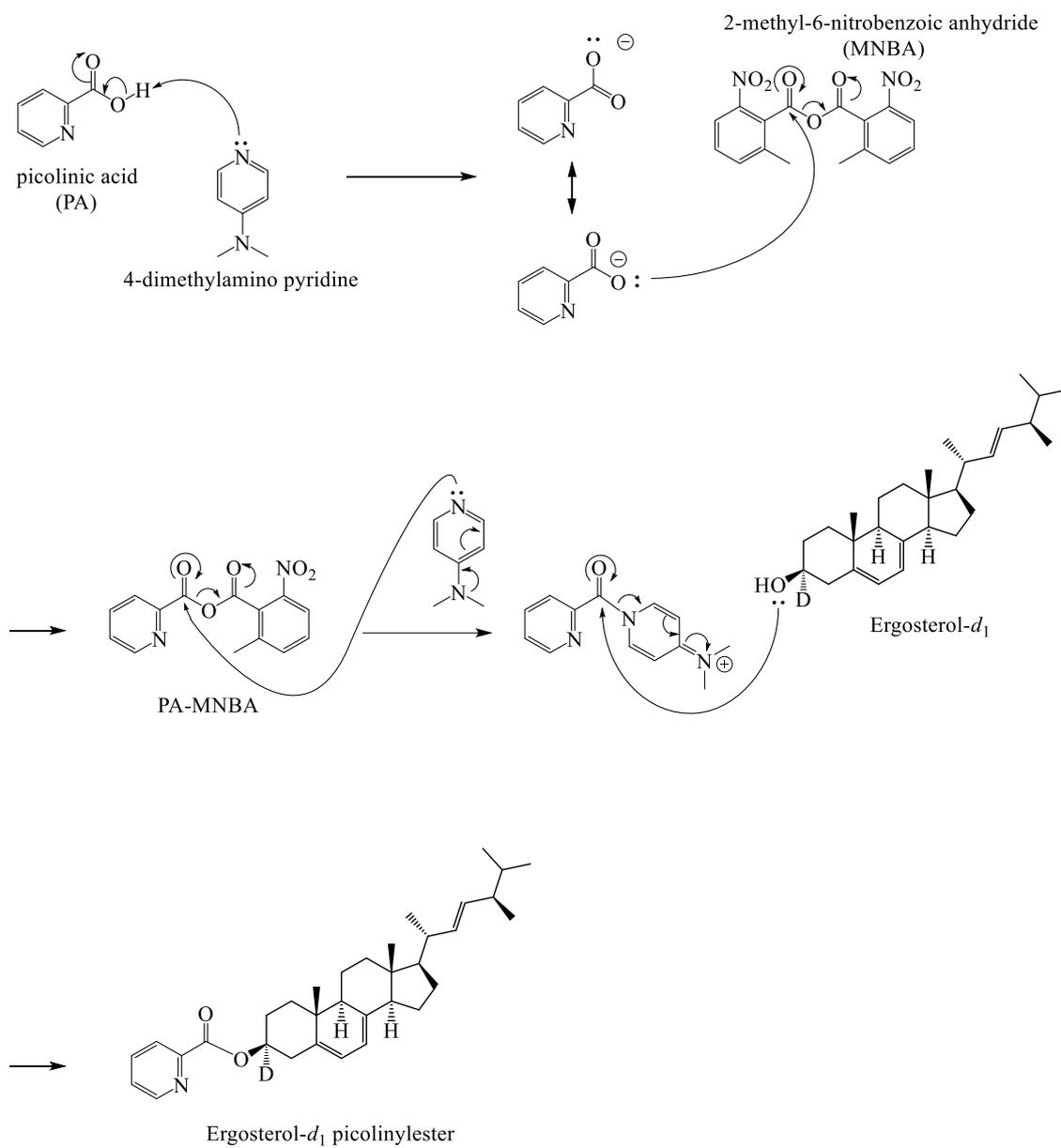


Figure 12 Derivatization reaction of ergosterol-*d*₁ to form picolinyl ester.

2-2-4-5 薬物動態パラメータの算出

Ergosterol- d_1 の血中濃度曲線の解析は、2-2-2 に基づき、血清中の Ergosterol- d_1 濃度を算出した後、各動物の血中濃度曲線を 1-コンパートメントモデルに基づいて解析した。解析には、Excel 365 (Microsoft) を用いた。

2-3 結果と考察

2-3-1 UHPLC-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の高感度定量

UHPLC-ESI-MS/MS の測定条件は、プリカーサーイオン、プロダクトイオン、コーン電圧、コリジョンエネルギーなどの MRM 条件を最適化した。

プリカーサーイオンについては、各測定対象物質の標準溶液を調製し、フローインジェクション法によって測定した。MS は、選択イオンモニタリング (SIM) モードに設定し、ステロールピコリン酸エステルの代表的な 3 つのプリカーサーイオン ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) について SIM クロマトグラムを測定した。各 SIM クロマトグラムのピーク面積を比較したところ、Ergosterol- d_1 , brassicasterol- d_1 とともに、 $[M+Na]^+ > [M+K]^+ > [M+H]^+$ (M は各ステロールのピコリン酸エステル) の順にピーク面積が大きく、ナトリウムイオン付加分子が最大のピーク面積を与えた。LC-MS/MS では、通常 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして選択することが多い。しかし、本研究で取り扱った測定対象物質は、 $[M+H]^+$ と比較して $[M+Na]^+$ のシグナルの感度が約 10 倍高い結果となった。これは、ピコリン酸と Na^+ イオンの親和性が高く、ピコリン酸誘導体と移動相中に極微量存在する Na^+ イオンが付加した結果、シグナル強度が大幅に改善されたと考えられる。よって、両ステロールのピコリン酸エステルのプリカーサーイオンとして $[M+Na]^+$ を選択した。

次に、コーン電圧の検討を行った。今回取り扱った装置では試料導入口の ESI キャピラリーとイオン化した試料の導入口が直交しており、サンプルコーンに電圧を印加することによって、イオンが質量分離部に引き込まれる。コーン電圧を 30~65 V の範囲で検討した結果、ergosterol- d_1 は 35 V, brassicasterol- d_1 は 45 V, 6-ケトコレスタノールは 50 V において最も高いシグナルを示した。

プロダクトイオンの選定には、プリカーサーイオン ($[M+Na]^+$) 及びコリジョン電圧 (5~55 V) を指定し、プロダクトイオンをスキャンしたマスクロマトグラムを測定した。Figure 13 にマスクロマトグラム上の $[M+Na]^+$ のピークから抽出したマススペクトルを示す。何れのプリカーサーイオン (ergosterol- d_1 のピコリン酸エステル: ergosterol- d_1 PE; brassicasterol- d_1 のピコリン酸エステル: brassicasterol- d_1 PE; 6-ケトコレスタノールのピコリン酸エステル: 6-ketocholestanol PE) においても、コリジョン電圧が 5 V では、 $[M+Na]^+$ が最大のシグナルを与え、プロダクトイオンはほとんど生成していないことが分かった。コリジョン電圧 15 V では、 m/z 146 の $[Picolinic\ acid + Na]^+$ が出現し、ergosterol- d_1 PE では最大のシグナルを与えた。コリジョン電圧 25 V と 35 V では、3 つ全てにおいて、 $[Picolinic\ acid + Na]^+$ が他のイオンと比較して最も大きなシグナル

を与えた。[Picolinic acid + Na]⁺は全てのステロールピコリン酸エステルから生成するため、ステロール選択性はない。ステロール選択的な検出を行う目的で、コリジョン電圧 45 V と 55 V で観察された *m/z* 146 以外の主要なイオンをプロダクトイオンとする MS/MS クロマトグラムを描いてみた。しかし、[Picolinic acid + Na]⁺をプロダクトイオンとするものよりも選択性の高い、化合物ごとの特徴的な MS/MS クロマトグラムを得ることは出来なかった。そのため、[Picolinic acid + Na]⁺をプロダクトイオンに設定することとし、コリジョン電圧は、ergosterol-*d*₁ は 15 V, brassicasterol-*d*₁ は 20 V, 6-ケトコレスタノールは 25 V とした。以上の検討から MRM 条件を決定した (Table 3)。

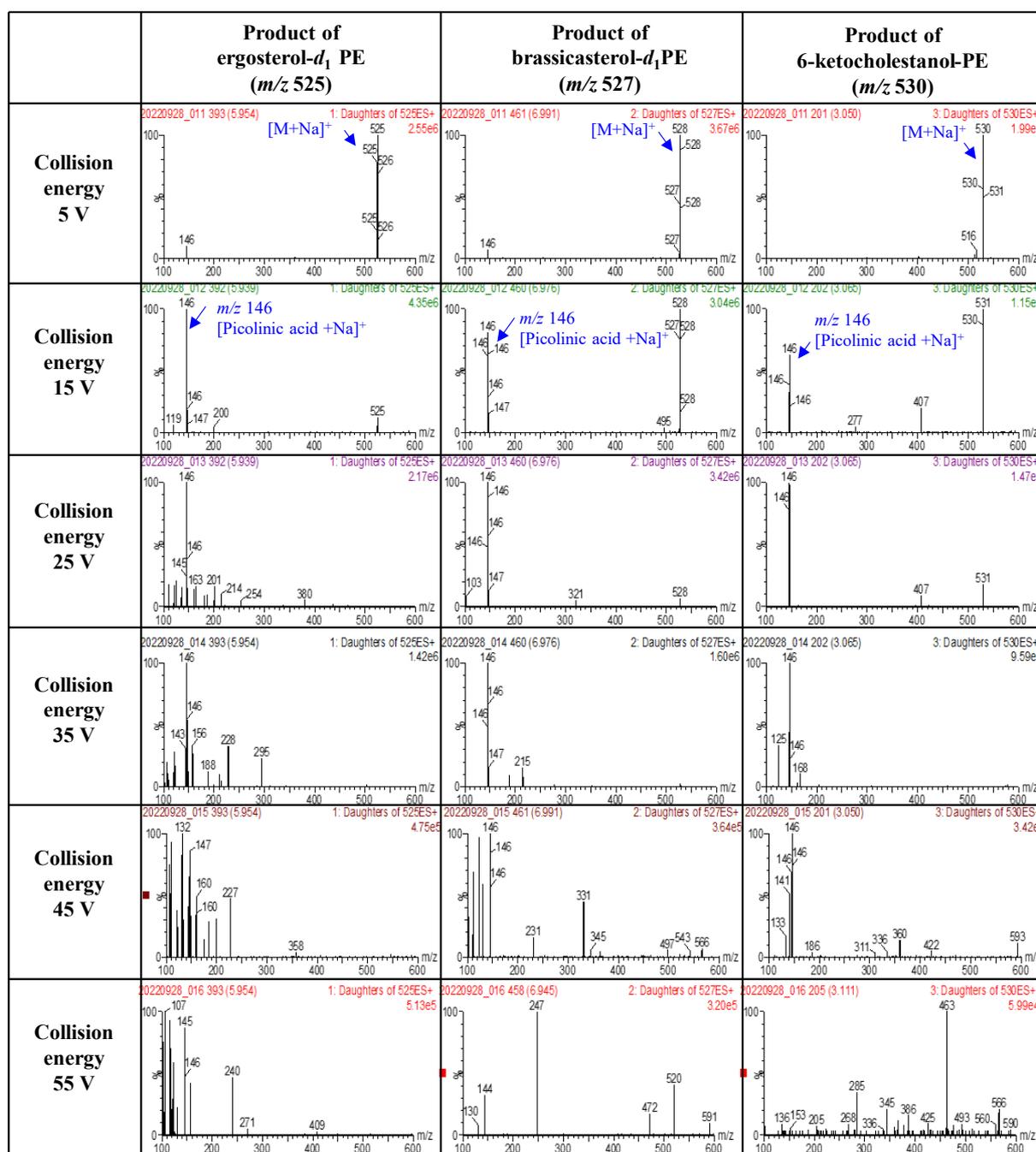


Figure 13 MS spectra at different collision energies (5 to 55 V). The spectra were extracted from the product ion scan chromatograms of sterol picolinyl esters. Left column; ergosterol-*d*₁ picolinyl ester (ergosterol-*d*₁ PE); middle column; brassicasterol-*d*₁ picolinyl ester (brassicasterol-*d*₁ PE); right column; 6-ketocholestanol picolinyl ester (6-ketocholestanol PE).

Table 3 Multiple reaction monitoring transitions of ergosterol-*d*₁, brassicasterol-*d*₁ and 6-ketocholestanol

Sterol	Sterol picolinyl ester [M]	Precursor	Product ion		
		ion [M+Na] ⁺ , <i>m/z</i>	[Picolinic acid+Na] ⁺ , <i>m/z</i>	Cone energy(V)	Collision energy(V)
Ergosterol- <i>d</i> ₁	C ₃₄ H ₄₆ DNO ₂	525.36	146.02	35	15
Brassicasterol- <i>d</i> ₁	C ₃₄ H ₄₈ DNO ₂	527.37	146.02	45	20
6-Ketocholestanol	C ₃₃ H ₄₉ NO ₃	530.40	146.02	50	25

LC 条件については、移動相と酸又は塩の組み合わせを MRM クロマトグラムのピーク面積をもとに比較検討した。2 種類の移動相 (アセトニトリル-水 (95:5, v/v) 及びメタノール-水 (95:5, v/v)) と 4 種類の酸又は塩 (0.1%酢酸, 0.1%ギ酸, 10 mmol/L 酢酸アンモニウム, 10 mmol/L ギ酸アンモニウム) のうち、0.1%酢酸を含むメタノール/0.1%酢酸を含む水 (95:5, v/v) における ergosterol-*d*₁ PE 及び brassicasterol-*d*₁ PE の MRM クロマトグラムのピーク面積が最も大きかったため、移動相として選択した。カラムについては、brassicasterol-*d*₁ PE のピークを血清マトリックスに由来する他のピークと分離するため、ODS カラムの中でも理論段数の高い 150 mm の Acquity UPLC® BEH C18 column を使用した。

2-3-2 検量線及び添加回収試験

Figure 14 に、ブランク（コントロール SHRSP プール血清に内標準物質（IS）のみを添加してから前処理）の MRM クロマトグラム（Figure 14A～C）、並びに ergosterol- d_1 , brassicasterol- d_1 及び IS をスパイクしてから前処理したコントロール SHRSP プール血清（Figure 14D～F）の MRM クロマトグラムを示す。ブランクには、ergosterol- d_1 PE に対応するピークは観測されなかった（Figure 14A 及びインセット）。一方、ergosterol- d_1 をスパイクした血清には、1 本の明瞭なピークが観察された（Figure 14D）。これに対し brassicasterol- d_1 PE に関しては、brassicasterol- d_1 をスパイクした血清において観察されたピーク（Figure 14E）と同じ保持時間に、brassicasterol- d_1 をスパイクしていないブランクにおいても小さなピークが観測された（Figure 14B 及びインセット）。この小ピークは、カラムや移動相等の分離条件を変更しても brassicasterol- d_1 PE と分離することは困難であった。 ^{13}C の天然存在比は約 1.1% であり、ブラジカステロールは 28 個の炭素原子を有することを考慮すると、4 分子のブラジカステロール（合計炭素数 112）のうち 1 分子は、brassicasterol- d_1 PE とほぼ同じ m/z のプリカーサーイオンを生成すると予想される。そこで、食餌などに由来するブラジカステロールが SHRSP 血清中に存在し、そのうち炭素原子 1 個が ^{13}C に置換されたブラジカステロールが検出されたと考察した。定量に際しては、このシグナルをマトリックス由来と定義し、コントロール SHRSP プール血清に ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 を添加して検量線（マトリックス検量線と呼ばれる）を作成することにした。IS に関しては、IS のみを添加したブランク（Figure 14C）と ergosterol- d_1 , brassicasterol- d_1 及び IS をスパイクした血清（Figure 14F）で、ほぼ同じシグナル強度の明瞭なピークを与えた。

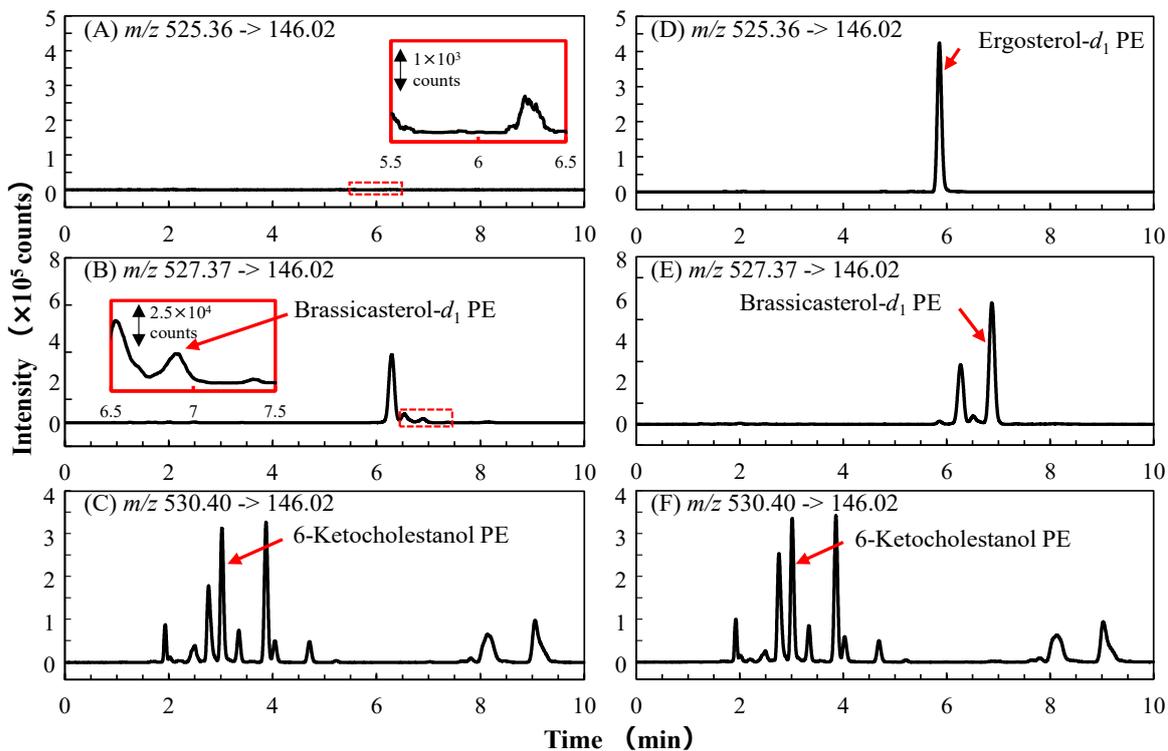


Figure 14 Multiple reaction monitoring chromatograms of ergosterol- d_1 picolinyl ester (PE), brassicasterol- d_1 PE, and 6-ketocholestanol PE in the presence of the pooled control SHRSP serum. Ten microliters of the pooled control SHRSP serum were spiked with (D-F) or without (A-C) ergosterol- d_1 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the serum) and brassicasterol- d_1 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the serum), and further added with (A-F) 6-ketocholestanol (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the serum). Then, the samples were derivatized to picolinyl esters according to the experimental section (2-2-4). A 2 μL sample of the solution was injected into the UHPLC-ESI-MS/MS to obtain the MRM chromatograms. (A, D) MRM chromatogram of m/z 525.36 \rightarrow 146.02 for ergosterol- d_1 PE. (B, E) MRM chromatogram of m/z 527.37 \rightarrow 146.02 for brassicasterol- d_1 PE. (C, F) MRM chromatogram of m/z 530.40 \rightarrow 146.02 for 6-ketocholestanol PE. In A and B, each inset indicates an expanded chromatogram of a boxed area. LC conditions used were: column, Acquity UPLC[®] BEH C18 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 1.7 μm); column temperature, 50 $^\circ\text{C}$; flow rate, 0.4 mL/min; mobile phase 0.1% acetic acid in methanol/0.1% acetic acid in H₂O (95/5, v/v). MS conditions used were: ion mode, ESI positive; source gas temperature, 150 $^\circ\text{C}$; drying gas temperature, 500 $^\circ\text{C}$; capillary voltage, 3.0 kV. MRM conditions are shown in Table 3.

Figure 15 に, ergosterol- d_1 , brassicasterol- d_1 及び IS をコントロール SHRSP プール血清にスパイクして作成した検量線を示す. 定量下限の算出には, 検量線の最低濃度以下のサンプルの測定を行い, ピーク面積の RSD が 20% 以下の安定したシグナルが得られた点を選択した. 従って ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の定量限界は, それぞれ 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と決定した. 決定した定量限界におけるクロマトグラムを Figure 16 に示す. 検量線の範囲, 回帰直線, 相関係数を Table 3 に示す. 本法は, SHRSP 血清中のエルゴステロール濃度の定量に適用可能な直線性と範囲を有すると考えられた.

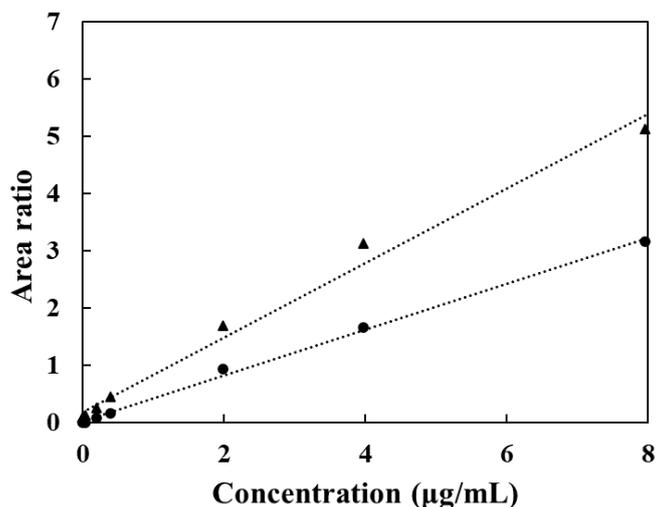


Figure 15 Calibration curves of ergosterol- d_1 (●) and brassicasterol- d_1 (▲) based on the peak area ratio to IS (6-ketocholestanol). The linearity and range of each curve were shown in Table 4. The corresponding chromatograms for the concentration point of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ergosterol- d_1 and brassicasterol- d_1 were shown in Figure 14D and Figure 14E, respectively. Figure 16A and Figure 16B shows the chromatograms of 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ergosterol- d_1 and 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ brassicasterol- d_1 , respectively.

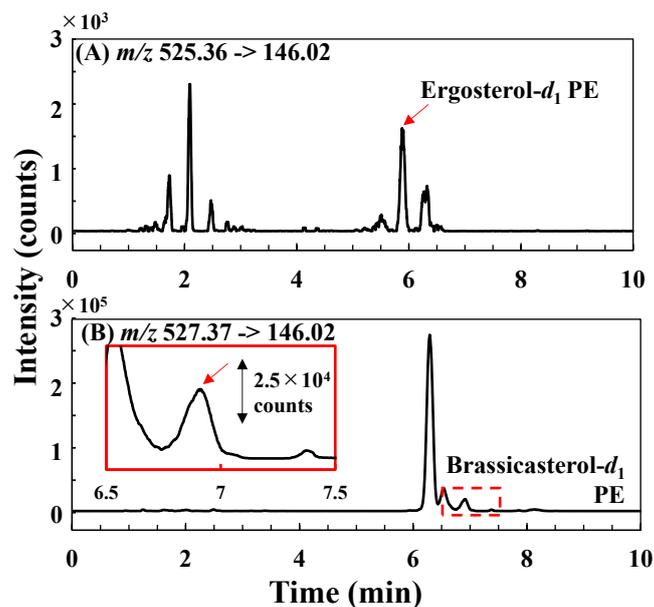


Figure 16 Multiple reaction monitoring chromatograms of the lower limit of quantification (LLOQ). (A) 0.04 $\mu\text{g/mL}$ ergosterol- d_1 in the presence of the pooled control SHRSP serum. (B) 0.02 $\mu\text{g/mL}$ brasicasterol- d_1 in the presence of the pooled control SHRSP serum. The inset indicates an expanded chromatogram of a boxed area. Sample preparation and LC-MS conditions were same as Figure 14.

Table 4 Linear range and correlation coefficient of calibration curves.[§]

Sterol	Range, $\mu\text{g/mL}$	Linear regression equation	r
Ergosterol- d_1	0.04 – 8 (6 points)	$y = 0.4008x + 0.0205$	0.996
Brassicasterol- d_1	0.02 – 8 (7 points)	$y = 0.6505x + 0.1846$	0.983

[§]The calibration curve in the presence of the pooled control SHRSP serum was obtained by injecting six or seven different concentrations of sterols and 6-ketocholestanol (IS) into the UHPLC-ESI-MS/MS after sample preparation. The concentration points in the serum were 0.04, 0.2, 0.4, 2.0, 4.0 and 8.0 $\mu\text{g/mL}$ for ergosterol- d_1 and 0.02, 0.04, 0.2, 0.4, 2.0, 4.0 and 8.0 $\mu\text{g/mL}$ for brassicasterol- d_1 , respectively. These values were obtained from a calculation based on a procedure that 100 μL of the methanol solution of a known concentration of ergosterol- d_1 and brassicasterol- d_1 (0.002, 0.004, 0.02,

0.04, 0.2, 0.4 and 0.8 $\mu\text{g/mL}$) was added to 10 μL of the pooled control SHRSP serum as described in the sample preparation section. A linear regression equation was calculated based on the ratio of the peak area of each sterol and that of the IS. The correlation coefficient is shown as r .

Table 5 に添加回収試験の結果を示す. コントロール SHRSP プール血清へ高濃度 (4 $\mu\text{g/mL}$), 中濃度 (2 $\mu\text{g/mL}$) 及び低濃度 (0.4 $\mu\text{g/mL}$) の ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 をスパイクしたときの回収率は 95.6~119%の範囲にあった. また, RSD は 7.5%未満であり, 高精度な測定が可能であることが示された. IS のシグナルは検量線と同等のピーク面積が得られた.

Table 5 Recovery of ergosterol- d_1 and brassicasterol- d_1 from SHRSP serum[‡].

Sterol	Amount spiked, ng	Serum concentration, $\mu\text{g/mL}$	Recovery, %	RSD, % (n=6)
Ergosterol- d_1	40	4	96.9	4.0
	20	2	111	5.5
	4	0.4	104	5.9
Brassicasterol- d_1	40	4	95.6	5.4
	20	2	116	6.1
	4	0.4	119	7.5

[‡]For the recovery test, the pooled control SHRSP serum (10 μL) was spiked with 40, 20, 4 ng of sterols in a glass tube and saponified, extracted, derivatized, dissolved in 100 μL of the mobile phase, and injected into the UHPLC-ESI-MS/MS as described in the experimental section.

2-3-3 Ergosterol- d_1 経口投与後の ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の血中動態

SHRSP へ経口投与した ergosterol- d_1 とその代謝物と考えられる brassicasterol- d_1 の血中濃度の経時変化を調べるために、SHRSP に ergosterol- d_1 を 100 mg/kg の用量で経口投与し、経時的に採血し、血清を調製した。血清を前処理してピコリン酸エステル化した後、ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 を定量した。投与 6 時間後の SHRSP 血清の代表的なクロマトグラムを Figure 17 に示す。Ergosterol- d_1 PE (Figure 17A), brassicasterol- d_1 PE (Figure 17B) 及び 6-ketocholestanol PE (Figure 17C) のそれぞれのピークを観測することができた。6-ketocholestanol PE の MRM クロマトグラムでは、採血時間の異なるサンプルによって夾雑ピークの強度に変化が見られた。これらは、内因性化合物の代謝や投与した Ergosterol- d_1 含有パーム油の影響が関与すると考えられた。

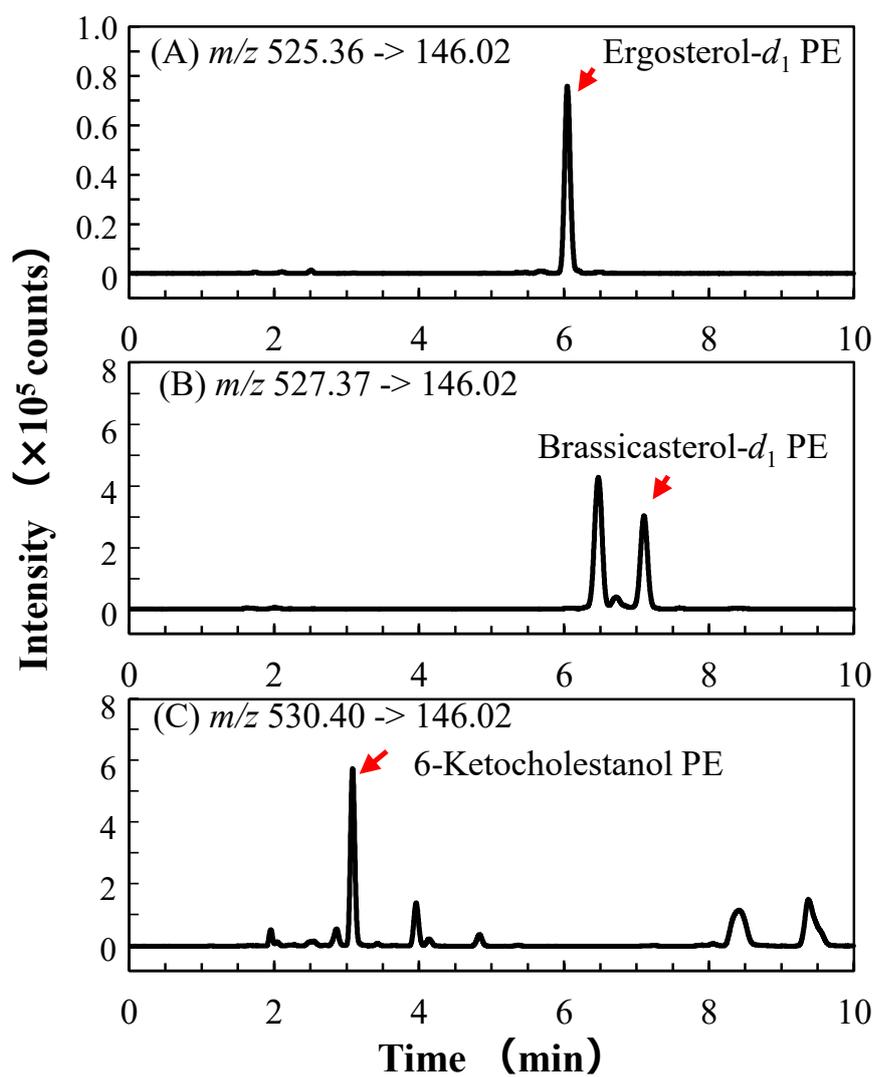


Figure 17 Multiple reaction monitoring chromatograms of ergosterol- d_1 picolinyl ester (PE)(A), brassicasterol- d_1 PE (B), and 6-ketocholestanol PE (C) in SHRSP serum after 6 h of 100 mg/kg ergosterol- d_1 administration.

Ergosterol- d_1 を経口投与した SHRSP における ergosterol- d_1 の血中濃度-時間曲線を Figure 18 に示す. 1-コンパートメントモデルに基づく ergosterol- d_1 の薬物動態 (PK) パラメータを Table 6 にまとめた. 一般に, 脳卒中や高血圧に関連する実験では, SHRSP の比較対照として Wistar Kyoto 系ラット (WKY) が用いられる. しかし, WKY は SHRSP と同様に ABCG5 及び ABCG8 に遺伝子変異が報告⁴²⁾がされており, シトステロール血症のモデル比較対照として適切ではない. そこで, ABCG5 及び ABCG8 に遺伝子変異のない Sprague Dawley ラット⁴³⁾に 100 mg/kg のエルゴステロールを経口投与した研究¹⁷⁾と PK パラメータの値を比較することにした. SHRSP の t_{max} は, 7.0 時間であったが, Sprague Dawley ラットでは 8.0 時間であった. 半減期 ($t_{1/2}$) は, SHRSP では 2.26 時間であったが, Sprague Dawley ラットでは 5.9 時間であった. 一方, C_{max} は SHRSP で 0.552 $\mu\text{g/mL}$, Sprague Dawley ラットで 2.27 $\mu\text{g/mL}$ と報告されており, Sprague Dawley ラットが SHRSP と比較して 4 倍高い結果となった.

これらの結果は, SHRSP と Sprague Dawley ラットのステロール代謝の違いによるものと考えられる. SHRSP は, ABCG5 及び ABCG8 に遺伝子変異があり, 腸管上皮細胞に取り込まれた植物ステロールが腸管腔に戻されない(或いは戻される活性が低下している)ため, おそらく腸管からの植物ステロールの排泄が阻害されている. そのため, 植物ステロールとおそらく同様の挙動をとるエルゴステロールは, ABCG5/G8 が機能している Sprague Dawley ラットと比較して, 血中濃度はより上昇すると考えられる. しかし, SHRSP の ergosterol- d_1 の C_{max} は Sprague Dawley ラットよりも低くなり, 予想とは反対の結果を示した. これには, 消化管の管腔内での腸内細菌による代謝, 小腸上皮細胞内での輸送や代謝, カイロミクロンへの統合, リンパ管から血管への輸送, 組織への分布などの各段階での SHRSP と Sprague Dawley ラットの違いが相加的, 且つ相乗的に反映された結果と考えられる.

in vitro の研究では, ヒト繊維芽細胞においてエルゴステロールは 7-デヒドロコレステロール還元酵素によってブラジカステロールに還元されることが報告されている⁴⁴⁾. よって, SHRSP においても種々の組織で同様の反応が起きている可能性がある. もし腸管上皮細胞内において, 7-デヒドロコレステロール還元酵素の基質になるエルゴステロールが多い(小胞体への輸送活性が高い), 或いは 7-デヒドロコレステロール還元酵素の活性が高いなどの理由で, ブラジカステロールへと還元されるエルゴステロールが増加し, SHRSP で吸収されるエルゴステロールの量は Sprague Dawley ラットに比較して少ないのであれば, C_{max} の違いを説明できる可能性がある. しかし, そのメカニズムを解明するためには, 細胞生物学, 分子生物学的なアプローチによる更なる検討が必要である.

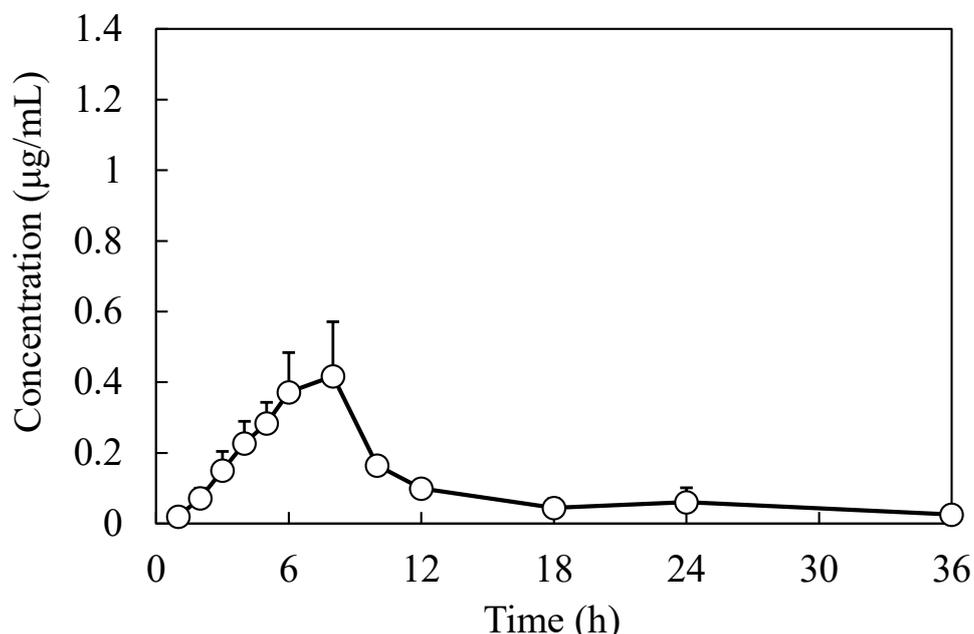


Figure 18 A mean (\pm standard error, SE) serum concentration–time profile of ergosterol- d_1 in the serum of the SHRSP that were administered a single oral dose of 100 mg/kg of ergosterol- d_1 ($n = 4$, solid line). The control ($n=2$) were below the quantitation limit at all time points. A 10 μ L serum sample for the pharmacokinetic study was mixed with 50 μ L of 0.4 μ g/mL 6-ketocholestanol in methanol for the IS and we further added 150 μ L of 1.33 mol/L KOH in methanol. The subsequent preparation of the serum is described in the experimental section. The LC and MS conditions were the same as in Figure 14.

Table 6 Pharmacokinetic (PK) parameters of ergosterol- d_1

Pharmacokinetic parameter	Mean \pm SE ($n = 4$)
$AUC_{0-36\text{ h}}$	$3.88 \pm 1.06 \mu\text{g h mL}^{-1}$
C_{max}	$0.552 \pm 0.138 \mu\text{g mL}^{-1}$
$t_{1/2}$	$2.26 \pm 0.45\text{ h}$
t_{max}	$7.0 \pm 0.6\text{ h}$

次に、ergosterol- d_1 経口投与後の SHRSP の brassicasterol- d_1 の血中濃度-時間曲線を Figure 19 に示す。Brassicasterol- d_1 濃度は、ergosterol- d_1 の経口投与後、18 時間まで時間依存的に上昇し、その後 36 時間まで徐々に減少した。Figure 18 と Figure 19 を重ね合わせたグラフを Figure 20 に示す。Brassicasterol- d_1 の見かけの吸収速度は Ergosterol の吸収速度よりも大きく、一般的な薬物の投与実験とは異なり、投与した化合物よりも代謝物の吸収速度が速いことが分かった。Brassicasterol- d_1 の最高血清濃度は ergosterol- d_1 の 3 倍であり、これまでの定性的な知見²⁰⁾に加え、SHRSP における brassicasterol の生成に関して定量的な結果を得ることができた。津川らの研究¹⁶⁾では、Wistar 系ラットに本研究の約 10 分の 1 の放射標識エルゴステロールの単回投与を行い、エルゴステロールの代謝物の放射活性が 12 時間～24 時間にかけて最大のカウントとなることを示した。しかし、本研究で得られた brassicasterol- d_1 の血中濃度-時間曲線と比較すると、採血時間のポイント数が少なく、定量的な比較は困難である。また、植物の粗抽出物投与後の植物ステロール (β -シトステロール, カンペステロール, ステイグマステロール) の t_{max} は、Sprague Dawley ラットで 0.128 から 72 時間とばらつきがあることが示されている^{38) 45) 46)}。構造は類似していても、エルゴステロールとブラジカステロールの吸収、代謝機構はおそらく異なっており、上述のように細胞実験などを組み合わせた解析が必要と考えられる。

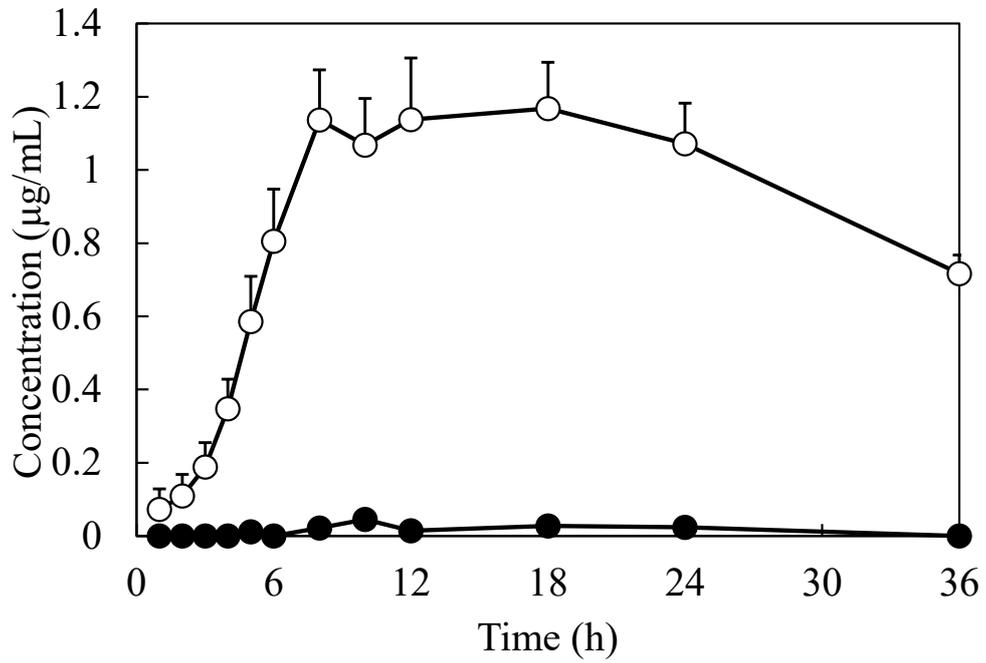


Figure 19 A mean (\pm standard error, SE) serum concentration–time profile of brassicasterol- d_1 in the serum of SHRSP that were administered a single oral dose of 100 mg/kg of ergosterol- d_1 ($n = 4$, ○) or palm oil alone ($n = 2$, ●).

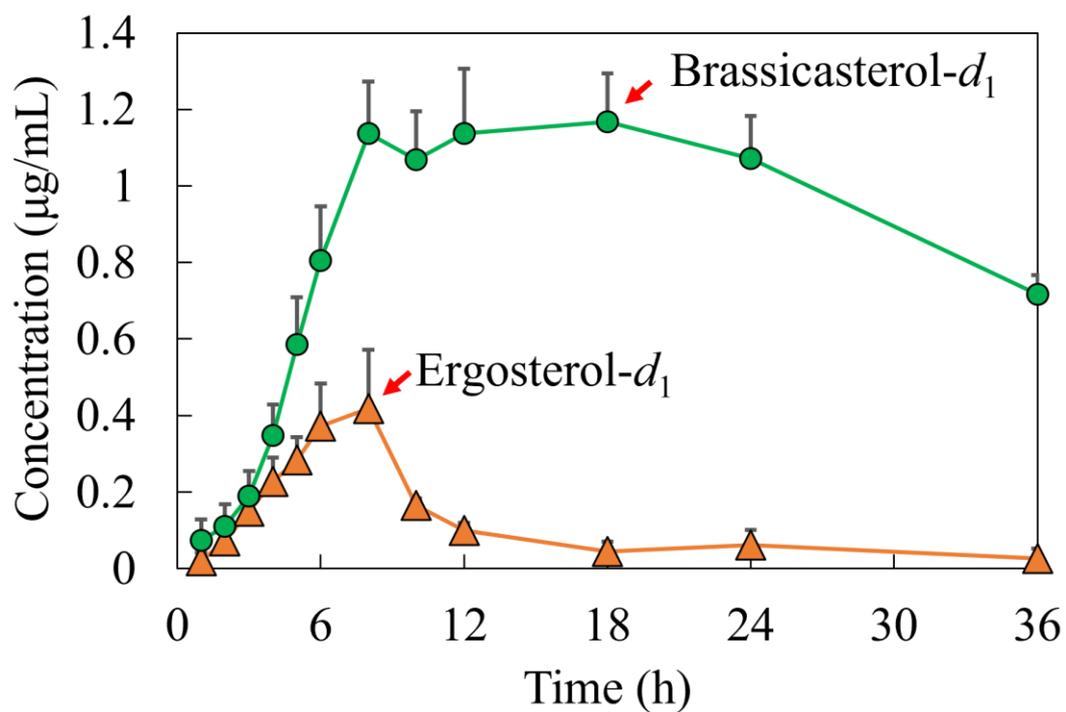


Figure 20 A mean (\pm standard error, SE) serum concentration–time profile of ergosterol-*d*₁ (orange closed triangle) and brassicasterol-*d*₁ (green closed circle) in the serum of SHRSP that were administered a single oral dose of 100 mg/kg of ergosterol-*d*₁.

2-4 小括

本章では、ピコリン酸エステル誘導体化と UHPLC-MS/MS を組み合わせて SHRSP 血清中の ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の高感度定量法を開発した。本法は、少量の血清試料 (10 μ L) から ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 をそれぞれ定量下限 0.02 μ g/mL, 0.04 μ g/mL で測定可能であり、実験動物における血中動態の実験に適用可能な方法であった。次に、ergosterol- d_1 を SHRSP に経口投与し、SHRSP の血中 ergosterol- d_1 の濃度の経時変化を明かにし、一部の薬物動態パラメータを得ることができた。同時に、brassicasterol- d_1 の血中濃度推移を求めることができ、その結果から、brassicasterol- d_1 は SHRSP に経口投与した ergosterol- d_1 の代謝物であることを考察した。Brassicasterol- d_1 の最大血中濃度は ergosterol- d_1 の 3 倍であり、ergosterol- d_1 と異なる血中動態を示すことが示された。

第3章 ISO 11843-7の活用による超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析の精度評価の省力化

3-1 緒言

超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) は、2000年代に上市して以来、その超高压、超高速分離を特長としてハイスループット分析や、理論段数の向上による適用範囲の拡大など、幅広い分野で広く普及するようになった⁴⁷⁻⁵²⁾。

超高速液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析とを組み合わせたUHPLC-MS/MSは、MRMモードを利用することによって、UV検出器よりも広いダイナミックレンジで、高感度に分析できることから食品や生体試料の定量分析におけるゴールドスタンダードと位置付けられるに至っている⁵³⁻⁵⁵⁾。MRMクロマトグラムから正確な定量結果を得るためには、UHPLC-MS/MSにおける精度評価を適切に実施することが重要である。

通常、HPLCにおける精度評価には、繰り返し測定 ($n=5$ または $n=6$) によって統計学的に目的ピークの面積の相対標準偏差 (RSD) を求める⁵⁶⁻⁵⁹⁾。一方、確率論に基づくRSDの算出にFUMI (Function of Mutual Information) 理論を利用できる。FUMI理論は、繰り返し測定を行わず、1本のクロマトグラムを取得し、そのベースラインノイズの確率論的な挙動から、ノイズの標準偏差 (SD) を予測する関数を与える。FUMI理論は国際標準化機構の定める国際規格のうちISO 11843 part 7 (ISO 11843-7:2018, "Methodology based on stochastic properties of instrumental noise") に記載されており、FUMI理論によって得られたノイズのSDは、ピーク面積などの情報があれば検出限界の算出に利用できる。したがって、ISO 11843-7に基づき、一回のクロマトグラム測定から目的ピークの面積や高さのRSDを確率論的に推定することが可能である。

現在までに、ISO 11843-7による精度評価は、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)、UV検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV)、電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD)、示差屈折率検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-RI) の精度評価へ適用されている⁶⁰⁻⁶⁶⁾。UHPLC-MS/MSの精度評価やMRMクロマトグラムのピーク面積のRSDの決定にISO 11843-7を適用できるかどうかは、まだ実証されていない。もしISO 11843-7でUHPLC-MS/MSの精度評価ができれば、UHPLC-MS/MSシステムのバリデーションに必要な実験時間、薬品の使用量などのリソースを減らすことができる。

そこで本章では、ISO 11843-7が、UHPLC-MS/MSシステムにおける装置の精度評価に適用できることを示すため、2章で取り扱ったエルゴステロールをピコリン酸エステル誘導体化したピコリン酸エステル化エルゴステロール (Erg-PE)

を測定対象として用い、MRM クロマトグラムの測定を行った。次に、ISO 11843-7 において表記されていないデータのデジタル処理やサンプリング速度などを検討し、これらが ISO 11843-7 による UHPLC-MS/MS の精度評価に及ぼす影響を明らかにした。

3-2 実験材料・方法

3-2-1 ピコリン酸エステル化エルゴステロールの UHPLC-MS/MS

UHPLC-MS/MS の精度評価は、ピコリン酸エステル化エルゴステロール (Erg-PE) を測定対象として扱った。UHPLC-MS/MS システムは、UHPLC 部にポンプ (quaternary solvent manager)、オートサンプラー (sample manager)、ODS カラム (Acquity UPLC BEH C18, 150×2.1 mm, i.d., 1.7 μm, Waters)、カラムオーブン (column heater) から構成される Acquity UPLC™ H-class System、MS/MS 部にイオン源をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) イオン源とする Xevo TQD 質量分析計を組み合わせた Waters 製のものを用いた。

移動相には、メタノール-水-酢酸 (950 : 50 : 1, v/v/v) 混液を用い、0.4 mL/min の流速で送液した。カラム温度は 50°C、注入量は 2 μL に設定した。Erg-PE の MS 条件は Intellistart®ソフトウェア (Waters 製) を用いて最適な MRM 条件を導出し、プリカーサーイオンを m/z 524.26、プロダクトイオンを m/z 145.95、コーン電圧を 82 V、コリジョン電圧を 16 V に設定した。MRM のサンプリング速度は 10 points/s に設定した。

ピコリン酸エステル化エルゴステロール (Erg-PE) は、エルゴステロール 103 mg を出発物質として 2 章の方法 (2-2-3-4) で反応させて粗生成物を得た。得られた粗生成物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、Erg-PE 106 mg を得た。シリカゲルクロマトグラフィーによる分画は、移動相に酢酸エチルを用い、検出波長 282 nm で行った⁴¹⁾。Erg-PE の純度は、多波長検出 HPLC (HPLC-PDA) で検出されたピーク面積値より、95%以上であることを確認した。Erg-PE は 2-プロパノールに溶解し、最終濃度 0.1 g/L のストック溶液を調製した。その後、このストック液をメタノールと水の混液 (95:5, v/v) で適切に希釈し、標準溶液を調製した。

繰り返し測定は、同一濃度の標準溶液を複数回測定し、各クロマトグラムのピーク面積から RSD を算出した。積算で使用するクロマトグラムは、同一濃度の標準溶液を複数回測定し、Excel 365 (Microsoft) によって処理した。

3-2-2 エルゴステロールの UHPLC-UV

UHPL-UV の精度評価は、エルゴステロールを測定対象として扱った。エルゴ

ステロールの UHPLC-UV システムは、ポンプ (binary solvent manager), オートサンプラー (sample manager), ODS カラム (Acquity UPLC BEH C18, 150×2.1 mm, i.d., 1.7 μm, Waters), カラムオーブン (high temperature column heater) 及び UV 検出器 (tunable ultraviolet detector) からなる Waters 製のものをを用いた。

移動相にはアセトニトリル-メタノール-酢酸 (50:50:0.1, v/v/v) 混液を用い、流速 0.2 mL/min で送液した。カラム温度は 30°C, 注入量は 10 μL, 検出波長は 280 nm に設定した。クロマトグラムのデジタルデータを記録するためのサンプリング速度は、2, 5, 10, 20, または 40 points/s のいずれかに設定した。また、サンプリング速度を 20 point/s とした時、UV 検出器のノイズフィルタのカットオフ周波数は 4, 2, 1 Hz のいずれかに設定した。

エルゴステロール (> 98%) は 2-プロパノールに溶解して 0.1 g/L の標準原液を調製した。これをアセトニトリル-メタノール-酢酸 (50:50:0.1, v/v/v) 混液で希釈して標準溶液を調製し、その 10 μL を UHPLC-UV に注入した。

繰り返し測定は、同一濃度の標準溶液を複数回測定し、各クロマトグラムのピーク面積から RSD を算出した。

3-2-3 ソフトウェア

ベースラインノイズのパワースペクトルを得るための高速フーリエ変換 (FFT) と ISO-11843-7 に基づく一連の解析には、May 2000 (林純薬工業, 大阪) を用いた。

また、UHPLC-MS/MS において MRM クロマトグラムの取得及び移動平均に基づくデジタル処理には、Masslynx 4.1 (Waters) を使用した。MRM クロマトグラムの積算には、Excel 365 (Microsoft) を使用した。

3-3 ISO 11843-7に基づく精度評価の概要

ISO 11843-7 では、クロマトグラム上のベースラインを確率過程であるホワイトノイズとマルコフ過程の和で近似し、ノイズの標準偏差 (S_B) を決定している^{65, 67)}。

すなわち、ベースラインノイズの確率論的性質を明らかにするために、ベースラインノイズのパワースペクトル解析を次のように行う。クロマトグラム上の1000 points 以上の連続したデジタルデータを高速フーリエ変換し、実測パワースペクトルを得る。この実測パワースペクトルに、Eq. 1 の理論パワースペクトルを最小二乗フィッティングさせて3つのノイズパラメータ (\tilde{w} : ホワイトノイズのSD, \tilde{m} : マルコフ過程のSD, ρ : 自己相関係数) を決定する⁶⁵⁾。

$$P(f) = \frac{\tilde{m}^2}{1-\rho^2} \times \frac{2\alpha}{\alpha^2 + 4\pi^2 f^2} + \tilde{w}^2$$

Eq. 1

ここで、 f は周波数、 $\alpha = (1-\rho) \times t$, t はサンプリング速度である。

次に、パワースペクトル解析で得られたノイズパラメータを Eq. 2 に代入して、 S_B を求める⁶⁸⁾。

$$S_B^2 = k_e \tilde{w}^2 + \frac{\tilde{m}^2}{(1-\rho)^2} \left(k_e - 2\rho \frac{1-\rho^{k_e}}{1-\rho} + \rho^2 \frac{1-\rho^{2k_e}}{1-\rho^2} \right) + \beta^2 \tilde{w}^2$$

$$+ \tilde{m}^2 \left[\beta^2 \frac{1-\rho^{2k_e}}{1-\rho^2} - 2\beta \sum_{i=1}^{k_e} \left(\rho^{k_e-i} \cdot \frac{1-\rho^{k_e+1-i}}{1-\rho} \right) \right]$$

Eq. 2

ここで、 $\beta = (k_e + 1)/2$, k_e は積分区間とする。

したがって、ピーク面積 A の RSD は Eq. 3 より求められる。

$$\text{RSD}^2 = \frac{S_B^2}{A^2} + I^2$$

Eq. 3

ここで、 I はオートサンプラーの注入誤差などの独立誤差の RSD である。

3-4 結果と考察

3-4-1 MRM クロマトグラムのピーク面積の RSD の算出

Figure 21 は、サンプリング速度 10 points/s で測定した Erg-PE (50 $\mu\text{g/L}$) の MRM クロマトグラムである。Erg-PE のピークは、保持時間 5.6 min に出現し、そのピーク幅は 9.8 s (=98 point)、半値幅は 3.0 s (=30 point) であった。ISO 11843-7 において、 \tilde{w} , \tilde{m} , ρ の 3 つのノイズパラメータを決定するために利用するパワースペクトルは、クロマトグラムのベースライン上の 2nd ポイントの連続したデジタルデータを高速フーリエ変換することで取得している。その後、この実測パワースペクトルに理論パワースペクトル (Eq.1) を最小二乗フィッティングさせるパワースペクトル解析によって、ノイズパラメータ (\tilde{w} , \tilde{m} , ρ) が決定される。Figure 22 (青線) に示したパワースペクトルは、Figure 21 のクロマトグラムのベースライン上の 1024 points のデジタルデータを高速フーリエ変換して得た実測パワースペクトルである。Figure 22 (橙線) は Figure 21 の理論パワースペクトル (Eq. 1) を表す。Figure 22 に示すように実測パワースペクトルと理論パワースペクトルは良好なフィッティングを示した。この結果より、MRM クロマトグラム上のベースラインノイズが ISO 11843-7 で扱う確率過程で表せること、スペクトル解析により適切なノイズパラメータが得られることが示された。

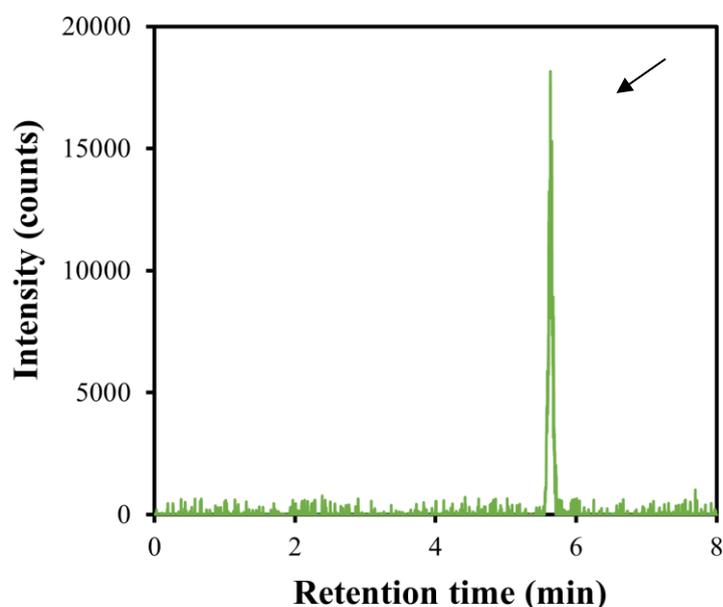


Figure 21 A MRM chromatogram of Erg-PE (50 $\mu\text{g/L}$) obtained from the LC-MS/MS. Arrow indicates the peak of Erg-PE.

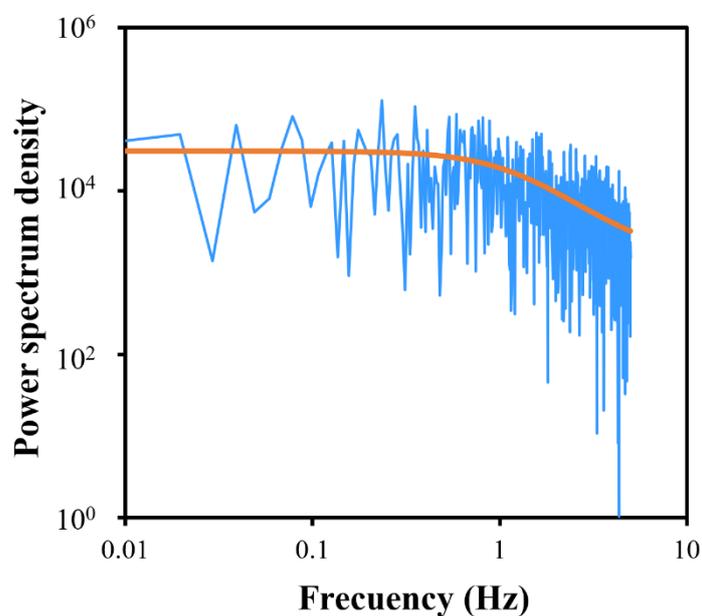


Figure 22 The power spectrum of baseline noise obtained from a multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram. By Fourier transform, a real power spectrum (light blue) was obtained from the consecutive digital data (1024 points) in the baseline. The best fit of the theoretical power spectrum based on the Function of Mutual Information (FUMI) theory (white noise + the Markov process) with the real power spectrum (light blue) is indicated by the orange line.

次に、Eq. 2 及び Eq. 3 に各パラメータを代入して、MRM クロマトグラム上の Erg-PE のピーク面積の RSD を求めた。Figure 23 (○) では、Erg-PE の各濃度における繰り返し測定 ($n=6$) によって求めた RSD をプロットし、各々の RSD の 95%信頼区間をエラーバーで示した。繰り返し測定によるピーク面積の RSD の 95%信頼区間 ($n=6$) は、カイ二乗分布に基づき $\chi_{0.025}^2(5)$ 及び $\chi_{0.975}^2(5)$ とした。更に、Figure 23 には、ISO 11843-7 によって推定された RSD を実線でプロットした。ISO 11843-7 によるピーク面積の RSD は、いずれの濃度においても、繰り返し測定によるピーク面積の RSD の 95%信頼区間の範囲内であった。このことから、ISO 11843-7 は繰り返し測定を実施せずに Erg-PE の MRM 測定における UHPLC-MS/MS システムの精度評価に適用可能であることが示された。

Figure 23 では、定量限界に近い低濃度域での UHPLC-MS/MS における Erg-PE の精度プロファイルを検討した。低濃度域 (10, 20, 50 $\mu\text{g/L}$) ではベースラインノイズの変動がピーク面積のばらつきに大きく影響するため、ピーク面積の RSD には Eq. 2 及び Eq. 3 に示した S_B が大きく寄与する。一方、高濃度域 (例えば RSD < 1%) では、ベースラインノイズの変動と比較して、イオン化効率、マトリックス効果、注入量誤差がピーク面積のばらつきに主に影響すると考えられる。すなわち、Eq. 3 における I がピーク面積の RSD に大きく寄与する。精度プロファイルが適切に得られなかった理由として、本研究で利用した MS/MS は 2 つの四重極とコリジョンセルが直列に接続されているため、UV 検出器などと比較して機器由来のノイズが小さいためと考えられる。また、このノイズの小ささが質量分析計のダイナミックレンジの広さに影響していると考えられる。ISO 11843-7 をダイナミックレンジの広い装置に適用する際には、クロマトグラムの S/N 比を確認し、高濃度域か低濃度域か確認する必要がある。したがって、高濃度域において LC-MS/MS の精度評価を実践するには、イオン化効率などの上記要因の不確かさを推定するために、繰り返し測定をする必要がある。一方、低濃度域において UHPLC-MS/MS の精度評価を行う場合、ISO 11843-7 によれば、1 本の MRM クロマトグラムのからピーク面積の RSD を求めることができる。Figure 23 に示すように、3 濃度におけるピーク面積の RSD ($n=6$) を繰り返し測定で得るには、144 min の測定時間が必要となる。一方、ISO 11843-7 によると、Erg-PE の 1 本のクロマトグラム (測定時間 8 min) から、Figure 23 (実線) に示すように測定していない濃度も含めた広い濃度範囲の精度プロファイルが得られた。

このように、ISO 11843-7 の活用によって、繰り返し測定の実施を回避できるので、クロマトグラム測定に要する化学物質、測定時間などのリソースを削減でき、UHPLC-MS/MS の精度評価を省力化できることが示された。

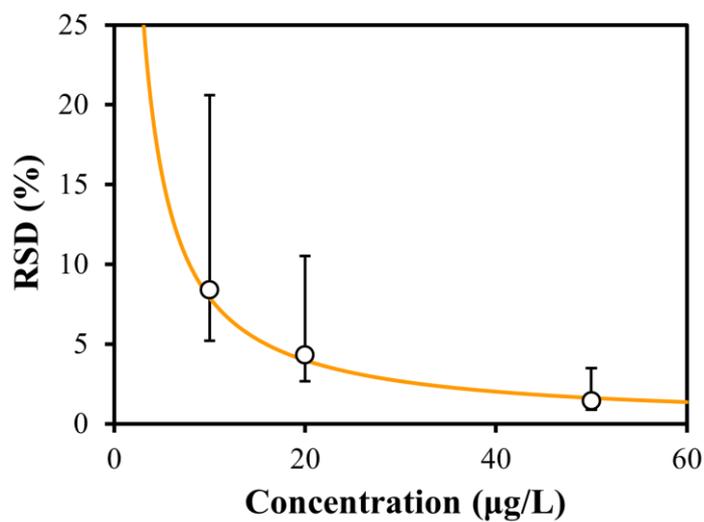


Figure 23 Precision profiles of Erg-PE obtained from multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms. Open circles indicate the relative standard deviations (RSDs) of peak areas that have been estimated by repetitive measurements ($n = 6$ each). Error bars indicate the 95% confidence bands of the RSDs by repetitive measurements. The solid line denotes the RSDs of the peak area estimated by ISO 11843-7 ($n = 1$)

3-4-2 S_B の算出における必要最小限のデータポイント数 (n) の検討

ISO 11843-7に基づき、ベースラインノイズのSDを算出するには、実験者によってパワースペクトル解析に用いるデータポイント数を決定する必要がある。ISO 11843-7による解析に使用するパワースペクトルが、十分な数の連続したデジタルデータから得たものであれば、信頼性の高いノイズパラメータを算出することができる。しかし、UHPLCによる分析の場合、測定時間の短いクロマトグラムが解析対象となることから、適切なパワースペクトル解析を行うための十分な数のデジタルデータが取得可能か危惧される。本研究で用いたUHPLC-MS/MSにおいて設定できるサンプリング速度は最大10 points/sである。将来、演算処理能力の向上により、さらにサンプリング速度が速いUHPLC-MS/MSの出現が予想される。実際、UHPLC-UVにおいては既に1~80 points/sのサンプリング速度を設定できるものが製品化されている。そこで、本節では、UHPLC-MS/MSよりも速いサンプリング速度でデジタルデータの取得が可能なUHPLC-UVを用いることによって適切なパワースペクトル解析を行うために要求される、必要最小限のデジタルデータポイント数について検討した。精度の評価は、3-4-1節と同様の方法で実施した。

Figure 24Aには、エルゴステロールのUHPLC-UVで測定した8192 pointsのベースラインを示した。このベースラインは、サンプリング速度40 points/sで取得したため、約3.4 minの測定を要した。この8192 pointsのベースラインを高速フーリエ変換したところ、Figure 24B（緑線）で示す実測パワースペクトルが得られた。実測パワースペクトルに最小二乗フィッティングさせた理論パワースペクトルをFigure 24B（赤線）に示した。Figure 24Bのように、実測パワースペクトルと理論パワースペクトルのフィッティングは、広い周波数領域にわたって良好であった。Figure 24Bのパワースペクトル解析によって求めた S_B の値は 1.69×10^{-4} であった（Table 7）。同様に、4096, 2048, 1024, 512 pointsの連続したデジタルデータのパワースペクトル解析の結果をそれぞれFigure 24C-Fに示した。いずれにおいても実測パワースペクトル（緑線）と理論パワースペクトル（赤線）のフィッティングは良好であった。また、Figure 24C-Fのパワースペクトル解析で求められた S_B の値は、それぞれ 1.68×10^{-4} , 1.69×10^{-4} , 1.68×10^{-4} , 1.93×10^{-4} であった。512 pointsのベースラインのパワースペクトル解析によって求めた S_B の値は、4096, 2048, 1024 pointsのベースラインより得たものに比べてかけ離れた値であった。これは、Figure 24Fに示す通り、0.01 Hz以下の周波数領域における実測パワースペクトルが、デジタルデータ数の不足により取得できず、この周波数領域を含めた適切なノイズの S_B でなかったためと考えられた。

これらのことから、1024 pointsの連続したデジタルデータを用いたパワース

ペクトル解析が行えれば, UHPLC-UV システムのベースラインより, 適切なノイズパラメータと S_B が得られることが分かった.

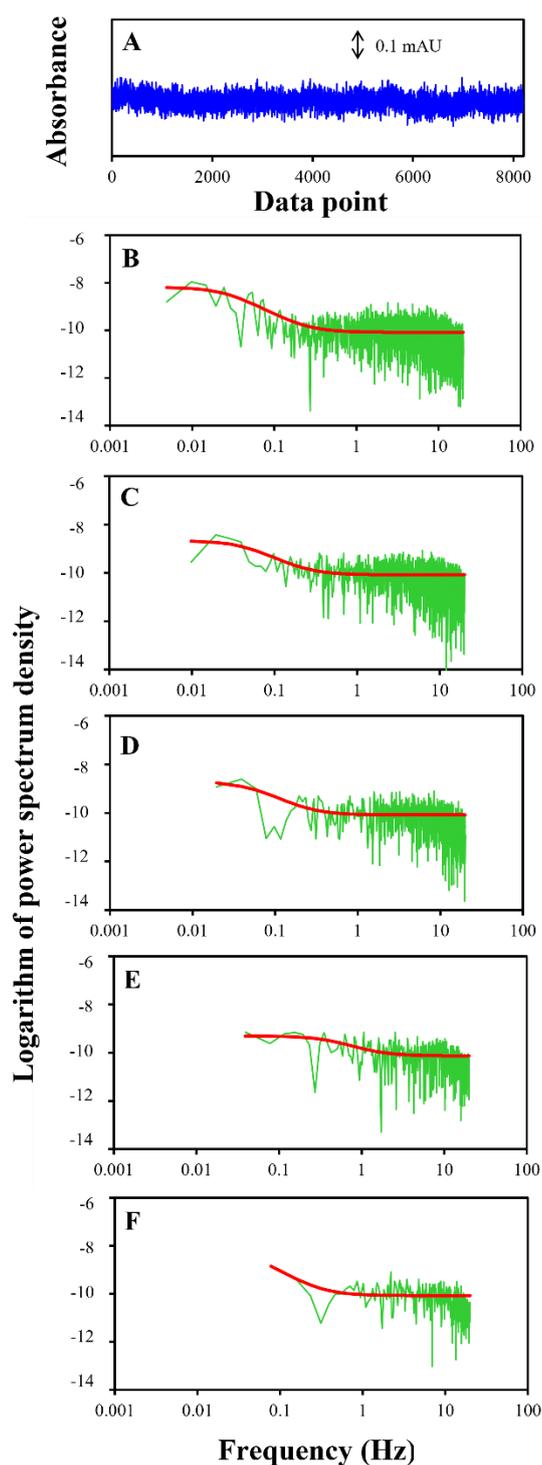


Figure 24 (A) Chromatographic baseline of the UHPLC-UV system and (B-F) power spectra of the baseline. The sampling rate was set at 40 points/s to record the digital data of the baseline. (B-F) By the fast Fourier transform, the consecutive baseline data of (B) 8192, (C) 4096, (D) 2048, (E) 1024, and (F) 512 points transferred to the real power spectrum, and they are shown by the zigzag line. The theoretical power spectra based on Eq. (1) are shown by the smooth line.

Table 7 The SDs created by baseline noise (S_B) obtained using various numbers of data points on chromatogram by UHPC-UV.

Numbers of data points ^a	Measurement time (min)	S_B
8192	3.41	1.69×10^{-4}
4096	1.71	1.68×10^{-4}
2048	0.85	1.69×10^{-4}
1024	0.43	1.68×10^{-4}
512	0.21	1.93×10^{-4}

^a Chromatographic baseline noises were recorded at sampling rate of 40 points/s.

3-4-3 精度評価におけるサンプリング速度の検討

クロマトグラムを記録するためのサンプリング速度を速く設定すると、クロマトグラムのデジタルデータのファイル容量が大きくなり、その保存には記憶媒体の大きな記憶容量を占めてしまう。これに対し、サンプリング速度の設定を遅くすると、クロマトグラムのピークやベースラインの形状が荒くなる。そのため、明瞭なクロマトグラムの取得や正確なピーク面積の測定が困難となる。また、短い測定時間でクロマトグラムを得る UHPLC の場合、適切なパワースペクトル解析を行うためのデジタルデータ数が不足してしまう。そこで、ISO 11843-7 を活用した精度評価に適するサンプリング速度を検討した。

Figure 25 は、サンプリング速度を 20 points/s で測定したエルゴステロール (1 mg/L) の UHPLC-UV クロマトグラムである。エルゴステロールのクロマトグラムは保持時間 8.3 min にピークが観測され、そのピーク幅は 24 s であった。エルゴステロールのピーク面積は、0.01 mg/L から 0.5 mg/L の範囲で良好な直線性を示した ($r=0.998$)。Figure 25 (点線枠) に示すように、実測パワースペクトルを得るための 1024 points の連続したデジタルデータは、試料注入後 10 min 以降より取得したものをを用いた。したがって、クロマトグラムをサンプリング速度 2, 5, 10, 20, 40 points/s で記録した場合には、実測パワースペクトルを得るには、それぞれ約 8.6, 3.5, 1.7, 0.85, 0.43 min のベースラインノイズの測定が必要であった。

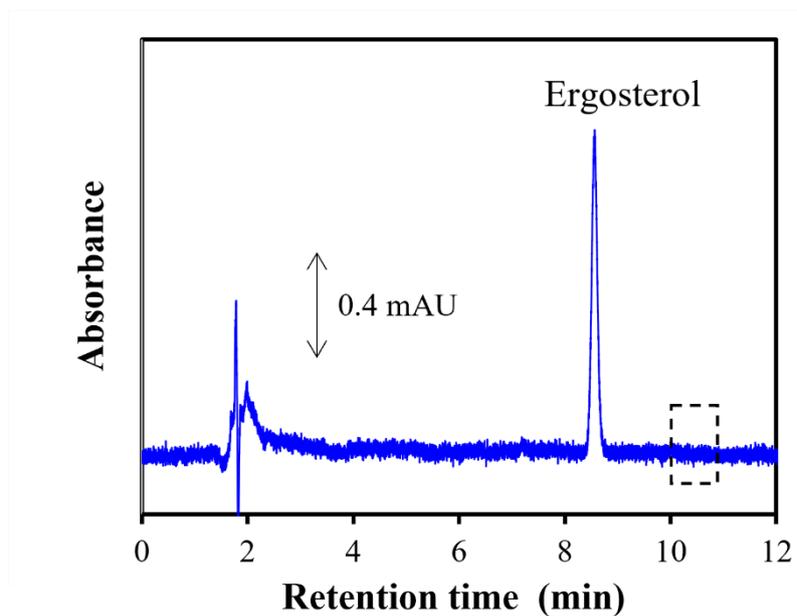


Figure 25 Chromatogram of ergosterol at 0.1 mg/L obtained by the UHPLC-UV system. The chromatogram was recorded at a sampling rate of 20 points/s. As shown in the dashed box, the measurement of consecutive baseline data of 1024 points started at 10 min after the sample injection.

パワースペクトル解析により，サンプリング速度を 2, 5, 10, 20, 40 points/s に設定して得られた 1024 points の連続したデジタルデータから， S_B を求めた。 S_B の各値と 0.1 mg/L エルゴステロールのピーク面積を Eq. 3 に代入してピーク面積の RSD を算出し，Figure 26 (□) にプロットした．サンプリング速度を 2, 5, 10, 20, 40 points/s に設定したとき，RSD はそれぞれ 2.6%, 2.3%, 2.4%, 2.1%, 2.9%であった．更に，Figure 26 (○) には，繰り返し測定 ($n=6$) によって求めた RSD をプロットし，各々の RSD の 95%信頼区間をエラーバーで示した．ISO 11843-7 によって求めた RSD は，繰り返し測定によって求めた RSD の 95%信頼区間の範囲内であった．この結果より，ISO 11843-7 を活用することで，UHPLC-UV システムの精度評価を行えることが示された．

また，Figure 26 に示すように，95%信頼区間が部分的に重なっていることを考慮すると，検討したサンプリング速度における RSD 間には有意な差は認められないと考えられた．したがって，ISO 11843-7 による精度評価は，UHPLC-UV システムのサンプリング速度の影響を受けず行えることが示された．繰り返し測定

($n=6$) で得られる SD の 95%信頼区間は、母標準偏差に対して±60%の範囲にあるのに対し、ISO 11843-7 で得られた SD の 95% CI は、母標準偏差に対して±21%の範囲にある。よって、ISO 11843-7 によれば、1 回のクロマトグラムから信頼性の高い SD 及び RSD を得ることができる。

サンプリング速度を遅くすると、クロマトグラムの各データポイントの間隔が広がるため、クロマトグラムのピークやベースラインの形状が荒くなり、 S_B を求めるために十分な数のデジタルデータを得るには長い測定時間が必要となる。例えば、5 points/s でクロマトグラムを記録する場合、 S_B を求めるための 1024 points を得るには、クロマトグラム上のピーク観測の時間を除いて約 3.5 min のベースラインノイズを測定しなければならない。コンベンショナルカラムを用いる HPLC システムでは、通常約 20 min 以上クロマトグラムを測定するため、 S_B を決定するのに十分な数の連続したデジタルデータを容易に得ることができる。これに対し、UHPLC-UV では、クロマトグラムを得るための測定時間が大幅に短縮され、 S_B を求めるための連続したデジタルデータを蓄積するための測定時間の短縮が望まれている。

エルゴステロールの UHPLC-UV システムにおいて、サンプリング速度は 20 points/s を選定した。これは、ISO 11843-7 に基づく精度評価を行うためにクロマトグラムの測定時間を短縮できること、ベースラインを 1 min 程度測定すれば S_B を決定するためのデータが 1024 points 得られること、エルゴステロールのピークは 480 points のデジタルデータ (=20 points/s×24 s) からなるためピーク面積を求めるために明瞭なクロマトグラフを取得できることが理由である。

もし、UHPLC における仕様により、他のサンプリング速度を設定したい場合、ベースラインから 1024 points のデジタルデータを得るために必要な測定時間(t_B , min) は次式で求められる。

$$t_B = 1024 \text{ (points)} / \text{サンプリング速度 (point/s)} / 60 \text{ (s)}$$

Eq. 4

したがって、クロマトグラムの測定時間が短い場合、1024 points の連続したデジタルデータを得るためにサンプリング速度を速くすることで対処可能になる。

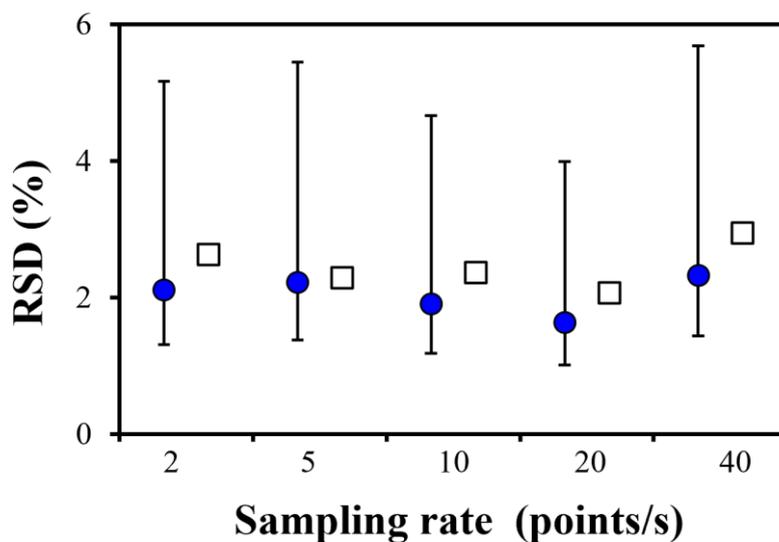


Figure 26 Comparisons of RSDs of peak area at 0.1 mg/L ergosterol obtained from chromatograms measured under various sampling rates. The RSDs obtained by repetitive measurements ($n = 6$) and their 95% confidence intervals are indicated by closed circles and error bars, respectively. The RSDs obtained by the ISO 11843-7 are indicated by open squares.

3-4-4 UHPLC-UV の精度評価におけるノイズフィルタ処理の影響

クロマトグラムのデジタル処理の1つにノイズフィルタ処理がある。UV 検出器，蛍光検出器，電気化学検出器などの HPLC 用の検出器に広く搭載されている。すなわち，ノイズフィルタ処理によって，設定したカットオフ周波数より高周波数のノイズを顕著に低減することができる。LC-MS では，フィルタ機構が搭載されているが，検出器内に搭載されているデジタル処理についてはブラックボックス化されていることがほとんどである。もし，測定したクロマトグラムにノイズフィルタ処理が行われている場合，ISO 11843-7 による精度評価において，ベースラインから適切なノイズパラメータが算出されないことが危惧される。実際，通常 HPLC の UV 検出器には，ベースラインノイズのスムージング，S/N 比の向上を目的としてノイズフィルタが搭載されている。今回使用した UHPLC-UV システムにも搭載されており，サンプリング速度を 20 points/s としたとき，カットオフ周波数 4 Hz, 2 Hz, 或いは 1 Hz のノイズフィルタを設定できる。ISO 11843-7 による精度評価では，ノイズフィルタ処理したベースラインから適切な S_B を決定できるかどうか実証されていない。そこで，ノイズフィルタを搭載した UHPLC-UV において，ISO 11843-7 に基づく精度評価が実践可能か検討した。

Figure 27 には，20 point/s で測定した UHPLC-UV のベースラインのパワースペクトルを示した。Figure 27A には，ノイズフィルタ処理を行わなかった場合のベースラインの実測パワースペクトルを示した。Figure 27B, C, D には，それぞれカットオフ周波数 4 Hz, 2 Hz, 及び 1 Hz のノイズフィルタで処理したベースラインの実測パワースペクトルを示した。ノイズフィルタ処理によって，Figure 27B の実測パワースペクトルでは 4 Hz, Figure 27C の実測パワースペクトルでは 2 Hz, Figure 27D の実測パワースペクトルでは 1 Hz より高周波側のパワースペクトル密度が顕著に小さくなることが認められた。Figure 27B-D の各実測パワースペクトルに，理論パワースペクトルを最小二乗フィッティングさせたところ，カットオフ周波数より低周波側において両者のフィッティングは良好であった。一方，理論パワースペクトルは，実測パワースペクトルのカットオフ周波数より高周波側では，解離していた。理論パワースペクトルは，確率過程の SD (\tilde{w} と \tilde{m}) を含む式で表される。ノイズフィルタのカットオフ周波数と，誤差の伝播則を考慮すると，カットオフ周波数より高周波側，すなわち実測パワースペクトルのパワースペクトル密度が小さい周波数領域における実測パワースペクトルと理論パワースペクトルの解離は無視できると考えられる。そこで，Figure 27 に示したスペクトル解析より，ノイズパラメータと S_B が求められると考え，これらの値を用いてノイズフィルタ処理されたクロマトグラム上のピーク面積の RSD を求めた。

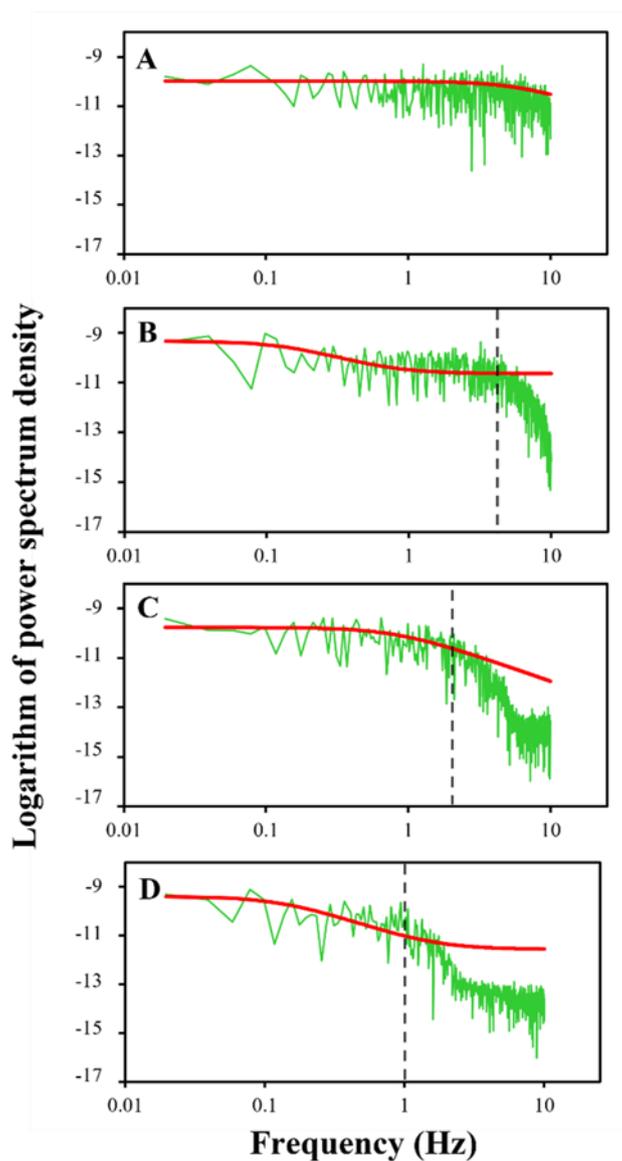


Figure 27 Power spectra of baseline obtained by the UHPLC-UV without and with noise filter processing. The sampling rate was set at 20 points/s to record the digital data of the baseline (A) without and with noise filter processing of a cut-off frequency at (B) 4 Hz, (C) 2 Hz, and (D) 1 Hz, respectively. By the fast Fourier transform, the consecutive baseline data of 1024 points transferred to the real power spectrum, and they are shown by a zigzag line. The theoretical power spectra based on Eq.1 are shown by the smooth line. Each cut-off frequency of the filter processing is shown by the dotted line.

ISO 11843-7 と繰り返し測定によって、4 Hz, 2 Hz, 1 Hz のカットオフ周波数でノイズフィルタ処理したクロマトグラムから 0.1 mg/L エルゴステロールのピーク面積の RSD を求め、それを Figure 28 にプロットした。ISO 11843-7 で求めたピーク面積の RSD は、繰り返し測定で求めた RSD の 95% CI の範囲内であった。

これらの結果から、検討したカットオフ周波数でノイズフィルタ処理されたクロマトグラムを用いても、ISO 11843-7 により UHPLC-UV の精度評価が行えることを示した。

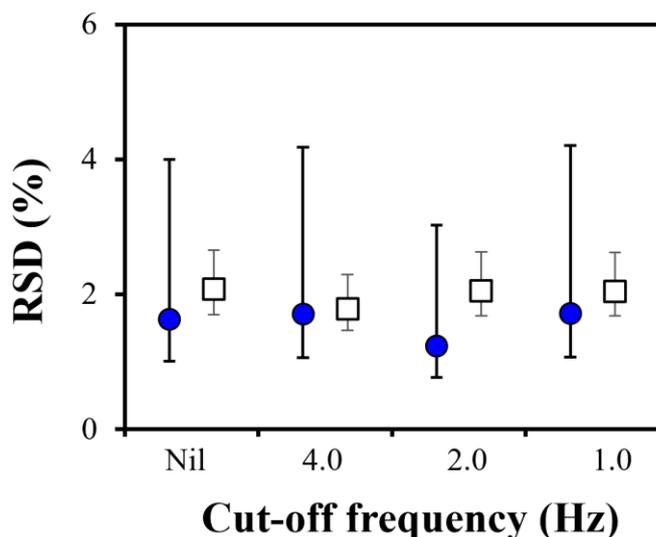


Figure 28 Comparisons of RSDs of the peak area at 0.1 mg/L ergosterol obtained from chromatograms measured without and with noise filter processing at each cut-off frequency. The RSDs obtained by repetitive measurements ($n = 6$) and their 95% confidence intervals are indicated by closed circles and the error bars, respectively. The RSDs obtained by the ISO 11843-7 are indicated by open squares with the 95% confidence intervals for RSD estimate from 41 repetitive measurements by the error bars.

3-4-5 UHPLC-MS/MS の精度評価における移動平均の影響

3-4-4 では、クロマトグラムのデジタル処理について検討し、UV 検出器のノイズフィルタ処理の有無にかかわらず ISO-11843-7 によって精度評価できることが分かった。UV 検出器では、測定と同時に適切なノイズフィルタのデジタル処理を行うが、質量分析計では測定データが膨大となるため、得られた生データに対し、測定後にベースラインノイズのスムージング処理（後処理）をすることで S/N 比を向上させる。通常、スムージング処理には、移動平均法によるデジタル処理が行われ、実験者によってスムージング処理条件が選定される。よって、ISO-11843-7 における精度評価におけるスムージング処理の影響を明らかにすることは極めて重要である。

時系列 t における MRM クロマトグラムの信号強度を Y_t とすると、 $t=1$ から n ポイントまで測定した MRM クロマトグラム $\{Y_t\}$ は Eq. 5 のように表される。

$$\{Y_t\} = \{Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5 \dots, Y_n\}$$

Eq. 5

例えば、この MRM クロマトグラム $\{Y_t\}$ を 5 points で移動平均を行うと、スムージングされた MRM クロマトグラム $\{Y'_t\}$ は、Eq. 6 のように表される。

$$\{Y'_t\} = \{Y'_3, Y'_4, Y'_5, Y'_6, Y'_7 \dots, Y'_{n-2}\}$$

Eq. 6

したがって、 $t=3$ における Y'_3 は Eq. 6a、 $t=n-2$ における Y'_{n-2} は Eq. 6b で表される。

$$Y'_3 = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5}{5}$$

Eq. 6a

⋮

$$Y'_{n-2} = \frac{Y_{n-4} + Y_{n-3} + Y_{n-2} + Y_{n-1} + Y_n}{5}$$

Eq. 6b

Figure 29A には移動平均をしていない Erg-PE の MRM クロマトグラムを示した。これを 5 points で移動平均すると Figure 29B が、25 points で移動平均すると Figure 29C に示すスムージングされた MRM クロマトグラムが得られた。MRM クロマトグラムのベースラインノイズはそれぞれの Figure の中に拡大して示した。Figure 29B と Figure 29C を比べると、移動平均するポイント数の大きい方が、ノイズが滑らかであり、信号強度及びピーク高さが低下していた。Figure 29C では、移動平均により、ベースラインノイズの強度が元の MRM クロマトグラム (Figure 29A) に比べて約 6 分の 1 に、Erg-PE の MRM ピーク面積は約 2 分の 1 となった。

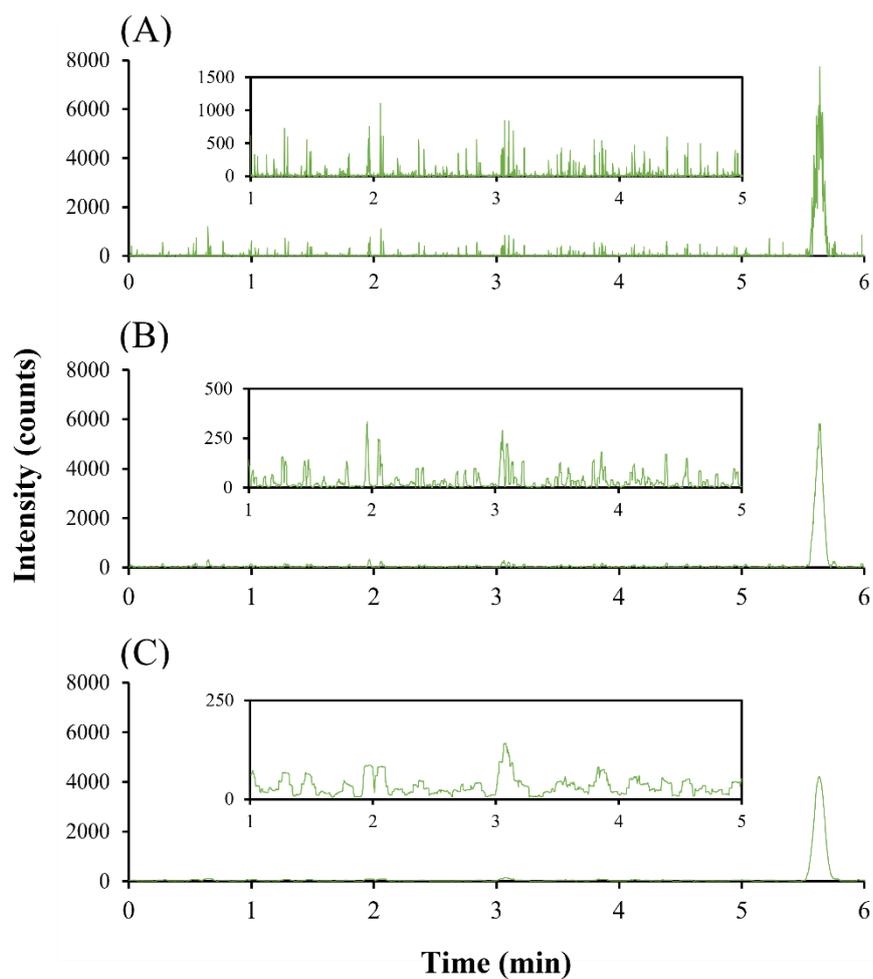


Figure 29 MRM chromatograms processed (A) without and (B and C) with moving average smoothing. Moving average smoothing is processed for (B) 5-point and (C) 25-point windows. Expanded baselines are shown in each figure. Erg-PE at 20 $\mu\text{g/L}$ was injected into the LC-MS/MS system.

Figure 30 には、移動平均を行っていない MRM クロマトグラムと、行った場合の MRM クロマトグラム (20 µg/L Erg-PE) を用いて得たピーク面積の RSD をプロットした。Figure 30(○)は繰り返し測定 ($n=6$) で求めたピーク面積の RSD, Figure 30 (□) は ISO 11843-7 で求めたピーク面積の RSD を示した。3 points, 5 points, 15 points の幅で移動平均した MRM クロマトグラムの場合、ISO 11843-7 で求めたピーク面積の RSD は、繰り返し測定で求めたピーク面積の RSD の 95%信頼区間の範囲内にあった (Figure 30)。しかし、25 points の幅で移動平均した MRM クロマトグラムの場合、ISO 11843-7 で求めたピーク面積の RSD は、繰り返し測定で求めたピーク面積の RSD の 95%信頼区間の範囲外にあった (Figure 30)。25 points の幅は、Erg-PE ピークの半値幅 (Figure 21 では 30 points) に近い値であった。またこれより、ISO 11843-7 に基づく確率過程でベースラインノイズを近似する場合、幅広いデータポイント (半値幅など) で移動平均したベースラインノイズは適用できないことが分かった。したがって、ISO 11843-7 による UHPLC-MS/MS の精度評価において、移動平均した MRM クロマトグラムを適用する場合は、狭いデータポイント幅 (例えば、5 points の幅は Erg-PE のピーク幅の 6 分の 1 程度) で処理したものを扱う必要があることが明かとなった。

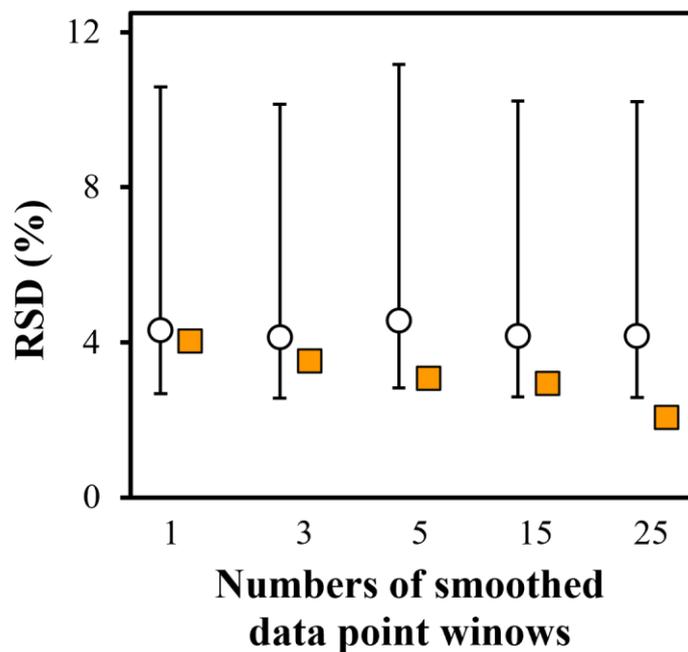


Figure 30 Effects of numbers of smoothed data point windows for moving average smoothing on RSDs of the peak area. Moving average smoothing is processed one time. The RSDs of the peak area at 20 $\mu\text{g/L}$ Erg-PE estimated by repetitive measurements ($N = 6$) and ISO 11843-7 ($N = 1$) are indicated by open circles and closed squares, respectively. The 95% confidence bands of the RSDs of the peak area by repetitive measurements ($N = 6$) are indicated by the error bars.

ベースラインノイズのスムージング処理の別法として、本 UHPLC-MS/MS システム (waters) は、移動平均を繰り返し行うことができる。すなわち、同じクロマトグラムを 2 回または 3 回移動平均をするプログラムがある。以降、これを反復移動平均法と呼ぶ⁶⁹⁾。例えば、Eq. 6 に示した $\{Y'_t\}$ (5 points の幅で移動平均したクロマトグラム) について、再度 5 points の幅で移動平均によるスムージング処理を行うと、スムージングされた MRM クロマトグラム $\{Y''_t\}$ が得られる。 $\{Y''_t\}$ は、5 から $n-4$ ポイントまで、Eq. 7 のように表される。

$$\{Y''_t\} = \{Y''_5, Y''_6, Y''_7, Y''_8, Y''_9 \dots, Y''_{n-4}\}$$

Eq. 7

$t = 5$ における Y''_5 は Eq. 7a, $t = n-4$ における Y''_{n-4} は Eq. 7b で表される。

$$Y''_5 = \frac{Y'_3 + Y'_4 + Y'_5 + Y'_6 + Y'_7}{5}$$

Eq. 7a

⋮

$$Y''_{n-4} = \frac{Y'_{n-6} + Y'_{n-5} + Y'_{n-4} + Y'_{n-3} + Y'_{n-2}}{5}$$

Eq. 7b

Figure 29 A の MRM クロマトグラムを 15 points の幅で移動平均をすると、Figure 31A に示すようなスムージングされた MRM クロマトグラムが得られた。Figure 31A のクロマトグラムをもう一度 15 points の幅で移動平均 (反復移動平均) すると、Eq. 7 のようにスムージングされた Figure 31B の MRM クロマトグラムが得られた。Figure 31B に示す MRM クロマトグラムは、移動平均を 2 回適用したものとなる。Figure 31C は、MRM クロマトグラムに移動平均を 3 回適用したものである。移動平均法によるスムージング処理を繰り返すことにより、Figure 31B, C の MRM クロマトグラムは、Figure 31A のものと比較して、ベースラインノイズがスムージングされているが、Figure 31B, C の Erg-PE のピーク面積は Figure 31A のものとほぼ同じであった。

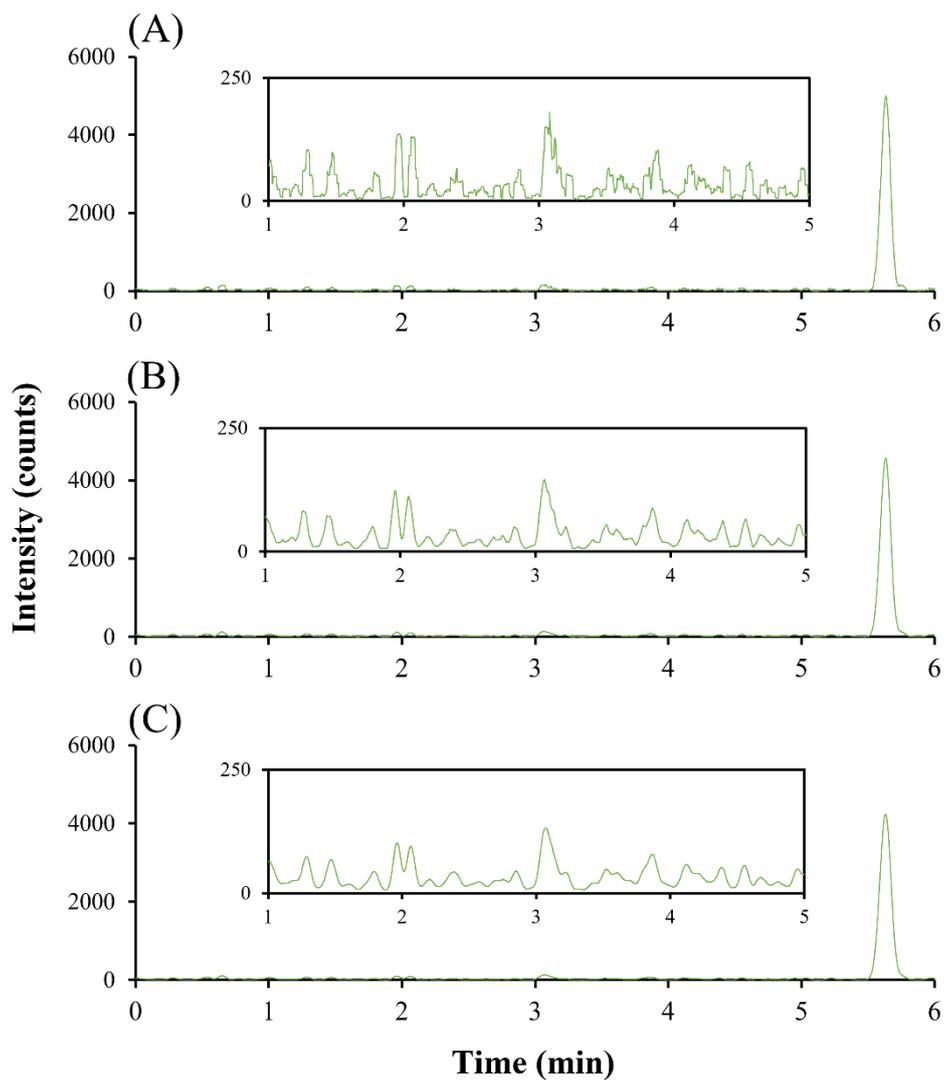


Figure 31 MRM chromatograms processed (A) without and (B and C) with repetitive moving average smoothing. (A) Moving average smoothing is processed one time for the 15-point windows. The repetitive moving average smoothing is processed (B) two and (C) three times. Expanded baselines are shown in each figure. Erg-PE at 20 $\mu\text{g/L}$ was injected into the UHPLC-MS/MS system.

Figure 32 (○) は、15 ポイント幅で 2 回及び 3 回の反復移動平均した MRM クロマトグラムにつき、繰り返し測定で求めた RSD をプロットした。Figure 30(○) で示したピーク面積の RSD と比較したところ、ほとんど同じ値であった。UHPLC-MS/MS の精度は、視覚的なベースラインノイズのスムージングを図った反復移動平均で改善されることはないと考えられることから、Figure 30 (○) で示した結果は妥当である。一方、ISO 11843-7 で反復移動平均した MRM クロマトグラム上のピーク面積の RSD を求めたところ、その値はスムージング処理しない場合 (Figure 30) に比べて小さくなっていた。Figure 32 に示すように、ISO 11843-7 によるピーク面積の RSD は、繰り返し測定によるピーク面積の RSD の 95% 信頼区間外となった。このように、反復移動平均によってスムージングされたベースラインノイズは、ISO 11843-7 に基づく一連の計算の実行に適用できないことが分かった。この理由は、反復移動平均によるスムージング処理によってベースラインノイズの強度が低下するのに対して、ピーク面積はほとんど変化しないためである。したがって、ISO 11843-7 による UHPLC-MS/MS の精度評価の観点からは、反復移動平均には適用できないことが判明した。

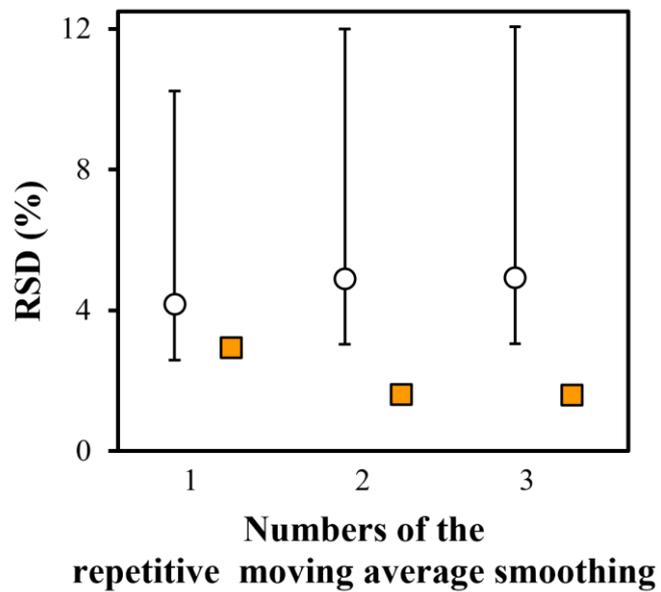


Figure 32 Effects of numbers of the repetitive moving average on RSDs of the peak area. Moving average smoothing is processed for 15-point windows. The RSDs of the peak area at 20 $\mu\text{g/L}$ Erg-PE estimated by repetitive measurements ($N = 6$) and ISO 11843-7 ($N = 1$) are indicated by open circles and closed squares, respectively. The 95% confidence bands of the RSDs of the peak area by repetitive measurements ($N = 6$) are indicated by the error bars.

3-4-6 UHPLC-MS/MS の精度評価におけるクロマトグラムの積算処理の影響

核磁気共鳴 (NMR) などの分光分析の精度や S/N 比を向上させるために、複数回のスペクトルを測定して平均化する積算処理が行われる⁷⁰⁾。時系列 t において、 $t = 1$ から n ポイントまで測定した 3 つの MRM クロマトグラム $\{Y_{t,1}\}$, $\{Y_{t,2}\}$, $\{Y_{t,3}\}$ はそれぞれ、Eq. 8, Eq. 9, Eq. 10 のように表される。

$$\{Y_{t,1}\} = \{Y_{1,1}, Y_{2,1}, Y_{3,1}, Y_{4,1}, Y_{5,1} \cdots, Y_{n,1}\} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\{Y_{t,2}\} = \{Y_{1,2}, Y_{2,2}, Y_{3,2}, Y_{4,2}, Y_{5,2} \cdots, Y_{n,2}\} \quad \text{Eq. 9}$$

$$\{Y_{t,3}\} = \{Y_{1,3}, Y_{2,3}, Y_{3,3}, Y_{4,3}, Y_{5,3} \cdots, Y_{n,3}\} \quad \text{Eq. 10}$$

3 つの MRM クロマトグラム $\{Y_{t,1}\}$, $\{Y_{t,2}\}$, $\{Y_{t,3}\}$ を積算した MRM クロマトグラム $\{\bar{Y}_t\}$ は Eq. 11 のように表される。

$$\{\bar{Y}_t\} = \{\bar{Y}_1, \bar{Y}_2, \bar{Y}_3, \bar{Y}_4, \bar{Y}_5 \cdots, \bar{Y}_n\} \quad \text{Eq. 11}$$

したがって、 $t = 1$ における \bar{Y}_1 は Eq. 11a, $t = n$ における \bar{Y}_n は Eq. 11b で表される。

$$\bar{Y}_1 = \frac{Y_{1,1} + Y_{1,2} + Y_{1,3}}{3} \quad \text{Eq. 11a}$$

⋮

$$\bar{Y}_n = \frac{Y_{n,1} + Y_{n,2} + Y_{n,3}}{3} \quad \text{Eq. 11b}$$

Eq. 11 に示すように、Figure 33A の 20 $\mu\text{g/L}$ の Erg-PE の MRM クロマトグラムを別途測定した MRM クロマトグラムと積算することによって（積算したクロマトグラムの総数=2）、Figure 33B の積算処理 MRM クロマトグラムが得られた。更に、Figure 33A の MRM クロマトグラムを別途測定した 2 本のクロマトグラムと積算することによって（積算したクロマトグラムの総数=3）、Figure 33C の積算処理 MRM クロマトグラムが、別途測定した 3 本のクロマトグラムと積算することによって（積算したクロマトグラムの総数=4）、Figure 33D の積算処理 MRM クロマトグラムが得られた。Figure 33B-D の Erg-PE のピーク面積は、Figure 33A の元の MRM クロマトグラムと比較してほぼ同じであるが、積算したクロマトグラムの総数の増加に伴い、MRM クロマトグラム上のベースラインノイズの強度が減少していることが確認できた。

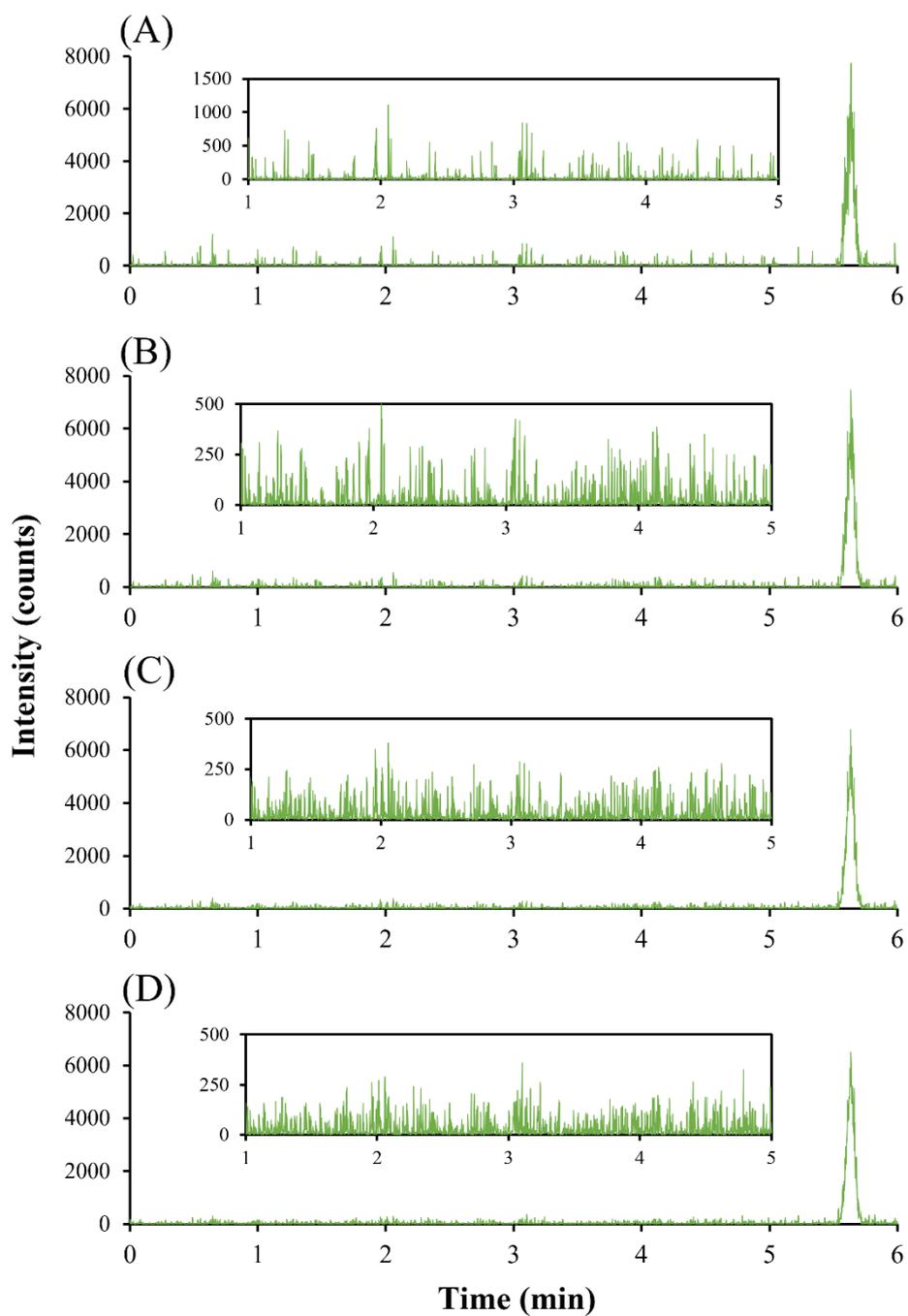


Figure 33 (A) An original and (B-D) accumulated MRM chromatograms. Numbers of chromatograms for accumulation: (B) 2; (C) 3; (D) 4. Expanded baselines are shown in each figure. Erg-PE at 20 $\mu\text{g/L}$ was injected into the LC-MS/MS system.

NMR スペクトル測定などにおいて、2本、3本、4本のスペクトルを積算処理すると、信号強度の RSD はそれぞれ元の RSD 値の $1/\sqrt{2}$, $1/\sqrt{3}$, $1/2$ となる⁷¹⁾。つまり、 N 本のスペクトルで積算処理するとそのスペクトルの信号強度の RSD は、 $1/\sqrt{N}$ になる。そこで本節では、積算処理して得られた1本のクロマトグラム上のピーク面積の RSD が上述のように減少することが、ISO 11843-7による精度評価で実証可能か検討した。Figure 34 (□)には、ISO 11843-7によって求めたピーク面積の RSD をプロットした。Figure 34 (○)には、繰り返し測定 ($n=6$)によって求めた RSD をプロットし、各々の RSD の 95%信頼区間をエラーバーで示した。ISO 11843-7によるピーク面積の RSD は、繰り返し測定によるピーク面積の RSD の 95%信頼区間内にあった (Figure 34)。また、ISO 11843-7 と繰り返し測定によるピーク面積の RSD は、積算クロマトグラム数の増加に伴い減少した。Figure 34 (△) と (▲) は、それぞれ繰り返し測定と ISO 11843-7によって推定された元の RSD に $1/\sqrt{2}$, $1/\sqrt{3}$, $1/2$ を乗じたものをプロットした。これらの理論的に推定された値は、積算処理によって実験的に推定された繰り返し測定の RSD 及び ISO 11843-7 による RSD とよく一致した。このように、UHPLC-MS/MS で得られた MRM クロマトグラムを積算処理したものについても、ISO 11843-7 による精度評価に適用できることが分かった。本研究では、UHPLC-MS/MS における積算クロマトグラムを扱ったが、Ghaoui らは水素炎イオン化検出器を用いたガスクロマトグラフィー (GC-FID) において、クロマトグラムの積算により検出限界を改善することを報告した⁷²⁾。しかし、Ghaoui らは積算クロマトグラムを用いた精度評価には至っていない。これに対し、本研究では ISO 11843-7 を活用することで、積算処理した MRM クロマトグラムについてもピーク面積の RSD が求められることを示した。これにより、積算処理が ISO 11843-7 による精度評価に及ぼす影響も明らかにすることができた。

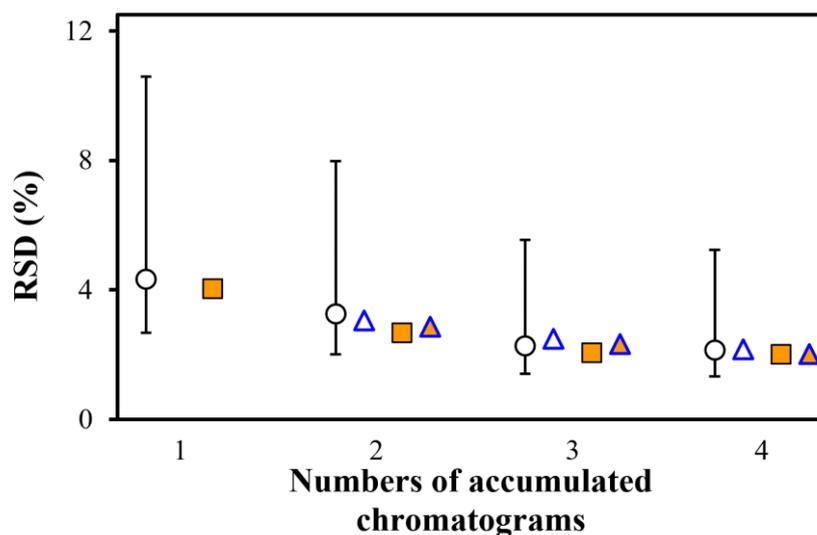


Figure 34 Effects of the numbers of accumulated MRM chromatograms on the RSDs of the peak area. The RSDs of the peak area at 20 $\mu\text{g/L}$ Erg-PE estimated by repetitive measurements ($N = 6$) and the ISO 11843-7 ($N = 1$) are indicated by open circles and closed squares, respectively. The 95% confidence bands of the RSDs of the peak area by repetitive measurements are indicated by the error bars. The values of $1/\sqrt{2}$, $1/\sqrt{3}$, $1/2$ of the original RSDs estimated by repetitive measurements and the ISO 11843-7 are plotted by the open and closed triangles, respectively.

3-5 小括

本章では、UHPLC-MS/MSにおけるISO 11843-7による精度評価の適用の可否に関して検討した。UHPLC-MS/MSでは適用不十分なパラメータ（データポイント数、サンプリング速度）については一部UHPLC-UVを用いて検討した。まず、UHPLC-MS/MSを用いて取得したMRMクロマトグラムのパワースペクトル解析を行いISO 11843-7が適用できることを実証した。高速・高圧で送液可能なUHPLCにおいて、ISO 11843-7に基づくパワースペクトル解析を行うには、ベースラインノイズの測定をより短時間で行う必要があると考えられた。そこで、UHPLC-MS/MSより速いサンプリング速度でクロマトグラムを取得可能なUHPLC-UVを用いて、サンプリング速度及び適切なパワースペクトルの取得に最小限必要なデータポイント数を検討した。サンプリング速度を20 points/sで、約1 minのベースラインから取得した1024 pointsの連続したデジタルデータを用いてパワースペクトル解析を行ったところ、適切な S_B が得られることが分かった。ISO 11843-7には連続データの必要数やサンプリング速度は特に記載されていないが、精度評価を行う際に必要なデータポイント数とサンプリング時間を示すことが出来るようになった。これらの知見は、ISO 11843-7の実用性の向上に寄与するものである。

また、クロマトグラムのデジタル処理に対してISO 11843-7が適用可能かについて検討したところ、適切な条件を設定することによりノイズフィルタ(UHPLC-UV)や、スムージング(UHPLC-MS/MS)などの生データに後処理が施されたクロマトグラムから得られるピーク面積のRSDを推定するために利用できることが分かった。広いデータポイント幅に対する移動平均や反復移動平均したMRMクロマトグラムには、ISO 11843-7に基づく精度の評価は適用できないが、狭いデータポイント幅に対する移動平均及び積算処理に関しては、MRMクロマトグラムのピーク面積のRSDを推定するのに適していることが分かった。UHPLC-MS/MSにおけるデジタル処理に関するこれらの知見は、これまでISO 11843-7では表記されておらず、今回の知見はUHPLC-MS/MS分析における精度評価のためのISO 11843-7の実用化促進に貢献するものである。以上のことから、UHPLC-MS/MSにおいてISO 11843-7に基づく精度評価の拡張性が示された。

総括

本研究では、エルゴステロール及びその代謝物のブラジカステロールの血中濃度測定に適用可能な重水素標識化合物について合成法を改良した。続いて、エルゴステロール及びブラジカステロールをピコリン酸エステル誘導体化し、汎用される ESI をイオン源とした UHPLC-MS/MS による高感度血中濃度測定法を開発した。SHRSP の実験では、ergosterol- d_1 の単回経口投与を行い、血清中の ergosterol- d_1 と brassicasterol- d_1 を定量し、両者の経時変化を明らかにすることができた。更に ergosterol- d_1 の血中濃度-時間曲線から、SHRSP におけるエルゴステロールの PK パラメータを求めることができた。また、brassicasterol- d_1 の見かけの吸収速度が ergosterol- d_1 よりも大きくなることを明らかにした。機器の精度評価の手法として、ISO-11843-7 は UHPLC-MS/MS に適用可能なことを証明し、MRM クロマトグラムにおいてもケモメトリクスのアプローチが有効であることを明らかにした。ISO-11843-7 による精度評価は、血清等のマトリックスを含む試料等の MRM クロマトグラムへの適用は困難であるが、測定条件の検討や最適化には適用でき、LC-MS による分析法の開発に要する各種のリソースの節約に大きく寄与すると考えられる。

第 1 章では、2 種の重水素標識ステロール (ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1) の合成を行った。Ergosterol- d_1 の合成では、既存の合成法を元に、新たに簡便な合成法を考案し、動物実験に適用可能なグラムスケールでの合成ができた。合成工程を減らすことによって収率が改善し、試薬の使用量や合成に要する時間を短縮することができた。Brassicasterol- d_1 の合成では ergosterol- d_1 の合成法に基づき、ergosterol- d_1 の重水素の位置に対応する brassicasterol- d_1 を合成することができた。

第 2 章では、UHPLC-ESI-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の高感度定量法の開発に取り組んだ。血中ステロールの高感度検出のために、ステロールの 3β 位のヒドロキシ基のピコリン酸エステル誘導体化法を選択し、 $10\ \mu\text{L}$ の血清試料から、 $0.04\sim 8\ \mu\text{g/mL}$ の範囲で血中濃度を定量可能な分析法を開発できた。本法は UV 検出と比較して、低濃度まで定量可能であり、十分な精度と感度を有していた。SHRSP への ergosterol- d_1 の経口投与実験では、採血量を軽減できたため、36 時間にわたり 12 点の採血を行い、ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の血中濃度の経時変化を追跡することができた。また、ergosterol- d_1 の血中濃度-時間曲線から、SHRSP におけるエルゴステロールの PK パラメータを得ることができた。更に、brassicasterol- d_1 最大血中濃度は ergosterol- d_1 の 3 倍であることが判明し、血中濃度の減少は ergosterol- d_1 に比較して緩やかであることが示さ

れた。以上から、本研究で開発した UHPLC-ESI-MS/MS による ergosterol- d_1 及び brassicasterol- d_1 の高感度定量法は、SHRSP におけるエルゴステロールからブラジカステロールへの生体内変換の解析に適用可能であり、定量的な薬物動態に関する知見を示すことができた。

第 3 章では、UHPLC-MS/MS システムにおいて、ISO 11843-7 による精度評価が適用可能であることを示した。2 章で定量したピコリン酸エステル化エルゴステロールを測定対象として MRM クロマトグラムを解析した結果、1 本の MRM クロマトグラムから精度評価が可能であることが分かった。ISO 11843-7 にはノイズ解析に必要なデータポイント数やサンプリング速度、解析に用いられるデジタル処理などの各パラメータの影響などの記載がないが、UHPLC-UV も利用して UHPLC-MS/MS における精度評価に適したパラメータを示すことができた。ISO 11843-7 は、UHPLC-MS/MS における精度評価に拡張可能であることが示された。

本研究は、代表的なステロールの一つであるエルゴステロールが、シトステロール血症においては増悪因子になる可能性を示したものである。SHRSP の個体内でエルゴステロールからブラジカステロールへの変換が起こり、血中消退が遅くなっていることが分かった。シトステロール血症は稀な遺伝性の疾患であるが、当該領域における病態の理解へ新たな知見を提供できたと考えている。同時に、本研究で取り扱った重水素標識ステロールの合成法の開発、血清前処理法とステロールの誘導体化法の確立、UHPLC-MS/MS の精度評価への ISO 11843-7 の活用は、1600 種以上あるステロールへの応用展開が可能である。分析化学的な視点、特に脂質分析の領域では、本研究における分析法開発の過程で得られた知見は有用と考えられ、本研究を下地としてステロールのサイエンスが更に進展することを期待する。

謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成に際し、熱心なご指導、ご鞭撻賜りました東京薬科大学薬学部分析化学教室の袴田秀樹教授に深甚なる謝意を表します。

実験遂行並びに本論文の作成にあたり、熱心なご指導を頂きました小谷明准教授、山本法央助教に謹んで感謝申し上げます。

重水素標識エルゴステロールの合成及び重水素標識ブラジカステロールの合成に関して多大なるご教授を賜りました、東京薬科大学薬学部薬化学教室の三浦剛教授、東京薬科大学薬学部薬学教育推進センターの古石裕治准教授に厚く感謝致します。

クロマトグラムの ISO 11843-7 に基づく解析に関して多大なるご助力を賜りました FUMI 理論研究所の林讓博士に深く感謝致します。

東京薬科大学での実験遂行においてご支援、ご協力頂いた分析化学教室の大学院生、学部生、及び大学での研究の日々を共にした友人、卒業生の皆様に感謝致します。

最後に、いつも暖かく研究生活を支えてくれた家族に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Yoon H., Shaw JL., Haigis MC., Greka A. *Mol. Cell*, **81**, 3708-3730 (2021).
- 2) Castellanos DB., Martín-Jiménez CA., Rojas-Rodríguez F., Barreto GE., González J. *Front. Neuroendocrinol.*, **61**, 100899 (2021).
- 3) Triebel A., Hartler J., Trötz Müller M., Köfeler H. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, **1862**, 740-746 (2017).
- 4) Aimo L., Liechti R., Hyka-Nouspikel N., Niknejad A., Gleizes A., Götz L., Kuznetsov D., David FPA., van der Goot FG., Riezman H., Bougueleret L., Xenarios I., Bridge A. *Bioinformatics*, **31**, 2860-2866 (2015).
- 5) Sud M., Fahy E., Cotter D., Brown A., Dennis EA., Glass CK., Merrill AH, Jr., Murphy RC., Raetz CRH., Russell DW., Subramaniam S. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D527-D532 (2006).
- 6) Liebisch G., Fahy E., Aoki J., Dennis EA., Durand T., Ejsing CS., Fedorova M., Feussner I., Griffiths WJ., Köfeler H., Merrill AH., Murphy RC., O'Donnell VB., Oskolkova O., Subramaniam S., Wakelam MJO., Spener F. *J. Lipid Res.*, **61**, 1539-1555 (2020).
- 7) Saini RK., Prasad P., Shang X., Keum Y-S. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13643 (2021).
- 8) Piironen V., Lindsay DG., Miettinen TA., Toivo J., Lampi A-M. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 939-966 (2000).
- 9) Mille-Lindblom C., Von Wachenfeldt E., Tranvik LJ. *J. Microbiol. Methods*, **59**, 253-262 (2004).
- 10) Tada H., Nomura A., Ogura M., Ikewaki K., Ishigaki Y., Inagaki K., Tsukamoto K., Dobashi K., Nakamura K., Hori M., Matsuki K., Yamashita S., Yokoyama S., Kawashiri M., Harada-Shiba M. *J. Atheroscler. Thromb.*, **28**, 791-801 (2021).
- 11) Berge KE., Tian H., Graf GA., Yu L., Grishin NV., Schultz J., Kwiterovich P., Shan B., Barnes R., Hobbs HH. *Science*, **290**, 1771-1775 (2000).
- 12) Klett EL., Lu K., Kusters A., Vink E., Lee MH., Altenburg M., Shefer S., Batta AK., Yu H., Chen J., Klein R., Looije N., Oude-Elferink R., Groen AK., Maeda N., Salen G., Patel SB. *BMC Med.*, **2**, 5 (2004).
- 13) Plösch T., Bloks VW., Terasawa Y., Berdy S., Siegler K., van der Sluijs F., Kema IP., Groen AK., Shan B., Kuipers F., Schwartz M. *Gastroenterology*, **126**, 290-300 (2004).
- 14) Chen J., Batta A., Zheng S., Fitzgibbon WR., Ullian ME., Yu H., Tso P., Salen G., Patel SB. *BMC Genet.*, **6**, 1-12 (2005).
- 15) Hamada T., Kodama Y., Goto H., Yoshida T., Imaizumi K., Ikeda I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 361-365 (2009).

- 16) Tsugawa N., Okano T., Takeuchi A., Kayama M., Kobayashi T. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **38**, 15-25 (1992).
- 17) Zhao YY., Cheng XL., Liu R., Ho CC., Wei F., Yan SH., Lin RC., Zhang Y., Sun WJ. *J. Chromatogr. B*, **879**, 1945-1953 (2011).
- 18) Zhang H-y., Firempong CK., Wang Y-w., Xu W-q., Wang M-m., Cao X., Zhu Y., Tong S-s., Yu J-n., Xu X-m. *Acta Pharmacol. Sin.*, **37**, 834-844 (2016).
- 19) Zhang Z., Gu H., Zhao H., Liu Y., Fu S., Wang M., Zhou W., Xie Z., Yu H., Huang Z., Gao X. *J. Proteome Res.*, **16**, 3529-3535 (2017).
- 20) Ohtsubo T., Kageyama R., Koseki Y., Hagi J., Kotani A., Yamamoto K., Kusu F., Miura T., Hakamata H. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **118**, 1074-1083 (2016).
- 21) Matsumori N., Tahara K., Yamamoto H., Morooka A., Doi M., Oishi T., Murata M. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 11855-11860 (2009).
- 22) Tachibana Y. *Yakugaku Zasshi*, **126**, 1139-1154 (2006).
- 23) Heleno SA., Diz P., Prieto MA., Barros L., Rodrigues A., Barreiro MF., Ferreira ICFR. *Food Chem.*, **197**, 1054-1063 (2016).
- 24) Sapozhnikova Y., Byrdwell WC., Lobato A., Romig B. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 3034-3042 (2014).
- 25) Yokokawa H., Mitsuhashi T. *Phytochemistry*, **20**, 1349-1351 (1981).
- 26) Havinga E. *Experientia*, **29**, 1181-1193 (1973).
- 27) Jasinghe VJ., Perera CO., Sablani SS. *J. Food Eng.*, **79**, 864-869 (2007).
- 28) Jasinghe VJ., Perera CO. *Food Chem.*, **92**, 541-546 (2005).
- 29) Yasukawa K., Aoki T., Takido M., Ikekawa T., Saito H., Matsuzawa T. *Phytother. Res.*, **8**, 10-13 (1994).
- 30) Xiong M., Huang Y., Liu Y., Huang M., Song G., Ming Q., Ma X., Yang J., Deng S., Wen Y., Shen J., Liu QH., Zhao P., Yang X. *Mol. Nutr. Food Res.*, **62**, 1-13 (2018).
- 31) Zhao YY., Xie RM., Chao X., Zhang Y., Lin RC., Sun WJ. *J. Ethnopharmacol.*, **126**, 184-187 (2009).
- 32) Li XM., Wu QP., Xie YZ., Ding YR., Du WW., Sdiri M., Yang BB. *Oncotarget*, **6**, 17832-17846 (2015).
- 33) Gray KC., Palacios DS., Dailey I., Endo MM., Uno BE., Wilcock BC., Burke MD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 2234-2239 (2012).
- 34) Higashi T., Ogawa S. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **162**, 57-69 (2016).
- 35) Gachumi G., El-Aneed A. *J. Agric. Food Chem.*, **65**, 10141-10156 (2017).
- 36) Rocco A., Fanali S. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7173-7178 (2009).
- 37) Ory L., Gentil E., Kumla D., Kijjoa A., Nazih E-H., Roullier C. *Rapid Commun.*

- Mass Spectrom.*, **34**, e8780 (2020).
- 38) Griffiths WJ., Abdel-Khalik J., Crick PJ., Yutuc E., Wang Y. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **162**, 4-26 (2016).
 - 39) Griffiths WJ., Hearn T., Crick PJ., Abdel-Khalik J., Dickson A., Yutuc E., Wang Y. *Chem. Phys. Lipids*, **207**, 69-80 (2017).
 - 40) E G Bligh WJD. *Can. J. Zool.*, **48**, 545-553 (1970).
 - 41) Honda A., Yamashita K., Miyazaki H., Shirai M., Ikegami T., Xu G., Numazawa M., Hara T., Matsuzaki Y. *J. Lipid Res.*, **49**, 2063-2073 (2008).
 - 42) Ikeda I., Nakagiri H., Sugano M., Ohara S., Hamada T., Nonaka M., Imaizumi K. *Metabolism*, **50**, 1361-1368 (2001).
 - 43) Coy DJ., Wooton-Kee CR., Yan B., Sabeva N., Su K., Graf G., Vore M. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **299**, G228-235 (2010).
 - 44) Honda M., Tint GS., Honda A., Batta AK., Chen TS., Shefer S., Salen G. *J. Lipid Res.*, **37**, 2433-2438 (1996).
 - 45) Kim D., Park JB., Choi W-K., Lee SJ., Lim I., Bae SK. *J. Sep. Sci.*, **39**, 4060-4070 (2016).
 - 46) Chen X., Zhu P., Liu B., Wei L., Xu Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **159**, 490-512 (2018).
 - 47) Brousseau V., Caron P., Trottier J., Di Paolo T., Milkiewicz P., Barbier O. *J. Mass Spectrom.*, **57**, e4827 (2022).
 - 48) Ohki S., Kunimatsu M., Ogawa S., Takano H., Furihata T., Shibasaki H., Yokokawa A. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **70**, 375-382 (2022).
 - 49) Hirano R., Yokokawa A., Furihata T., Shibasaki H. *J. Mass Spectrom.*, **56**, e4790 (2021).
 - 50) Reeder JA., Abdallah IA., Bach T., O'Sullivan CT., Xu Y., Nalbant D., An G. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **210**, 114521 (2022).
 - 51) Stachniuk A., Sumara A., Montowska M., Fornal E. *Mass Spectrom. Rev.*, **40**, 3-30 (2021).
 - 52) Yang HS., Edinboro L. *Therapeutic Drug Monitoring of Lacosamide by LC-MS/MS*. Springer New York, New York, NY (2019).
 - 53) Antovic JP., Skeppholm M., Eintrei J., Boija EE., Söderblom L., Norberg E-M., Onelöv L., Rönquist-Nii Y., Pohanka A., Beck O., Hjemdahl P., Malmström RE. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **69**, 1875-1881 (2013).
 - 54) Kulyyassov A., Fresnais M., Longuespée R. *PROTEOMICS*, **21**, 2100153 (2021).
 - 55) Chen Y., Zhou Z., Yang W., Bi N., Xu J., He J., Zhang R., Wang L., Abliz Z. *Anal. Chem.*, **89**, 6954-6962 (2017).

- 56) Nisha A., Alka CN., Preeti K. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.*, **3**, 141-147 (2016).
- 57) Day RA., Underwood AL. *Quantitative analysis*. (1991).
- 58) Sahu PK., Ramiseti NR., Cecchi T., Swain S., Patro CS., Panda J. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **147**, 590-611 (2018).
- 59) Ganchoff J. *J. Chem. Educ.*, **71**, A310 (1994).
- 60) Hayashi Y., Matsuda R., Haishima Y., Yagami T., Nakamura A. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 421-429 (2002).
- 61) Yamamoto K., Kotani A., Hayashi Y., Hakamata H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **67**, 59-63 (2019).
- 62) Kotani A., Hakamata H., Hayashi Y. *J. Chromatogr. A*, **1621**, 461077 (2020).
- 63) Kotani A., Hayashi Y., Matsuda R., Kusu F. *J. Chromatogr. A*, **986**, 239-246 (2003).
- 64) Yomota C., Tagashira Y., Okada S., Hayashi Y., Matsuda R. *Anal. Sci.*, **15**, 549-554 (1999).
- 65) Matsuda R., Hayashi Y., Sasaki K., Saito Y., Iwaki K., Harakawa H., Satoh M., Ishizuki Y., Kato T. *Anal. Chem.*, **70**, 319-327 (1998).
- 66) Kotani A., Watanabe R., Hayashi Y., Hakamata H. *J. Chromatogr. A*, **1673**, 463075 (2022).
- 67) *ISO 11843-7, Capability of detection - part 7: methodology based on stochastic properties of instrumental noise. (ISO, Switzerland, 2018).*
- 68) Hayashi Y., Matsuda R., Poe RB. *Analyst*, **121**, 591-599 (1996).
- 69) Prakash BD., Wei YC. *Analyst*, **136**, 3130-3135 (2011).
- 70) Lissac P., Berticat P., Pham Quang T. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **5**, 901-907 (1971).
- 71) Semchyschyn DJ., Macdonald PM. *Magn. Reson. Med.*, **43**, 607-610 (2000).
- 72) Ghaoui L., Rothman LD. *J. High Resolut. Chromatogr.*, **15**, 36-39 (1992).

研究結果の掲載誌

1) Simultaneous determination of deuterium-labeled ergosterol and brassicasterol in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry.

Machida K, Koseki Y, Kotani A, Yamamoto K, Miura T, Hakamata H: *Anal. Methods*, **14**, 4879-4885 (2022).

2) Effects of sampling rate and noise filter processing on repeatability assessment in UHPLC with ultraviolet detection based on the ISO 11843-7.

Machida K, Watanabe R, Kotani A, Hayashi Y, Hakamata H: *Anal. Sci*, **38**, 183-189 (2022).

3) Effects of digital processing on repeatability assessment of a multiple reaction monitoring liquid chromatography-tandem mass spectrometry system by ISO 11843-7.

Machida K, Kotani A, Hayashi Y, Hakamata H: *J. Mass Spectrom.*, **57**, e4877 (2022).