

HPLC-UV によるヒト尿中のバニルルマンデル酸，ホモバニリン酸， クレアチニンの同時定量法の検討

杉山 智恵 細田 香織 石井 和夫

杏林大学保健学部臨床薬理学教室

目 的

神経芽細胞腫は小児の固形がんの中で最も頻度の高い疾患である。本腫瘍は主に副腎や交感神経節に発生し、患者の尿中には、カテコールアミンの最終代謝物であるバニルルマンデル酸 (vanillylmandelic acid, VMA), ホモバニリン酸 (homovanillic acid, HVA) が多く排泄される (Fig. 1)。したがって、診断には、尿中の VMA, HVA 濃度とクレアチニン濃度の比が用いられる。しかし、これら 3 種の化合物は、化学的性質が大きく異なるため、尿中から同時に抽出し、同時に分析することは困難である。そのため、酵素免疫法や high performance liquid chromatography (HPLC)- カラムスイッチング法などの複雑な分析法により別々に測定され、なおかつ分析時間が長いなどの欠点があった。本研究では、VMA, HVA およびクレアチニンの同時測定法を目指し、簡便な固相抽出法を開発し、HPLC-UV 法の検討と liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 分析への応用について検討した。

方 法

アニオン性およびカチオン性化合物の保持が可能な Scherzo SM-C18 column (150 × 2.0 mm, 3 μm ; Imtakt) に 5 mmol/l 酢酸アンモニウムと 100 mmol/l 酢酸アンモニウム / メタノール = 75/25 の混液 (gradient) を流速 0.3 ml/min で送液し、カラム温度を 37°C として LC 分離を行った。UV 検出は波長 270 nm で行った。一方、MS/MS 分析は、electrospray ionization (ESI) 法により行い、VMA および HVA は negative モード、クレアチニンは positive モードで行った。また、3 種を生体試料中から同時抽出

するため、Oasis WAX (60 mg) と Oasis MCX (60 mg) を組み合わせる新規抽出法を開発し、本法による回収率を求めた。

結果及び考察

弱アニオン交換-逆相ミックス固相 (WAX) および陽イオン交換-逆相ミックス固相 (MCX) を直列に結合した新規固相抽出法を用いることにより、VMA, HVA およびクレアチニンを同時に、ほぼ 100% の回収率で抽出できた。はじめに、簡便な HPLC-UV 法による同時定量を検討したが、健常人尿における基準値の範囲においては生体由来の妨害物質の影響が大きく、正確な定量は困難であると判断した。次に、LC-MS/MS 法による測定法を検討した結果、予想される測定値の範囲内で十分な特異性と検出感度が得られ、なおかつ 1 回の測定は 10 分以内であることから、短時間一斉分析が可能であると考えられた。今後、生体試料を用いた回収率、検量線の作成を進め、更なる検討を重ねる予定である。

学会発表での質疑応答

本稿は、学生リサーチ賞を拝受し、平成 25 年 3 月 28 ~ 30 日に開催された日本薬学会第 133 年会（横浜）に於いて発表した内容をまとめたものである。大学関係者、分析関連企業および公的機関研究者との活発な意見交換を行った。特に、抽出法および分析条件に関する質疑が多く、本演題へ強い関心が寄せられた。学会発表は、準備から発表に至るまで著者を成長させる貴重な経験となった。

Key words: vanillylmandelic acid, homovanillic acid, creatinine

平成 24 年度 学生リサーチ賞 受賞者寄稿

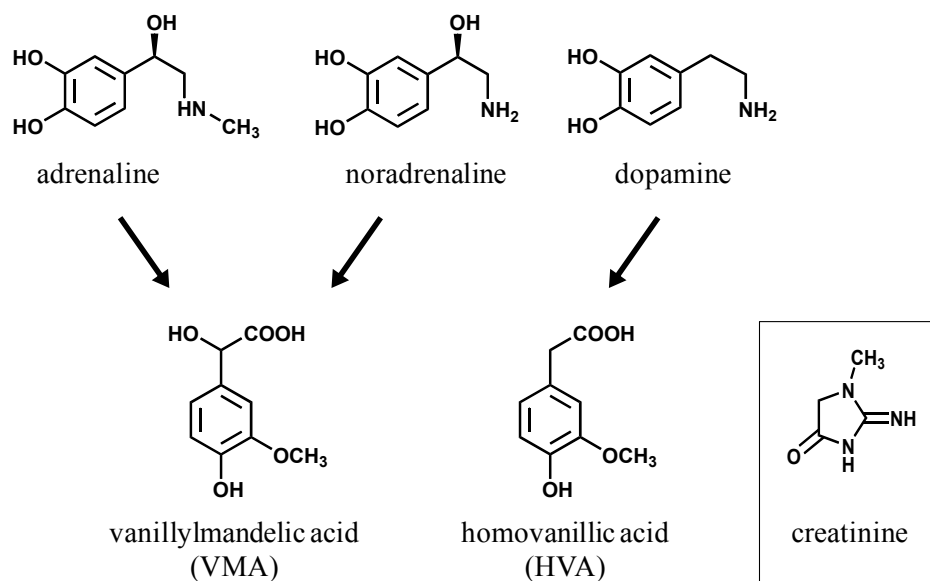


Fig. 1 Metabolism of catecholamine.