

29TC-pm03

オンライン酸化二次元 HPLC を利用するメラトニン高感度全自動分析システムの開発

○永井 里枝¹, 藤本 真由美¹, 大山 翼¹, 浜瀬 健司¹, 東條 洋介¹,
三田 真史², 財津 潔¹(¹九大院薬, ²資生堂)

【目的】体内時計の調節や明暗情報の伝達に深く関与するメラトニンは顕著な概日リズムを有し、リズム疾患や睡眠障害の診断及び治療における利用が期待されている。当研究室では微量血漿からの内因性メラトニン測定が可能な高感度分析法を確立したが、酸化反応を含む前処理操作が煩雑であり幅広い臨床利用は困難であった。本研究ではメラトニン分画及びオンライン酸化反応を組み込んだ全自動二次元 HPLC システム開発を目的とした。

【方法】メラトニン溶液と反応試薬である過酸化水素水溶液、炭酸ナトリウム水溶液をオンラインで混合し、酸化条件の検討を行った。生成した強蛍光性のメラトニン誘導体 6-MOQMA はセミマイクロ逆相 HPLC カラムで濃縮後、分析用マイクロ逆相 HPLC カラムに導き高感度蛍光検出を行った。

【結果・考察】メラトニン溶液、400 μ M 過酸化水素水溶液及び 40 mM 炭酸ナトリウム水溶液を体積比 2:1:1 で混合し 100°C でオンライン酸化を行った結果、加熱時間の延長とともに 6-MOQMA の生成が認められた。高濃度の炭酸ナトリウムを含む反応溶液中の 6-MOQMA を分析用マイクロ HPLC カラムに導入するため、使用 pH 範囲の広い Asahipak ODP40(2.0 mm i.d. x 35 mm)を用いてオンライン濃縮を検討した。その結果、水で 20 分間濃縮洗浄を行うことにより試薬は良好に除去され、効率的濃縮が達成された。オンライン酸化及び濃縮部と分析用マイクロ HPLC カラムである CAPCELL PAK C18 ACR(1.0 mm i.d. x 150 mm)を組み合わせ、オンライン前処理を含めたメラトニン定量を行った。その結果、再現的かつ定量的に 6-MOQMA の生成が認められた。現在、生体試料中のメラトニン分画を組み込んだ全自動二次元 HPLC システムを検討中である。