

# 28P-pm06

ESI 増強重水素標識 Cookson 型試薬を用いる尿中ビタミン D<sub>3</sub> 代謝物の LC/MS/MS 定量法の開発

○小川 祥二郎<sup>1</sup>, 大木 智<sup>1</sup>, 篠田 健太<sup>1</sup>, 東 達也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京理大薬)

【目的】先に我々はビタミンD代謝物と選択的かつ定量的に反応し、ESI-MS/MSに高い応答性を示す新規Cookson型試薬、4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) を開発し、その有用性を報告した.<sup>1)</sup> ところで、ビタミンD代謝物のLC/ESI-MS/MS定量では、入手・合成可能な安定同位体標識内部標準物質が限定され、精密なそれが難しい場合が多い。そこで本研究では<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-DAPTADを合成し、重水素標識誘導体化に基づく尿中ビタミンD<sub>3</sub>代謝物定量法の開発を試みた。

【実験・結果】<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-DAPTADは、4-aminobenzoic acidに<sup>2</sup>H<sub>2</sub>-formaldehydeを作用させた後、DAPTADと同様に合成した。定量対象として25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>] 及び24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] を選択した。健常人尿 (1 mL) をβ-glucuronidaseで処理後、除蛋白及びOasis HLBカートリッジで精製し、得られたビタミンD<sub>3</sub>代謝物をDAPTAD誘導体に変換した。そこへ25(OH)D<sub>3</sub> (20 pg), 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (100 pg) から調製した<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-DAPTAD誘導体を加え、LC/ESI-MS/MS (Waters Quattro Premier XE) に付した。健常人尿からは上記2代謝物に加え、23,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>も検出された。活性炭処理により調製したブランク尿を用いて検量線を作成したところ、25(OH)D<sub>3</sub>では2–40 pg/mL、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>では10–200 pg/mLの範囲でともに $r^2 = 0.999$ の直線性が得られた。さらに日内・日間変動係数は25(OH)D<sub>3</sub>でそれぞれ3.4%, 7.4%以下、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>でそれぞれ10.7%, 4.4%以下であり、回収率 ( $n = 10$ ) は25(OH)D<sub>3</sub>では $87.2 \pm 4.5\%$ 、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>では $93.8 \pm 3.6\%$ と良好であった。現在、健常人尿中の25(OH)D<sub>3</sub>及び24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の同時定量を行っており、その結果についても合わせて報告する予定である。

【文献】1) S. Ogawa, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**, 2453-2460 (2013).