

〈原著〉

LC/MS/MSによる全血中総ビタミンB₁の測定方法

宮川 秀則¹⁾、権藤 一美¹⁾、中浦 秀章¹⁾、加藤 雅子¹⁾、橋詰 直孝²⁾

Method for determining total vitamin B₁ in whole blood by LC/MS/MS

Hidenori Miyagawa¹⁾, Kazumi Gondo¹⁾, Hideaki Nakaura¹⁾,
Masako Kato¹⁾ and Naotaka Hashizume²⁾

Summary Quantitative analysis of the vitamin B₁ is widely performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with the thiochrome labeling method. This method however, utilizes a strong alkali that damages the analytical instruments and its residual waste is not good for the environment. We have developed a new method utilizing liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) that does not rely on strong alkali. Our method has shown good quantitative results in terms of linearity, reproducibility and recovery. To validate our method, we analyzed the same samples both with our method and the HPLC method and achieved a good correlation. The analysis time was also reduced from about 10 minutes to 4 minutes. Our method will therefore prove highly useful for the quantitation of vitamin B₁.

Key words: Vitamin B₁, Thiamine, Whole blood, LC/MS/MS, Method for the determination

I. 緒言

ビタミンB₁ (VB₁) の測定方法は、古くはチオクローム蛍光法が用いられ、その後、液体クロマトグラフィー (HPLC) が主流となった¹⁾。

現在、我々が実施する方法は木村ら²⁾の方法、すなわち、ヒト全血中の総VB₁をポストラベル-HPLCにて定量する方法を用いている。この方法で使用するラベル化試薬は有害なフェリシア

ン化カリウムを含む強アルカリ性溶液であり、分析機器へのダメージが強く、機器保守に時間が掛かる他、廃液による環境への負荷が懸念材料となっている。また、1検体あたりの測定時間が約10分を要することで、測定の処理能力が低い等の欠点が示唆されている。

今回、ポストラベル-HPLCの欠点を補う測定法として、近年、臨床検査においても使われることが多かった液体クロマトグラフィー-タン

¹⁾株式会社エスアールエル

〒192-0031 東京都八王子市小宮町153

²⁾人間総合科学大学 人間科学部 健康栄養学科

受領日 平成25年7月31日

受理日 平成25年8月7日

¹⁾SRL inc.

153 Komiyamachi, Hachioji, Tokyo 192-0031, Japan

²⁾Department of Health and Nutrition University of Human Arts and Sciences

デumasスペクトロメトリー (LC/MS/MS) にて、ヒト全血中総VB₁の測定方法を開発し、その有効性を検証したので報告する。

II. 方法

1. 試薬

VB₁標準物質のビタミンB₁塩酸塩はAccuStandard、内標準物質の3-ピロジンプロパノール (3-PPOH) は東京化成工業よりそれぞれ購入した。試料の前処理用試薬として100 w/v%トリクロロ酢酸溶液 (生化学用) および酢酸ナトリウム三水和物 (試薬特級) は和光純薬工業、タカジアスターゼU (ビタミンB₁定量用) は三菱化学フーズよりそれぞれ購入した。移動相用のメタノール (高速液体クロマトグラフ用)、ギ酸 (約99%) (LC/MS用)、ギ酸アンモニウム (和光特級)、アセトニトリル (試薬特級) は和光純薬工業より購入した。

2. 前処理方法

全血試料 (EDTA-2K採血) 0.4 mLを内標準物質含トリクロロ酢酸 (0.05% 3-PPOH/100w/v % トリクロロ酢酸溶液/精製水=1/85/914 (v/v/v)) 0.8 mLに加えて混和し、遠心分離した。得られた上清0.2 mLを分取し、酢酸ナトリウム溶液 (0.85 mol/L酢酸ナトリウム三水和物) 0.1 mLにて中和した後、タカジアスターゼ (約2.2 mg/mL水溶液) 0.1 mLを加えて37℃にて1時間インキュベートし、LC/MS/MSの測定用試料とした。

3. 分析装置および分析条件

分析装置のLC/MS/MSは、島津製作所の超高速液体クロマトグラフNexera UHPLC Systemおよびトリプル四重極型MS検出器 LCMS-8040を使用した。

LC分析条件は、分析カラムにジーエルサイエンスの高耐圧ODSカラムのInertsil ODS-4 (2.1×50 mm、粒子径2 μm) を用いた。移動相Aは0.03%ギ酸および1%メタノールを含む20 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液とし、移動相Bは50%アセトニトリル溶液とした。この移動相を流量0.38 mL/minのステップグラジエント (移動相A: 0 min 100% → 0.01 min 92%にて1 min保持) とした。カラムオープン温度は43℃、試料

注入量は1 μLとした。

MS/MS分析条件はUPLC-MS/MSを用いた方法³⁾を参考とし、エレクトロスプレーイオン化 (ESI-Positive) の多重反応モニタリング (MRM) にて、VB₁はチアミン (C₁₂H₁₇ClN₄OS、分子量300.81) として定量した (国際単位系への換算が必要な場合は、換算係数=3.324を乗じ、単位はnmol/Lと表記)。MRM条件は自動最適化にて、チアミンがプレカーサーイオンm/z: 264.9、プロダクトイオンm/z: 122.1、Collision energy: -15 Vとし、内標準物質の3-PPOHがプレカーサーイオンm/z: 138.2、プロダクトイオンm/z: 93.2、Collision energy: -19 Vとした。その他、DL温度: 250℃、ネブライザーガス流量: 3 L/min、ヒートブロック温度: 400℃、ドライイングガス流量: 15 L/minとした。また、1検体あたりの測定時間は約4分とした。

III. ポストラベル-HPLCによる測定

全血試料VB₁濃度の測定値について、LC/MS/MSとの相関性を確認するために行ったポストラベル-HPLCは、木村ら²⁾の方法に基づき実施した。

IV. 結果

1. MRMクロマトグラム

LC/MS/MSの分析条件にて検量線用試料 (500 ng/mL VB₁、0.001 mol/L HCl溶液) および全血試料をMRM測定した。得られたMRMクロマトグラムをFig. 1に示した。MRMクロマトグラムは保持時間1.00~1.50分の範囲にVB₁および内標準物質 (3-PPOH) のピークが検出され、ともに単一のピークであった。

2. 検量線

検量線の検討は、検量線用試料 (5、50、500 および1000ng/mLVB₁、0.001 mol/L HCl溶液) を全血試料と同様に前処理し、LC/MS/MSにて測定し、直線性について検討した。直線性は、VB₁/内部標準物質のピーク面積比 (y) とその濃度 (x) より最小二乗法 ($y=ax+b$, $w=1/y^2$) にて検量線を5本作成し、それぞれの検量線について、直線性の評価として相関係数 (r) を求め

た。その結果、相関係数 (r) は0.999~1.000となり、5~1000 ng/mLの測定レンジにおいて良好な直線性が得られた。

3. 再現性

再現性は、3種類の全血試料をLC/MS/MSにて測定し、測定内再現性および測定間再現性について確認した。その結果をTable 1に示した。測定内再現性(各試料n=5)のCV (%)は0.62~3.99%、測定間再現性(各試料n=2、5日間)のCV (%)は1.46~3.36%となり、ともに良好な再現性が得られた。

4. 添加回収

添加回収は、3種類の全血試料にVB₁標準物質を0、100、200、400および600 ng/mL添加し、VB₁標準物質の回収率を求めた。回収率は97.1~108.3%となり、各試料とも良好な結果が得られた。

5. 相関性の確認

本法とポストラベル-HPLCにて、全血試料のVB₁濃度をそれぞれ測定し、相関性を確認した。本法の測定値をy軸、ポストラベル-HPLCの測定値をx軸とした相関グラフをFig. 2に示した。検量線の濃度範囲(5-1000 ng/mL、n=114)では、相関係数 (r) が1.000、直線回帰式が $y = 0.988x - 0.254$ 、健常人基準値^{a)}レベルを含む低濃度範囲(5-70 ng/mL、n=102)では、相関係数 (r) が0.987、直線回帰式が $y = 0.971x + 0.183$ となり、ともに良好な相関性が確認された。

V. 考察

全血中総VB₁濃度測定で多く用いられているポストラベル-HPLCに代わる方法としてLC/MS/MSを用いた本法の有効性を検討した。

その結果、直線性、再現性、添加回収等の各

Table 1 Reproducibility

	Intra-day (n=5)			Inter-day (n=2×5day)		
	Mean of measured value (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	Mean of measured value (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
Whole Blood No.1	28.6	1.14	3.99	28.0	0.94	3.36
Whole Blood No.2	110.2	3.03	2.75	111.6	3.21	2.88
Whole Blood No.3	243.4	1.52	0.62	247.1	3.60	1.46

SD: Standard deviation CV: Coefficient of variation

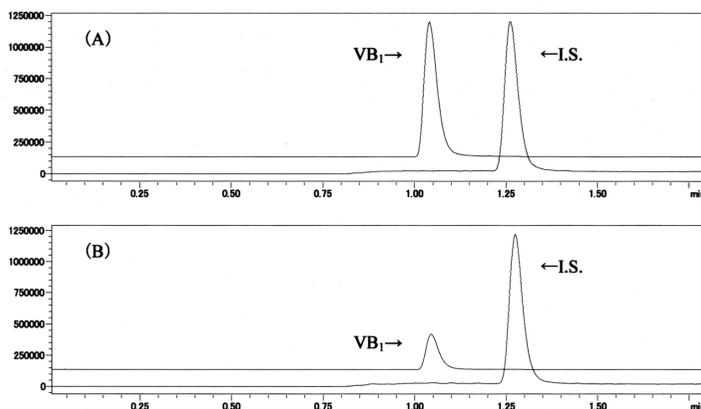


Fig. 1 MRM Chromatogram. (A): Standard Sample(500ng/mL VB₁) (B): Whole Blood Sample

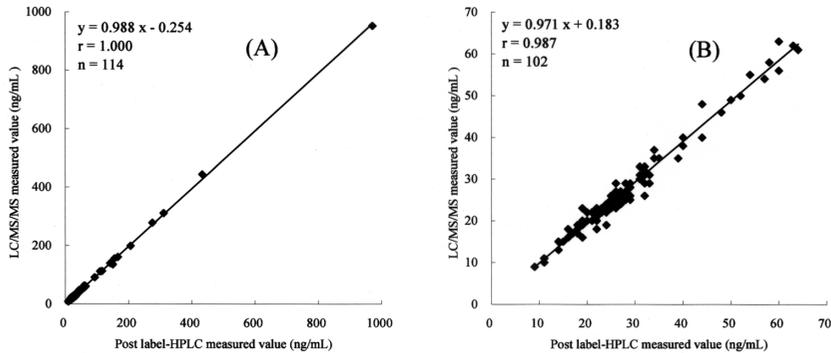


Fig. 2 Correlation test. (A): VB₁ concentration range: 5-1000 ng/mL, (B): VB₁ concentration range: 5-70 ng/mL

試験において良好な結果が得られ、全血中総VB₁濃度測定を測定法として、基本的性能に問題の無いことが確認された。また、ポストラベル-HPLCと本法の相関性について検討した結果、測定値に大きな乖離は無く、良好な相関性が認められた。

今回、我々が検討したLC/MS/MSは測定結果の信憑性に問題は無く、ポストラベル-HPLCの代替法として全血中総VB₁濃度測定が可能であることが示された。また、1検体あたりの測定時間は、ポストラベル-HPLCの約10分に対して、本法では約4分となり、測定時間の大幅な短縮が可能になった。さらに、本法では有害なフェリシアン化カリウムや強アルカリ性試薬を使用しないことから、分析装置へのダメージが軽減されるとともに、環境負荷への懸念材料が払拭された。

以上のことから、全血中総VB₁濃度測定において本法は、ポストラベル-HPLCに代わる有効な方法であることが確認された。これにより、ビタミンD測定と同様に、VB₁測定もいずれLC/MS/MSが国際標準法になると考える。本法が国際標準法となった場合、現在の測定値（単位：ng/mL）は国際単位系に換算（換算係数=3.324を乗じる）し、単位をnmol/Lと表記する

必要がある。また、治療の指標となる健常人基準値は、相関性の確認において現在の測定値との乖離は無いため、変更は無いが、国際単位系への換算は必要と考える。

今後は本法を臨床検査において導入するとともに、さらに全血中総VB₁に代わる栄養指標として生理活性を有する全血中チアミン-2-リン酸(TDP)⁹⁾等の測定をLC/MS/MSにて検討する必要があると考える。

文献

- 1) 石渡幸久, 岡 裕美: ビタミンB₁測定法の現状と課題. ビタミン, 85: 338-345, 2011.
- 2) 木村美恵子, 藤田登美雄, 糸川嘉則: 高速液体クロマトグラフィーによる血液中総ビタミンB₁定量法. ビタミン, 55: 185-189, 1981
- 3) Hampel D, York ER, Allen LH: Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. Journal of Chromatography B, 903: 7-13, 2012.
- 4) 橋詰直孝: ビタミンB₁欠乏症と血中ビタミンB₁値の標準化. 臨床化学, 26: 210-214, 1977.
- 5) 渭原 博: ビタミンB₁欠乏を疑った602例の全血総ビタミンB₁濃度の解析. 生物試料分析, 33: 179-183, 2010.