

## 〈技術報告〉

ミニカラム法によるビタミン D 3 分画の  
分画精製および 25(OH)D 測定系の検討

夏目 克巳\* 鈴村 栄里\* 鈴木 智子\* 渡辺 幸彦\*

**要旨** C<sub>18</sub> ミニカラムおよび NH<sub>2</sub> ミニカラムの 2 ステップ精製法によるビタミン D 代謝体 3 分画 [25(OH)D, 24,25(OH)<sub>2</sub>D および 1,25(OH)<sub>2</sub>D] の分画精製について検討した。NH<sub>2</sub> ミニカラムによる分画精製において、25(OH)D はヘキサン：ジクロロメタン (50 : 50), 24,25(OH)<sub>2</sub>D はヘキサン：ジクロロメタン (20 : 80), 1,25(OH)<sub>2</sub>D はヘキサン：イソプロパノール (75 : 25) で溶出した。この際の該当フラクションへの他代謝体の混入は 1.4% 以下であった。また血清に添加した <sup>3</sup>H-25(OH)D, <sup>3</sup>H-24,25(OH)<sub>2</sub>D および <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D の回収率はそれぞれ 73.2±2.45%, 60.0±2.98%, 63.5±3.37% (mean±SD, n=8) であった。

さらにミニカラム抽出で得られた 25(OH)D 画分を用いて CPBA による測定を検討したところ、同時再現性 CV=4.60~8.41%, 日差再現性 CV=6.62~16.4% であり、添加回収試験では 81.2~130% の回収率が得られた。また、健常人の血清 (5 月採取) を測定したところ 17.4±6.02 ng/ml (mean±SD, n=110) であり、従来の HPLC 精製法の報告と一致した。さらに、本精製法と HPLC 精製法との相関も良好であった ( $y = -0.38 + 1.03x$ ,  $r = 0.953$ ,  $n = 36$ )。25(OH)D 測定は、繁雑な HPLC 精製の代わりに簡便なミニカラムを使用した本精製法による測定が可能であると考えられた。

(核医学 32: 99-104, 1995)

## I. はじめに

ビタミン D 代謝体は Ca 代謝に重要な役割を果たしている。前駆体であるビタミン D (D<sub>2</sub> と D<sub>3</sub> の総称) はまず肝臓で 25 位が水酸化され 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] となり、さらに腎臓で水酸化され、24,25-dihydroxyvitamin D [24,25(OH)<sub>2</sub>D] や活性型の 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] に変換される<sup>1)</sup>。ビタミン D 代謝体は

HPLC (高速液体クロマトグラフィ) で分画精製後、コンペティティブプロテインバイディングアッセイ (CPBA), ラジオレセプターアッセイ等<sup>2-4)</sup> により測定されているが、HPLC 操作が繁雑なため、大量検体処理には不向きであり、この HPLC 操作の省略が望まれている。最近、簡便なミニカラム抽出による活性型ビタミン D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] の測定が行われるようになった<sup>5,6)</sup>。しかし、この方法ではビタミン D 代謝体 3 分画それぞれの分画精製は行えない。また、2 ステップミニカラム精製法によるビタミン D 代謝体 3 分画の分画精製も試みられているが十分な分離は得られていない<sup>7-9)</sup>。今回われわれは C<sub>18</sub> ミニカラムおよびヘキサン-ジクロロメタン系・ヘキサン-イソプロパノール系混合溶媒を用いた NH<sub>2</sub> ミニカラムの 2 ステップ精製法によるビタミン D 代謝

\* 株式会社エスアールエル  
受付：6 年 9 月 8 日  
最終稿受付：6 年 11 月 8 日  
別刷請求先：東京都八王子市小宮町 51 (☎ 192)  
株式会社エスアールエル  
特殊検査部特殊 RI 課

夏目 克巳

体3分画の分画精製を行った。さらに得られた25(OH)D分画を用いて、25(OH)D測定について検討したので報告する。

## II. 材料および方法

### 1. 測定試薬

標準品は、25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Duphar Co., The Netherlands) をエタノールで溶解後、 $\epsilon_{264} = 18,200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  で濃度補正をした。

標識抗原は、<sup>3</sup>H-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (28 Ci/mmol, Amersham) を、用いた抽出溶媒はすべて和光純薬工業社の高速液体クロマトグラフ用を使用した。

ミニカラム抽出には Varian 社の Bond Elut C<sub>18</sub> ミニカラム (100 mg) および Bond Elut NH<sub>2</sub> ミニカラム (500 mg) を使用した。HPLC 精製は Du Pont 社の Zorbax SIL カラムを使用した。

CPBA に用いる DBP (Vitamin D Binding protein) は、2か月間ビタミンD欠乏飼料で飼育したラットの血清を使用した。

### 2. 方法

#### 1) ミニカラム精製によるビタミンD代謝体3分画の分画精製

血清 100  $\mu\text{l}$  に生理的食塩水 1 ml とアセトニトリル 1 ml を加え、攪拌後遠心分離し、上清に 0.4 M-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 ml を加え、C<sub>18</sub> ミニカラムにアプライした。この C<sub>18</sub> ミニカラムはあらかじめヘキサン 5 ml, アセトニトリル 5 ml, メタノール 15 ml, 水 5 ml でコンディショニングしたものをを使用した。試料のアプライ後、水 4 ml, メタノール：水 (1 : 1) 4 ml で吸引洗浄し、アセトニトリル 4 ml でビタミンD代謝物を溶出した。

次に、窒素気流下で乾固した溶出画分をヘキサン：ジクロロメタン (80 : 20) 2 ml で再溶解し、NH<sub>2</sub> ミニカラムにアプライした。この NH<sub>2</sub> ミニカラムはヘキサン：ジクロロメタン (50 : 50) 10 ml, ヘキサン：ジクロロメタン (80 : 20) 10 ml であらかじめコンディショニングしたものをを使用した。アプライ後、ヘキサン：ジクロロメタン (70 : 30) 10 ml で洗浄し、ヘキサン：ジクロロメ

タン (50 : 50) 10 ml で 25(OH)D を溶出した。次に、ヘキサン：ジクロロメタン (40 : 60) 10 ml で洗浄後、ヘキサン：ジクロロメタン (20 : 80) 10 ml で 24,25(OH)<sub>2</sub>D を溶出した。最後にジクロロメタン 10 ml で洗浄後、ヘキサン：イソプロパノール (75 : 25) 10 ml で 1,25(OH)<sub>2</sub>D を溶出した。

#### 2) 25(OH)D の CPBA

NH<sub>2</sub> ミニカラム精製後の 25(OH)D 溶出画分を窒素気流下で乾固させた後、エタノール 500  $\mu\text{l}$  に再溶解し、試料溶液とした。0.1 M-バルビタール緩衝液 (0.06% ゼラチン含有, pH 8.6) 300  $\mu\text{l}$  に試料溶液あるいは 25(OH)D 標準溶液 50  $\mu\text{l}$ , <sup>3</sup>H-25(OH)D<sub>3</sub> (15,000 dpm) 50  $\mu\text{l}$ , DBP 溶液 (5,000 倍希釈) 500  $\mu\text{l}$  を加え、4°C で 2 時間反応させた。その後 DCC (0.2% デキストラン, 2% チャコール) 200  $\mu\text{l}$  を加え、4°C で 15 分間静置し、2,000 g, 4°C で 15 分間遠心分離をした。得られた上清の放射能を液体シンチレーションカウンター (RackBeta 1209, Pharmacia 社) で計測し、25(OH)D 濃度を求めた。

#### 3) 25(OH)D の HPLC 精製法との比較

C<sub>18</sub> ミニカラム抽出物を HPLC で分離精製し得られた 25(OH)D 溶出画分を CPBA により測定した値とミニカラム精製法による測定値を比較した。HPLC はギルソン社製 HPLC システム、カラムは Zorbax SIL, 移動相にはヘキサン：イソプロパノール (90 : 10) を流速 2 ml/min の条件で用いた。

## III. 結果

### 1. ミニカラムによる分画精製

#### 1) アセトニトリルおよび C<sub>18</sub> ミニカラムによる抽出

血清に <sup>3</sup>H-25(OH)D<sub>3</sub>, <sup>3</sup>H-24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (10,000 dpm) を添加し、アセトニトリルおよび C<sub>18</sub> ミニカラムによる抽出を行った。得られた分画の放射能を計測し、回収率を求めたところ、25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の回収率はそれぞれ 83.9 ± 1.48%, 85.2 ± 1.39%, 77.4 ± 2.52% (n = 10, mean ± SD) であった。

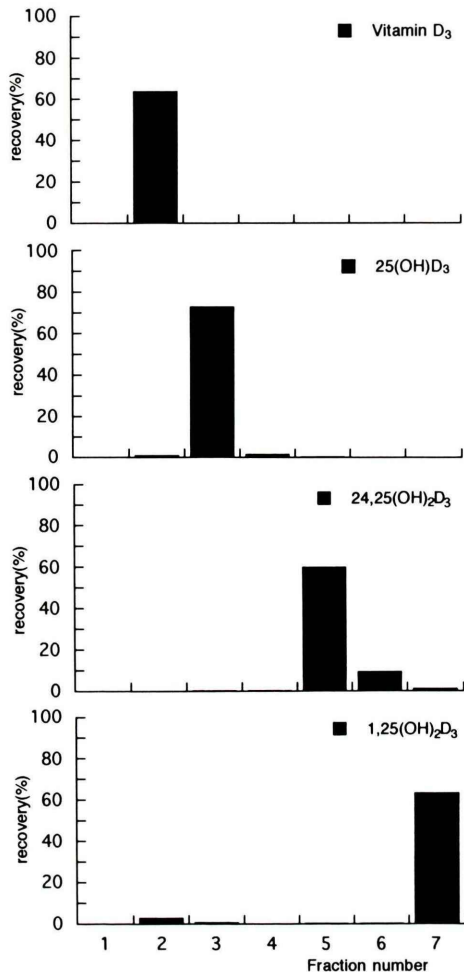


Fig. 1 Elution of Vitamin D metabolites from NH<sub>2</sub> cartridge.

- Fraction 1: apply  
hexane: dichloromethane = 80 : 20 10 ml
- Fraction 2  
hexane: dichloromethane = 70 : 30 10 ml
- Fraction 3  
hexane: dichloromethane = 50 : 50 10 ml
- Fraction 4  
hexane: dichloromethane = 40 : 60 10 ml
- Fraction 5  
hexane: dichloromethane = 20 : 80 10 ml
- Fraction 6  
dichloromethane 10 ml
- Fraction 7  
hexane: isopropanol = 75 : 25 10 ml

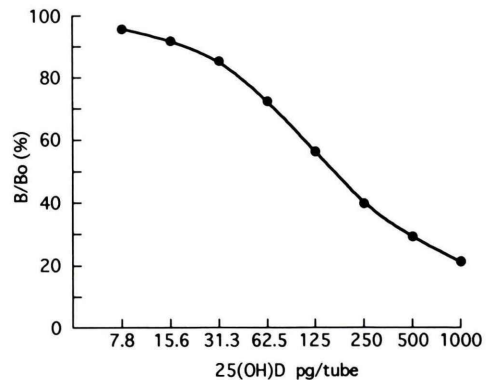


Fig. 2 Standard curve of 25(OH)D.

2) NH<sub>2</sub>ミニカラムによる分画精製

同様に血清に <sup>3</sup>H-25(OH)D<sub>3</sub>, <sup>3</sup>H-24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (10,000 dpm) と非標識ビタミン D<sub>3</sub> を添加し、アセトニトリルおよび C<sub>18</sub> ミニカラムにより抽出後、NH<sub>2</sub>ミニカラムで分画精製し回収率を求めた。ビタミン D<sub>3</sub> は得られた分画を HPLC 法により測定し<sup>3)</sup>、回収率を求めた。

ビタミン D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の分離は良好であり、それぞれ該当フラクションへの他代謝体の混入は 1.4% 以下であった (Fig. 1)。また、この際の 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 回収率は 73.2 ± 2.45%, 60.0 ± 2.98% および 63.5 ± 3.37% (n=8, mean ± SD) であった。

2. 25(OH)D の CPBA による測定

1) 検量線

25(OH)D 濃度 7.8 ~ 1,000 pg/tube で検討した結果、安定した検量線が得られた (Fig. 2)。最小測定レンジは 20 pg/tube であった。

2) 直線性試験および添加回収試験

試料血清を 1/2, 1/4, 1/8 に希釈し測定した結果、測定値は原点を通る直線上にあった (Fig. 3)。添加回収試験では、3種類の血清 (11.0, 20.0 および 32.0 ng/ml) に 6.67, 13.3 および 26.6 ng/ml の 25(OH)D 標準品を添加したところ 81.2 ~ 130% の回収率が得られた。

3) 再現性試験

3種類の血清 (9.44, 20.2 および 43.5 ng/ml) にお

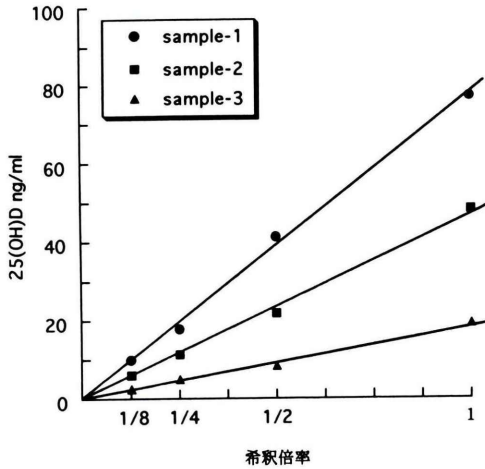


Fig. 3 Dilution test of 25(OH)D.

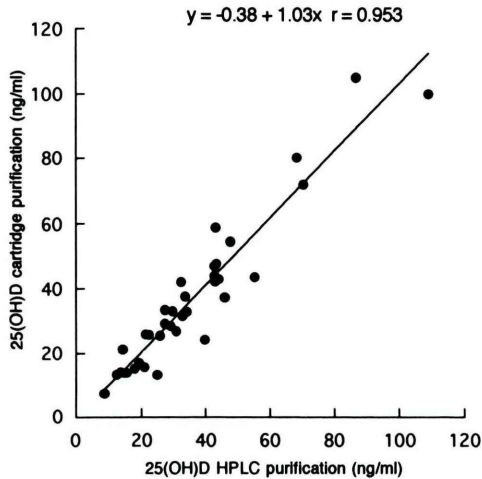


Fig. 4 Correlation of 25(OH)D values between cartridge purification and high performance liquid chromatography (HPLC) purification.

ける同時再現性は、それぞれ CV=6.05, 4.60 および 8.41% (n=10) であった。同様に 3 種類の血清 (12.2, 21.8 および 49.8 ng/ml) における日差再現性は、それぞれ CV=6.62, 7.18 および 16.4% (n=6) であった。

#### 4) 健康人血清中の 25(OH)D 濃度

平成 6 年 5 月に採血した健康人 110 名の 25(OH)D 濃度を測定したところ  $17.4 \pm 6.02$  ng/ml (mean  $\pm$  SD) であった。

### 3. 25(OH)D 測定値の HPLC 精製法との相関

1 $\alpha$ (OH)D 製剤投与例 3 検体および 1,25(OH)<sub>2</sub>D 製剤投与例 7 検体を含む計 36 例の血清において、HPLC 精製法との相関を求めたところ、良好な相関を示した ( $y = -0.38 + 1.03x$   $r = 0.953$ , Fig. 4).

## IV. 考 察

われわれは、C<sub>18</sub> ミニカラムおよび NH<sub>2</sub> ミニカラムの 2 ステップ精製法による 25(OH)D, 24,25(OH)<sub>2</sub>D および 1,25(OH)<sub>2</sub>D の分画精製について検討した。ヘキサン-ジクロロメタン系・ヘキサン-イソプロパノール系混合溶媒を使用した NH<sub>2</sub> ミニカラムでのビタミン D 代謝体 3 分画の分離は良好であった。

ビタミン D 代謝体の測定において、24,25(OH)<sub>2</sub>D および 1,25(OH)<sub>2</sub>D は血中濃度が低いいため精製時における他代謝体の混入が測定上大きな問題になる。25(OH)D は血中濃度が最も高いため精製時における他代謝体の混入は一般的に問題ないとされてはいるが、ビタミン D 代謝体の大量投与時における測定ではその影響が考えられる。そのため、これらビタミン D 代謝体の測定には HPLC と同程度の精製が必要であり、ミニカラムを用いた精製においては他代謝体の混入を防がなければならない。

ミニカラムによるビタミン D 代謝体の抽出精製において、C<sub>18</sub> ミニカラムは Hollis<sup>5)</sup>, silica ミニカラムは Reinhardt<sup>9)</sup>, NH<sub>2</sub> ミニカラムは Kao<sup>7)</sup> や McGraw<sup>8)</sup> らが報告している。Hollis<sup>5)</sup>, Reinhardt<sup>9)</sup>, および Kao<sup>7)</sup> らの報告では 25(OH)D と 1,25(OH)<sub>2</sub>D は分離可能であるが 24,25(OH)<sub>2</sub>D は、それぞれの分画に混入している。また、McGraw<sup>8)</sup> らは代謝体 3 分画を NH<sub>2</sub> ミニカラムを用いヘキサン-イソプロパノール (97:3), (94:6), (75:25) の混合溶媒で分画精製しているが、3 分画の該当フラクションには、それぞれ 10% 近くの他代謝体の混入が認められている。一方、われわれはヘキサン-ジクロロメタン系混合溶媒を用いて NH<sub>2</sub> ミニカラムによる分画精製を検討したところ、特に

25(OH)D と 24,25(OH)<sub>2</sub>D の良好な分離を得ることができた。さらにジクロロメタンで洗浄することにより、24,25(OH)<sub>2</sub>D を十分に溶出させ 1,25(OH)<sub>2</sub>D フラクションへの混入を防止することができた。本精製法は、代謝体 3 分画の該当フラクションにおける相互の混入が 1.4% 以下であり、既報と比較して優れた精製法であると考えられた。また、混合溶媒作成時において、2 種類の使用溶媒の容積比が非常に大きいため、ルーチン検査において常に安定した混合溶媒を作成することができると考えられた。

次にミニカラム抽出で得られた 25(OH)D の画分を使用し、CPBA の検討を行ったところ、最小測定レンジは 20 pg/tube であり、検体量および抽出率の補正を行うと 3.0 ng/ml まで測定可能であった。再現性試験、希釈試験および添加回収試験の結果も良好であった。

データは示していないが、血清 1 ml に 1 α(OH)D 製剤を 1 ng 添加したところ、25(OH)D 測定値に変動は見られなかった。また、1 α(OH)D および 1,25(OH)<sub>2</sub>D 製剤投与例を含む血清検体を用いて、HPLC 精製法との相関を求めたところ  $r = 0.953$  と良好であり、他のビタミン D 代謝体の影響は見られなかった。

25(OH)D は季節変動があると言われているが、平成 6 年 5 月に採血した健常人 110 名の 25(OH)D 濃度は  $17.4 \pm 6.02$  ng/ml (mean  $\pm$  SD) であった。本法での測定値は土光らの HPLC 精製法<sup>2)</sup> の報告 (春季  $19.5 \pm 10.0$  ng/ml, 夏季  $36.7 \pm 16.2$  ng/ml, 秋季  $20.6 \pm 11.3$  ng/ml および冬季  $11.3 \pm 4.9$  ng/ml (mean  $\pm$  SD)) と一致する結果であった。

以上、C<sub>18</sub> ミニカラムとヘキサソール系ジクロロメタン系・ヘキサソール系イソプロパノール系混合溶媒を使用した NH<sub>2</sub> ミニカラム精製におけるビタミン D およびビタミン D 代謝体 3 分画の分離は良好であった。この精製法を利用してわれわれは 25(OH)D を分画精製し、CPBA で測定したところ

良好な結果が得られ、HPLC 精製法での測定値と同様の結果が得られた。今後、本精製法の 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 24,25(OH)<sub>2</sub>D 測定への応用も検討したい。

## 文 献

- 1) 小林 正: ヒト血漿中のビタミン D 代謝物の濃度変動について. ビタミン **57**: 407-421, 1983
- 2) 土光茂治, 森田陸司, 福永仁夫, 山本逸雄, 滋野長平, 山本厚江, 他: 人血中 Vitamin D 誘導体の測定に関する研究 (第一編 Competitive Protein Binding Assay による血中 25-OH-D 測定の検討). 日内分泌会誌 **57**: 1209-1222, 1981
- 3) 土光茂治, 森田陸司, 福永仁夫, 山本逸雄, 山本厚江, 滋野長平, 他: 人血中 Vitamin D 誘導体測定に関する研究 (第二編 諸種 Vitamin D 誘導体の同一試料からの同時測定に関する基礎的研究). 日内分泌会誌 **57**: 1223-1238, 1981
- 4) 清野佳紀, 山岡完次, 田中弘之, 里村憲一, 石田允, 藪内百治, 他: 活性型ビタミン D (1,25-Dihydroxyvitamin D) の測定の 進歩—ラジオレセプターアッセイ法を中心に. ビタミン **60**: 359-370, 1986
- 5) Hollis BW: Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D involving a novel single-cartridge extraction and purification procedure. Clin Chem **32**: 2060-2063, 1986
- 6) Watanabe Y, Kubota T, Suzumura E, Suzuki T, Yonezawa M, Ishigami T, et al: 1,25-Dihydroxyvitamin D radioreceptor assay using bovine mammary gland receptor and non-high performance liquid chromatographic purification. Clin Chim Acta **225**: 187-194, 1994
- 7) Kao PC, Hesser DW: Simultaneous determination of 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D from a single sample by dual-cartridge extraction. Clin Chem **30**: 56-61, 1984
- 8) McGraw CA, Hug G: Simultaneous measurement of 25-hydroxy-, 24,25-dihydroxy-, and 1,25-dihydroxyvitamin D without use of HPLC. Med Lab Sci **47**: 17-25, 1990
- 9) Reinhardt TA, Horst RL, Orf JW, Hollis BW: A microassay for 1,25-dihydroxyvitamin D not requiring high performance liquid chromatography: application to clinical studies. J Clin Endocrinol Metab **58**: 91-98, 1984

## Summary

### Extraction and Purification of the Three Major Vitamin D Metabolites Using C<sub>18</sub> and NH<sub>2</sub> Cartridges and Measurement of 25-Hydroxyvitamin D

Katsumi NATSUME, Eri SUZUMURA, Tomoko SUZUKI and Yukihiro WATANABE

*SRL, Inc.*

In this study, the three major vitamin D metabolites: 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], 24,25-dihydroxyvitamin D [24,25(OH)<sub>2</sub>D], 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] were clearly separated using a NH<sub>2</sub> cartridge after acetonitrile and C<sub>18</sub> cartridge extraction. In the NH<sub>2</sub> cartridge purification procedure, 25(OH)D was eluted with hexane/dichloromethane (50 : 50), 24,25(OH)<sub>2</sub>D was eluted with hexane/dichloromethane (20 : 80) and 1,25(OH)<sub>2</sub>D was eluted with hexane/isopropanol (75 : 25). Contamination of each fraction with two other metabolites were less than 1.4%. Recoveries of added <sup>3</sup>H-25(OH)D, <sup>3</sup>H-24,25(OH)<sub>2</sub>D and <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D were 73.2 ± 2.45%, 60.0 ± 2.98% and 63.5 ± 3.37%, respectively.

Using the 25(OH)D fraction after the NH<sub>2</sub> cartridge procedure, we measured 25(OH)D using a competi-

tive protein binding assay. The intra- (n=10) and interassay (n=8) coefficients of variation were 4.60–8.41% and 6.62–16.4%, respectively. Analytical recovery of added 25(OH)D was in the range of 81.2–130%. The 25(OH)D values were 17.4 ± 6.02 ng/ml (mean ± SD) in serum from 110 healthy volunteer collected in May. The correlation of 25(OH)D values was good between cartridge purification and high performance liquid chromatography (HPLC) purification. ( $y = -0.38 + 1.03x$ ,  $r = 0.953$ ,  $n = 36$ )

This purification using a simple cartridge procedure was suitable for the measurement of 25(OH)D, and preferable to the time-consuming HPLC purification.

**Key words:** Vitamin D metabolites, NH<sub>2</sub> cartridge purification.