

生体試料分析システム Co-Sense for BA による 血漿中の薬物分析（その1）

Determination of Drugs in Blood Plasma by "Co-Sense for BA" (Part 1)

血漿や血清などの生体試料に含まれる薬物をHPLCにより分析する場合、タンパク質などの夾雑物を前処理において除去する必要があります。一般に除タンパク操作は、有機溶媒や酸を試料に添加した後、遠心分離するなどにより行われますが、操作が煩雑になることと、手作業による操作のため、分析精度の低下を招く恐れがあり、これらの操作を自動化する手法が望まれています。

生体試料分析システム「Co-Sense for BA」は、新しく開発された前処理カラムを用いたカラムスイッチング技術と独自のオンライン希釈バイパスの採用により、除タンパクなどの前処理操作を自動化するとともに、分析精度の向上をめざしたシステムです。ここでは、「Co-Sense for BA」の原理と特長についてご紹介します。

M. Takahashi

「Co-Sense for BA」の原理

Principle of "Co-Sense for BA"

「Co-Sense for BA」は、システム内に新開発の前処理カラムShim-pack MAYI-ODSと希釈バイパスを組み込むことにより、血漿中の薬物分析などにおける除タンパク操作を、自動化することができます。「Co-Sense for BA」の流路図をFig.1に示します。Shim-pack MAYI-ODSは、親水性ポリマーでコーティングされた内面逆相のカラムで、その構造をFig.2に示します。タンパクのような高分子は、親水性ポリマーでブロックされ、細孔内部に入ることができない一方、薬物のような低分子は、細孔内部まで浸透し固定相に保持されることにより、タンパクのような高分子を選択的に系外に除去することができます。

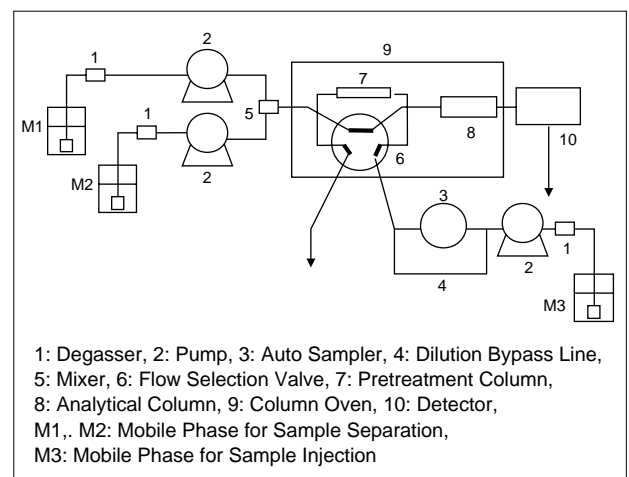


Fig.1 流路図
Flow Diagram

分析手順

Procedure of Analysis

あらかじめ、ろ過をした血漿などの生体試料は、オートサンプラ(3)から注入され、試料導入液(M3)により、前処理カラムShim-pack MAYI-ODS(7)に導かれます。オートサンプラ部には、タンパクからの薬物の回収率を高める目的で、希釈バイパス流路(4)が組み込まれています。(詳細は次ページ)次に、高压流路切換バルブ(6)を60度回転させることにより、Shim-pack MAYI-ODSにてトラップされた薬物を、分析用移動相(M1, M2)により分析カラム(7)に導入し、分離を行います。

Fig.1中の番号・記号を示します。

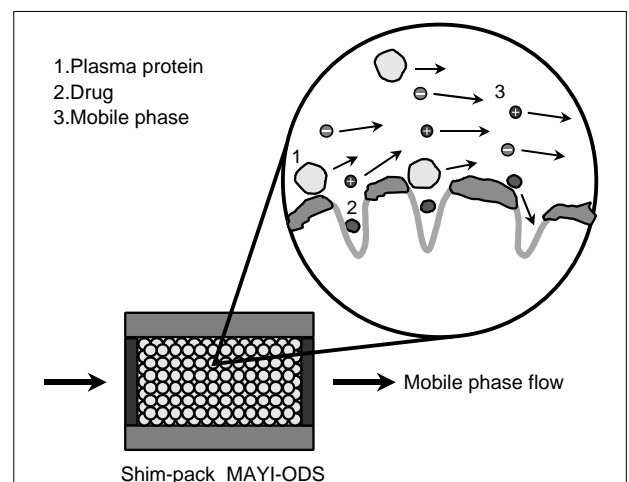


Fig.2 除タンパクの原理
Principle of Deproteinization

Shim-pack MAYI-ODSによるタンパク除去 Deproteinization by Shim-pack MAYI-ODS

Shim-pack MAYI-ODSによるタンパク除去効果について、イソプロピルアンチピリン添加血漿を用いて評価した結果をFig.3に、その分析条件をTable 1に示します。

Fig.3下段のクロマトグラムより、タンパクが3分以内

Table 1 分析条件
Analytical conditions

For Sample Injection	
Column	: Shim-pack MAYI-ODS (10mmL. × 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: 0.1% Phosphoric acid/Acetonitrile=95/5 (v/v)
Flow Rate	: 2.0mL/min
Dilution Factor	: 8
For Separation	
Column	: Shim-pack VP-ODS (150mmL. × 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: A : water B : Acetonitrile Linear gradient B 5% 95%
Flow Rate	: 1.0mL/min
Temperature	: 40
Detection	: SPD-10AV _{VP} at 275nm for isopropylantipyrine at 280nm for plasma protein

回収率への希釈バイパスの効果

Effect of On-line Dilution Bypass on Recovery

「Co-Sense for BA」では、タンパクと結合した薬物でも効果的に回収し、分析することが可能です。希釈バイパスから試料導入液（緩衝液やそれに10%以下の有機溶媒を添加したものなど）を導入し、注入試料を自動的に8倍希釈することにより、タンパク結合率の高い薬物でも、高い回収率で分析することができます。

Table 2 分析条件
Analytical conditions

Mobile phase	: A : 0.1% Trifluoroacetic acid in water B : 0.1% Trifluoroacetic acid in acetonitrile Linear gradient B 5% 95%
Flow Rate	: 1.0mL/min
Temperature	: 40
Detection	: SPD-10AV _{VP} at 315nm

再現性

Repeatability

フェニトイン、カルバマゼピンを1mg/L濃度になるように血漿に標準添加した試料を用いて、再現性を評価した結果をTable 4に示します。Table 3はその分析条件です。

Table 3 分析条件
Analytical conditions

For Sample Injection	
Column	: Shim-pack MAYI-ODS (10mmL. × 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: A : 100mM Acetate (Na) buffer <pH=4.7> B : Acetonitrile A/B = 95/5 (v/v)
Flow Rate	: 2.0mL/min
Dilution Factor	: 8
For Separation	
Column	: Shim-pack FC-ODS (75mmL. × 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: A : 20mM Phosphate (Na) buffer <pH=2.5> B : Methanol Linear gradient B 50% 85%
Flow Rate	: 1.0mL/min
Temperature	: 40
Detection	: SPD-10AV _{VP} at 210nm for phenytoin at 300nm for carbamazepine

に溶出していることが確認できます。タンパク溶出後にバルブを切換えることにより、薬物などの低分子化合物を選択的に分析カラムに導入することができ、Fig.3の上段のクロマトグラムを得ることができます。

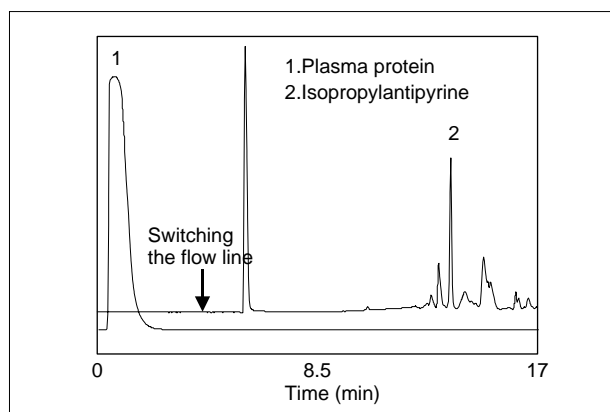


Fig.3 タンパク除去効果 (1mg/L 添加, 100 μL 注入)
Effect of Deproteinization (1mg/L spiked, 100 μL inj.)

Fig.4にタンパク結合率の高いインドメタシン添加血漿を用いて希釈バイパスの効果の評価した結果を示します。分析条件は、Table 1と異なる項目のみTable 2に示します。500 μL 注入した時、バイパスがない場合は回収率が50%程度ですが、バイパスを設けると回収率がほぼ100%となり、その効果を確認することができました。

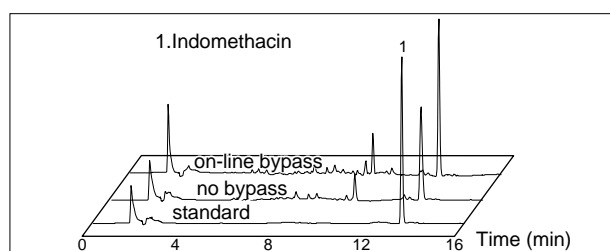


Fig.4 希釈バイパスの効果 (1mg/L 添加, 500 μL 注入)
Effect of On-line Dilution Bypass (Spiked, 1mg/L, 500 μL inj.)

いずれの場合も良好な結果が得られており、前処理操作における人為的バラツキを低減することが期待できます。

Table 4 フェニトイン、カルバマゼピンの再現性
Repeatability of Phenytoin and Carbamazepine

	Peak Area of Phenytoin	Peak Area of Carbamazepine
NO.1	238911	98548
NO.2	240042	98367
NO.3	237208	98706
NO.4	238317	98481
NO.5	239678	98152
Average	238832	98451
S.D.	1127.9	207.3
C.V. (%)	0.472	0.211

(1mg/L each, 50 μL inj.)

初版発行：2002年11月
A改訂版発行：2005年6月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691 (携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。