

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3）

Determination of Drugs in Blood Plasma by "Co-Sense for BA" (Part 3)

生体試料分析システム「Co-Sense for BA」は、血漿や血清のような生体試料の前処理を自動化できることを特長としており、その原理や応用例について、アプリケーションニュースNo.L285, L286でご紹介しました。

「Co-Sense for BA」は、試料を導入して除タンパクを行うための前処理用流路と、分析対象物を夾雑物と分離し、

検出するための分析用流路から構成されます。このため、「Co-Sense for BA」では、前処理用流路側の条件と、分析用流路側の条件を最適化する必要があります。

ここでは、分析プログラムの設定例と、分析条件の最適化をはかる方法についてご紹介します。

M.Takahashi, K.Yamabe

分析プログラム

Analytical Program

血漿中のジアゼパムを「Co-Sense for BA」で分析した時のクロマトグラムをFig.1に、分析条件をTable1に示します。また、その分析プログラムをFig.2に示します。Fig.2上のグラフ内に、移動相中のアセトニトリル濃度（上）と、試料導入液の流量（下）を示しました。また、高压流路切換バルブにおけるバルブの切換え時間をFig.2下に示しました。

Fig.2下段のように高压流路切換バルブを3分後に切換えることにより、タンパクなどの高分子を系外に排出し、分析対象である低分子化合物を分析カラムに導入するこ

とができます。

分析用の移動相は、ジアゼパムが溶出するまでは、メタノール60%の一定組成送液を行い、溶出後は、メタノール濃度を85%まで上げ、カラム内に残った夾雑物を除去しています。分析対象によっては、グラジエント溶出を行うこともあります。なお、試料導入液は、2mL/minで送液していますが、高压流路切換バルブを切換えた後は、消費を抑えるため、0.2mL/minに変更しています。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

For Sample Injection	
Column	: Shim-pack MAYI-ODS (10mmL. x 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. x 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: A: 20mM Phosphate (Na) buffer <pH=2.5> B: Methanol A/B = 40/60 (v/v)
Flow Rate	: 1.0mL/min
Temperature	: 40
Detection	: SPD-M10A _{VP} at 312nm

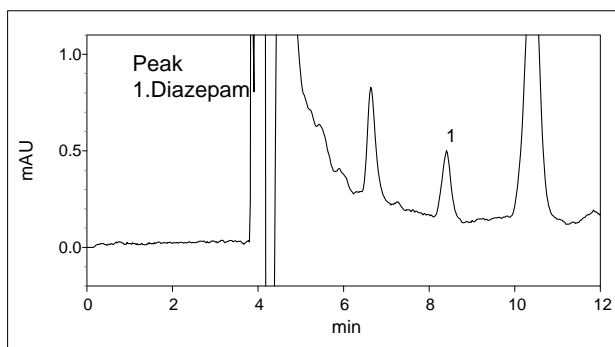


Fig.1 血漿中のジアゼパムの分析
Chromatogram of Diazepam in Plasma
(0.2μg/mL spiked, 50μL injected)

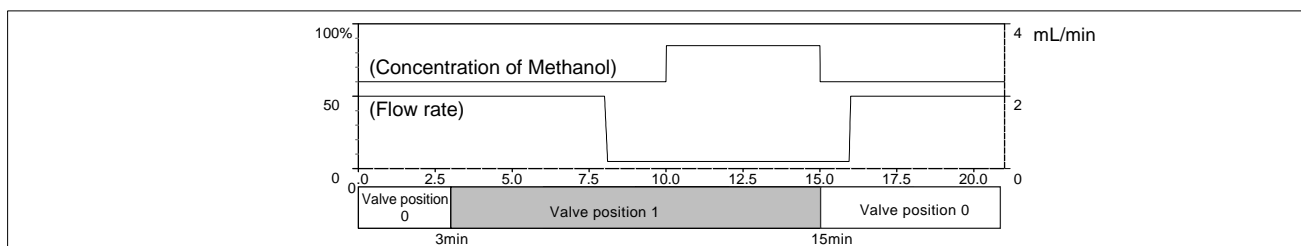


Fig.2 分析プログラム
Analytical Program

薬物の回収率に対する試料導入液の影響

Effect of Mobile Phase for Sample Injection on Recovery of Drugs

血漿中の薬物は、タンパクと結合して存在していることが多いため、タンパクと薬物との遊離を促進させる試料導入液を選択する必要があります。タンパクと薬物は、イオン性相互作用、疎水性相互作用などで結合しているため、試料導入液のpH、イオン強度、有機溶媒濃度などをコントロールすることにより、遊離を促進することができます。

Table 2に酸性薬物を例として、試料導入液における緩衝液の種類、pH、イオン種の違いによる回収率への影響を比較した結果を示します。100mM酢酸（ナトリウム）

緩衝液<pH=4.7>や、100mMりん酸（ナトリウム）緩衝液<pH=2.1>の場合、いずれの薬物でも高い回収率が得られていることがわかります。

Table 3に試料導入液のイオン強度と有機溶媒濃度の回収率への影響について、塩基性薬物を例として比較した結果を示します。クロロフェニラミンやプロプラノロールでは、試料導入液のイオン強度が高い程回収率が良くなっています。また、イミプラミンのように疎水性の比較強い成分は、試料導入液にアセトニトリルを添加することにより回収率が向上しています。

Table 2 血漿中の酸性薬物の回収率
Recovery of Acidic Drugs in Plasma (2µg/mL spiked each, 50µL injected)

Mobile phase for sample injection	Recovery (%)		
	Ketoprofen	Naproxen	Warfarin
100mM Acetate (Na) buffer<pH=4.7>/Acetonitrile =9/1 (v/v)	98	100<	100<
100mM Phosphate (Na) buffer <pH=2.1>/Acetonitrile = 9/1 (v/v)	97	98	98
100mM Ammonium acetate	100<	75	99

Table 3 血漿中の塩基性薬物の回収率
Recovery of Basic Drugs in Plasma (0.5µg/mL spiked each, 50µL injected)

Mobile phase for sample injection	Recovery (%)				
	Lidocaine	Chlorpheniramine	Propranolol	Diphenhydramine	Imipramine
10mM Ammonium acetate	100<	80	87	93	78
100mM Ammonium acetate	99	99	91	96	80
100mM Ammonium acetate / Acetonitrile = 95/5 (v/v)	99	100<	99	100<	86
100mM Ammonium acetate / Acetonitrile = 90/10 (v/v)	-	-	-	-	95

基本分離条件における薬物の溶出挙動

Elution Behavior of Drugs in Standard Program for Separation

分析用カラムにより分離条件を作成する場合、分析対象薬物の溶出挙動を調べておくと、検討が容易になります。

Table 5は、各薬物をTable 4の分析条件で分析した際の溶出時間を示しています。この条件をもとに、血漿由来の夾雑ピークとの分離を良くするための移動相条件、グラジェント条件を最適化しました。

Table 5 溶出時間の一覧
Retention Index

	Mobile phase A (min)	Mobile phase B (min)	Mobile phase C (min)
Lidocaine	13.3	21.5	15.0
Noscapine	14.7	21.6	19.6
Chlorpheniramine	15.6	21.2	16.6
Propranolol	16.9	20.7	16.8
Diphenhydramine	17.2	22.1	17.1
Phenytoin	17.2	17.0	17.1
Isopropylantipyrene	17.7	17.7	17.8
Chlorpropamide	17.8	15.2	17.7
Verapamil	17.8	21.9	17.9
Carbamazepine	17.8	17.8	17.8
Acetohexamide	18.3	15.7	19.2
Reserpine	18.6	22.7	
Imipramine	18.8	24.4	18.9
Nifedipine	18.7	19.0	18.9
Ketoprofen	19.5	16.7	18.7
Naproxen	20.1	16.4	
Diazepam	20.2	20.2	20.2
Warfarin	20.5	15.3	19.3
Phenylbutazone	21.0	17.2	
Ibuprofen	22.2	19.2	21.3

Table 4 分析条件
Analytical Conditions

For Sample Injection	
Column	: Shim-pack MAYI-ODS (10mmL. x 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: Optimized Buffer / Acetonitrile Solution for each drug
Flow Rate	: 2.0mL / min
Dilution Factor	: 8
For Separation	
Column	: Shim-pack VP-ODS (150mmL. x 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: A: Buffer solution (shown in Table 5) B: Methanol Linear gradient B 15% 85% (4-19min.)
Flow Rate	: 1.0mL / min
Temperature	: 40
Detection	: SPD-M10A _{VP}

Mobile phase A: 20mM Phosphate (Na) buffer <pH=2.5> containing 100mM Sodium perchlorate
Mobile phase B: 20mM Phosphate (Na) buffer <pH=6.9>
Mobile phase C: 100mM Acetate (Na) buffer <pH=4.7>

初版発行：2003年3月
B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。