

## 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6)

Determination of Drugs in Blood Plasma by "Co-Sense for BA" (Part 6)

血漿や血清など生体試料の自動前処理カラムスイッチングHPLCシステムである「Co-Sense for BA」は、分析のハイスループット化が求められる薬物動態や代謝研究において、有効なツールとして用いられています。

一方、近年分析のスループットをさらに高めるために、粒子径 $3\mu\text{m}$ 以下の微細充填材を用いたハイスループットカラムやシリカゲル連続体を分離担体に用いたモノリス型カラムなどが普及しつつあります。特に、モノリス

型カラムは、カラムの負荷圧が小さいことから、高流量での分析が可能であり、ハイスループット分析に適したカラムと言えます。

ここでは、分析カラムにモノリス型カラムを用いることにより、血漿中薬物分析の時間短縮化を検討した例についてご紹介します。なお、「Co-Sense for BA」の原理や応用例につきましては、アプリケーションニュースNo.L285, 286, 293, 305, 307もご参照ください。

M.Takahashi

### システム構成

#### System Configuration

今回の検討では、分析時間を極力短くする目的から通常の「Co-Sense for BA」の流路を一部変更して用いました。Fig.1にその流路図を示します。

#### ・前処理ライン洗浄用ポンプの追加

除タンパク処理後に前処理ラインを速やかに洗浄するために、前処理側移動相の他に前処理ライン洗浄液を送液できる送液ポンプを一台追加（Pump2）しました。送液ポンプに接続した移動相切換バルブにより、前処理移動相と前処理ライン洗浄液を切り替える方法もありますが、分析時間を極力短縮するためには、移動相切換に要する時間を最小化するためには、送液ポンプ2台により移動相の切り換えを行いました。

#### ・オンライン希釈バイパスの除去

「Co-Sense for BA」に組み込まれているオンライン希釈バイパスは、回収率を向上させるには有効なツールで

すが、自動前処理に要する時間が長くなってしまいます。

今回は時間短縮を最大の目的としましたので希釈バイパスを取り外しました。これにより前処理に要する時間は、前処理側移動相の流量を $4.0\text{mL}/\text{min}$ 、血漿試料注入量を $10\mu\text{L}$ 注入した時、0.5分まで短縮できます。

#### ・質量分析計手前に流路切換バルブを追加

余計な血漿マトリクスを質量分析計に導入しないように質量分析計の手前に流路切換バルブ（ValveB）を設置し、質量分析計を少しでも汚染から守るようにしました。

#### ・質量分析計直前にスプリッターを設置

モノリス型カラムでは、分析用移動相を高流量で送液する必要があるため、質量分析計の直前にスプリッターを設置しました。

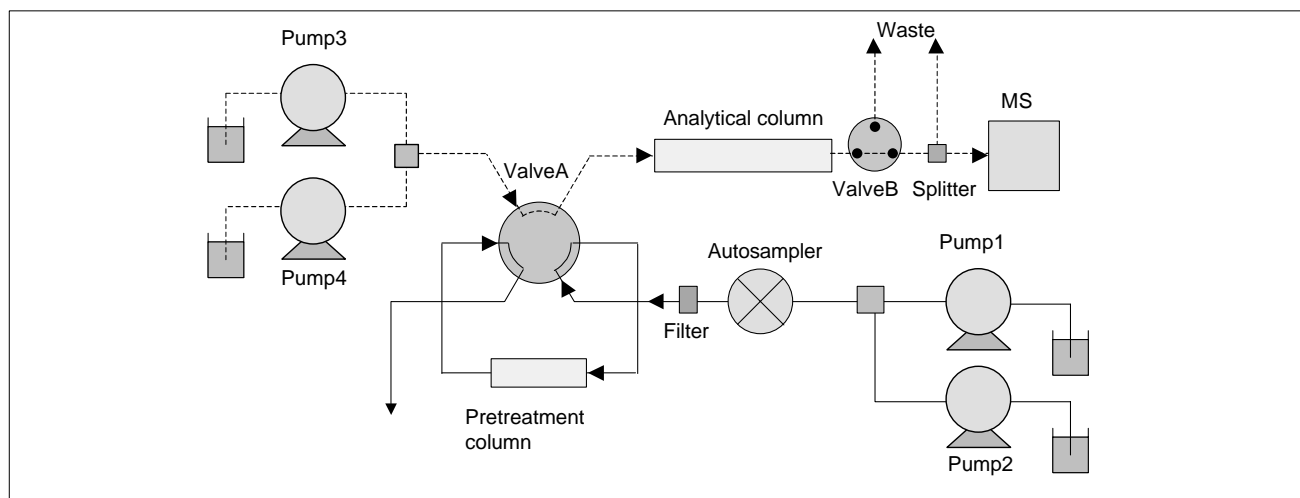


Fig.1 システム流路図  
Flow Diagram

## 血漿中薬物の分析例

### Analysis of Drugs in Plasma

メトプロロール、プロプラノロール、リドカイン、ブピバカインをテスト化合物として検討しました。その分析条件をTable 1に示します。分析用移動相は、スプリッターにより1/7 (MS/Drain) にスプリットし、質量分析計に導入しました。試料注入から0.5分まで前処理カラムによる除タンパクを行い、トラップされたテスト化合物を流路切換バルブにより、分析カラムに導きました。

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

For Sample Injection	
Column	: Shim-pack MAYI-ODS (10mmL × 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: 10mM Ammonium acetate / Acetonitrile =95/5(v/v)
Flow Rate	: 4.0mL/min
Injection Volume	: 10μL
Extraction Time	: 0.5min
For Separation	
Column	: Chromolith SpeedROD RP-18e (50mmL × 4.6mmI.D.)
Mobile Phase	: A: 10mM Ammonium acetate B: Acetonitrile B25% (0min)→B90% (0.3min)→B90% (0.9min)→ B25% (0.9min)→Stop(1.2min)
Flow Rate	: 4.0mL/min
Mixer	: 2.6mL
Split	: 1/7(MS/drain)
Temperature	: 40°C
Probe Voltage	: +4.5kV (ESI-positive mode)
Nebulizing Gas	: 1.5L/min
Drying Gas	: 0.2MPa

前処理後は、前処理ラインを水/アセトニトリル=1/4(v/v)、6.0mL/minで洗浄しました。血漿にメトプロロール、プロプラノロール、リドカイン、ブピバカインを添加した試料について最適化を検討した結果、前処理およびグラジエント溶出を含めた分析1サイクルを1.2分に短縮することが可能でした。(Fig.2) また、いずれのテスト化合物も95%以上の高い回収率が得られました。

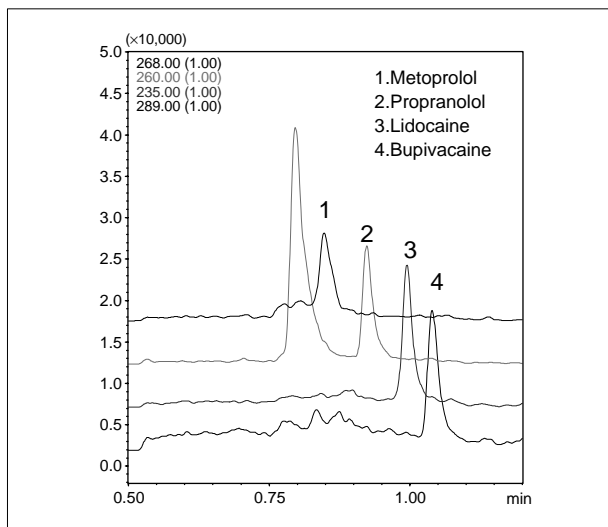


Fig.2 血漿中薬物4成分のSIMクロマトグラム  
SIM Chromatogram of 4 Drugs in Plasma  
(5ng/mL spiked, 10μL injected)

## 再現性・直線性

### Repeatability and Linearity

本分析条件において、溶出時間および面積値再現性を評価したところ (n=5)、急勾配なグラジエントにもかかわらず良好な再現性が得られました。(Table 2, Table 3) また、5ng/mLから100ng/mLの範囲における各テスト化

合物の直線性を調べたところ、いずれのテスト化合物においても、寄与率 (R<sup>2</sup>) は0.9998以上で良好な直線関係が得られました。ここでは、メトプロロールの直線関係をFig.3に示しました。

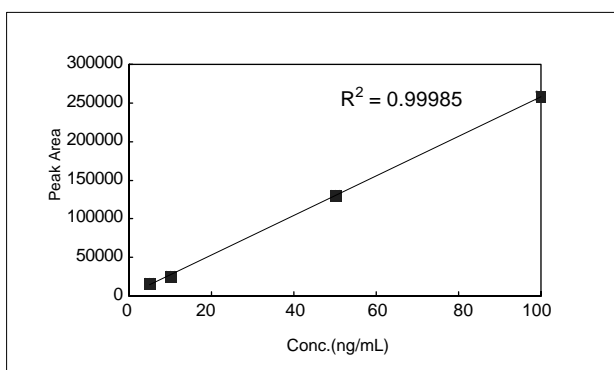


Fig.3 メトプロロールの直線性  
Linearity of Metoprolol.  
(5, 10, 50, 100ng/mL plasma spiked, 10μL injected.)

Table 2 溶出時間再現性  
Repeatability of Retention Time  
(100ng/mL standard, 10μL injected.)

	Metoprolol	Propranolol	Lidocaine	Bupivacaine
CV(%)	0.20	0.18	0.22	0.24

Table 3 面積値再現性  
Repeatability of Peak Area  
(5, 10, 100ng/mL plasma spiked, 10μL injected.)

	Metoprolol	Propranolol	Lidocaine	Bupivacaine	
CV (%)	100ng/mL	3.7	0.9	1.4	1.0
	10ng/mL	2.5	4.1	2.3	3.4
	5ng/mL	9.4	6.4	6.0	2.6

初版発行：2004年7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。