

## カラムスイッチングHPLC法を用いた 生体液中の薬物分析方法の検討

山 崎 浩 行  
北 村 隆 司  
森 山 弘 之

### Simultaneous Determination of Drugs in Biological Fluids Using the Column Switching HPLC Technique

Hiroyuki YAMASAKI  
Takashi KITAMURA  
Hiroyuki MORIYAMA

The rapid determination of trace amounts of anti-epileptic drugs in human serum using a combination of a precolumn for sample pretreatment and a short ODS column has been investigated. The sample pretreatment column, TSKgel precolumn BSA-ODS, possesses the hydrophobic ODS layer on the internal surface of the pores and the hydrophilic denatured BSA moiety on the external surface of the particles. The diluted serum samples can be directly injected onto this precolumn for the on-column deproteination of biological fluids. The TSKgel Super-ODS column packed with particles of 2.3  $\mu\text{m}$  in diameter can achieve a rapid separation.

The retention times of the anti-epileptic drugs decreased with increasing acetonitrile concentration in the mobile phase. Clonazepam and diazepam easily eluted at pH below 4.5 and the recovery of the drugs in serum increased up to 80% by adding  $\text{NaClO}_4$  and SDS to the sample solution. The reproducibility of the determination was satisfactory (cv. less than 5%). This system could be operated without any trouble during 200 consecutive injections (sample volume ; 1000  $\mu\text{L}$ , 2-fold dilution). By the combined use of the sample pretreatment column and short ODS column, the analysis time could be reduced to 1/3 as compared with those based on conventional columns. Therefore, the present technique is quite suitable for monitoring of therapeutic drugs in biological fluids.

#### 1. はじめに

生体液中の薬物濃度の定量は、薬物動態研究、臨床学上重要であり、吸光光度法、蛍光光度法等の光学分析法、バイオアッセイ、ガスクロマトグラフィー (GC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の分離分析法、免疫学的方法などが用いられてきた。こ

れら分析手法の中でHPLC法は、GC法で適用が制限される場合の多い極性の高い代謝物も取り扱うことが可能であり、また、分離性能も優れていることから、多成分の薬物の同時分析に適している分析方法といえる。このHPLC法を生体液中の薬物の定量に適応する場合、共存するタンパク質などの夾雑物の除去が不可欠であった。従来、タンパク質等の除去には、有機溶

媒や酸溶媒等による煩雑な前処理が必要であり正確かつ迅速な薬物の測定がなかなか困難であった。当社では、すでに試料溶液を直接注入する簡便な操作方法で生体液の除タンパク等の前処理を行うことが可能なTSKprecolumnシリーズを商品化し、オンライン自動前処理による各種薬物の測定について報告を行ってきた<sup>1)-6)</sup>。今回、我々は、このオンライン自動前処理カラムと微小シリカベースの逆相充填剤カラムを組み合わせた血中の微量薬物の高速・高分離能のための分析条件を種々検討し、分析条件の最適化を行ったので報告する。

## 2. 実験

### [1] カラム

カラムは、分析カラムTSKgel Super-ODS (内径4.6mm、長さ10cm、粒子径2.3ミクロン 全多孔性)及び前処理カラムTSKgel BSA-80Ts (内径4.6mm、長さ1.0cm、粒子径20ミクロン)を用いた。TSKgel Super-ODSは、2.3 $\mu$ mのシリカ粒子をベースとして、オクタデシル (ODS) 層をポリレーヤーで導入した超高速逆相充填剤であり、従来の5 $\mu$ m ODS-

15cmカラムの分離を1/4の分析時間で実現した超高速高性能カラムである。また、前処理カラムTSKgel BSA-80Tsは、残存シラノール基を徹底してエンドキャップしたODS-80Tsの表面を変性BSA (Bovine Serum Albumin) でコーティングすることにより、生体試料中のタンパク質等の高分子物質を除去し、薬物等の低分子物質をODS層に吸着することにより、簡便な操作で除タンパクを行える試料前処理用充填剤である<sup>7)-8)</sup>。

### [2] HPLCシステム

HPLCシステムは、送液ポンプCCPM-II、オートサンプラAS-8020、カラムオープンCO-8020 (冷却機構付)、紫外可視検出器UV-8020、バルブコントローラVC-8020、システムコントロール及びデータ処理は、システムコントローラSC-8020 (いずれも東ソー製)を使用した。また、送液ポンプ (前処理ポンプ及び分析ポンプ) とオートサンプラ及び前処理バルブの間には、ラインフィルター (1 $\mu$ m焼結フィルター) を装着した。検出器のセルは、マイクロフローセル (セル容量2 $\mu$ l) を用いた。Fig. 1 にシステムフローダイアグラムを示す。

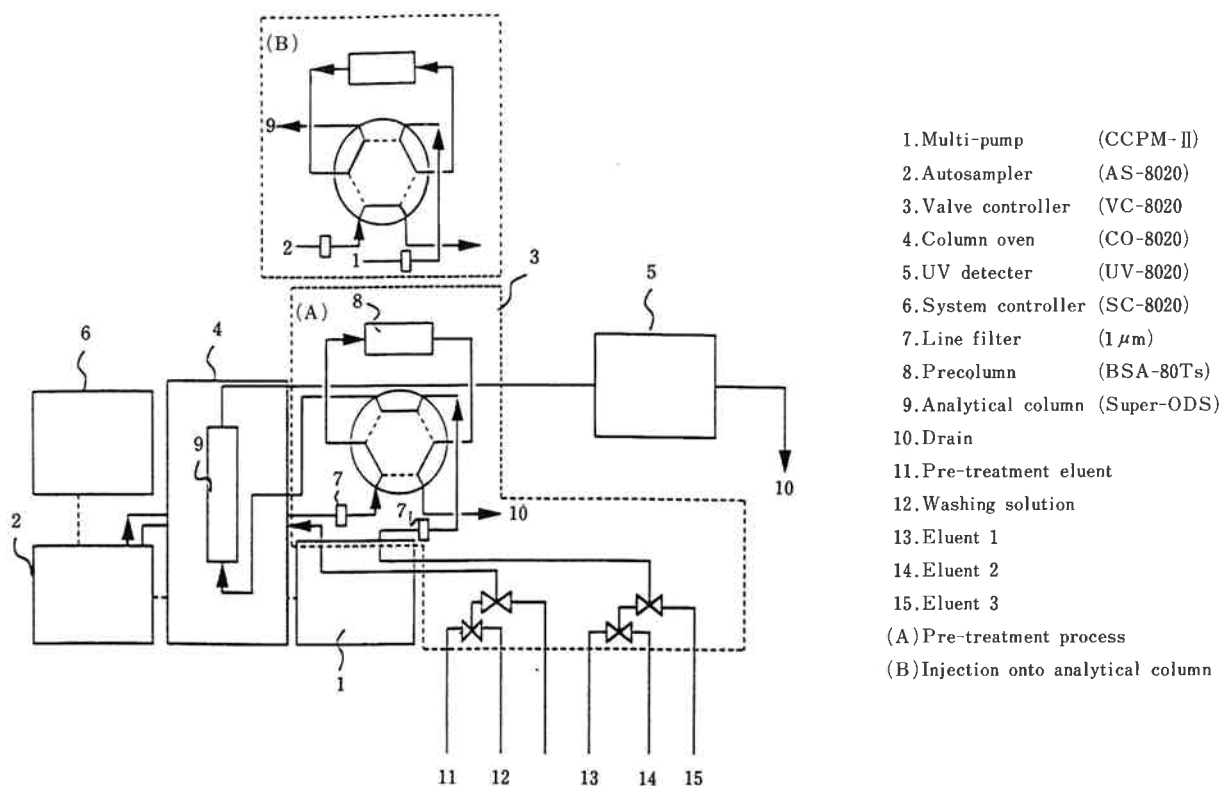


Fig. 1 Flow diagram for column switching HPLC

[3] 測定条件

(1) 前処理条件

試料は、オンライン自動前処理バルブを用いた前処理カラムにより Fig. 1 に示すシステムフローダイアグラムの (A) の状態にて除タンパク、濃縮等の前処理を行った後、(B) の状態に前処理バルブを切り換えるバックフラッシュ法により分離測定を行った。前処理液は、50mM過塩素酸ナトリウムを含む、50mMリン酸緩衝液 (pH6.8) を標準として用い、試料は全て、200mM過塩素酸ナトリウムで 1/2 希釈して1000  $\mu$ l 注入した。また、前処理液の流速は1.5ml/min、前処理時間3分、前処理カラム接続時間0.5分、洗浄時間16.5分とした。前処理カラムは、試料注入毎に50mMリン酸緩衝液 (pH6.8) / アセトニトリル (60/40v/v%) にて洗浄を行った。

(2) 分離条件

溶離液は、A液；50mMリン酸2水素ナトリウム (pH4.5) / アセトニトリル (72/28v/v%) 及びB液；50mMリン酸2水素ナトリウム (pH2.5) / アセトニトリル (72/28v/v%) を標準として用い、A液4分、B液8分のステップグラジエント溶出法により分離した。溶離液の流速は1.0ml/min、標準的分離温度は

25 $^{\circ}$ Cとし、検出波長254nmにて検出した。分析カラムは、試料注入毎に50mMリン酸緩衝液 (pH6.8) / アセトニトリル (60/40v/v%) にて洗浄を行った。

[4] 試薬及び試料

前処理液及び溶離液は特級試薬、HPLC用アセトニトリル及びイオン交換水を用いて調整した。標準薬物 Phenobarbital (PB)、Carbamazepine (CBZ)、Phenytoin (PHT)、Nitrazepam (NZP)、Diazepam (DZP) は、秤量後アセトニトリルに溶解した。Clonazepam (CZP) は、製剤中のアセトニトリル可溶化成分を用い、含有率より濃度を算出した。血清は、標準血清 (Bayer社製) を用い、標準添加血清は、標準薬物溶液を少量ずつ血清に添加して調整した。測定試料は全て0.5  $\mu$ mのマイジョリディスク (東ソー製) にて濾過した後、測定試料とした。

3. 結果及び考察

[1] 分離条件の検討

向精神薬6種類の一斉分析を短時間に行うことを目的として種々の分離条件について検討を行った。Fig. 2 溶離液のアセトニトリル濃度及びpHの影響を示す。

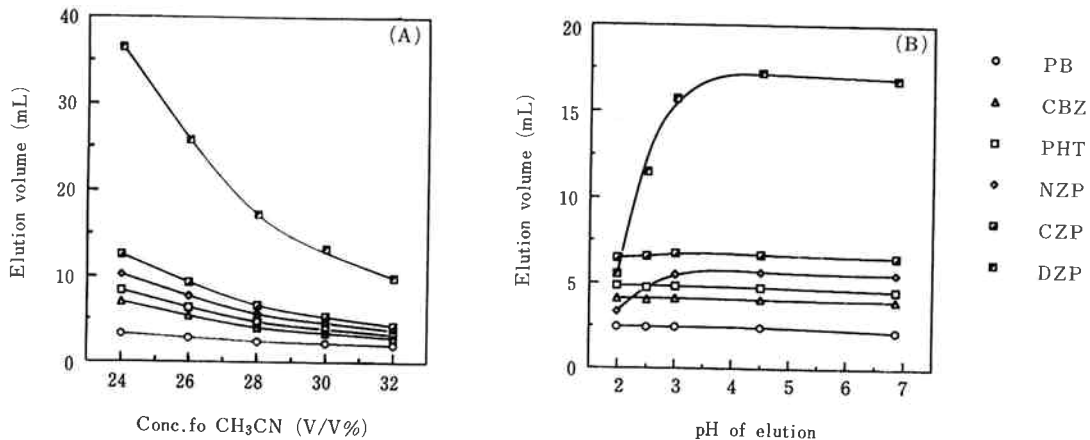


Fig. 2 Effect of CH<sub>3</sub>CN conc. and pH in eluent on retention volume

Conditions:

Sample ; 1. PB (12.88  $\mu$ g/mL), 2. CBZ (5.0  $\mu$ g/mL), 3. PHT (8.1  $\mu$ g/mL)  
4. NZP (25.25 ng/mL), 5. CZP (25.0 ng/mL), 6. DZP (20.0  $\mu$ g/mL)

Column ; TSKgel Super-ODS (4.6mm ID  $\times$  10cm)

Flow rate ; 1.0 mL/min

Eluent ; (A) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5) / CH<sub>3</sub>CN (x/y)  
(B) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH x) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)

Sample ; 50  $\mu$ L Injection

Temp ; 25 $^{\circ}$ C

Detect ; UV (254nm)

## (1) 分離温度の影響

分離温度を20℃～40℃の範囲で変化させた結果、各薬物の溶出位置は、分離温度の上昇とともに溶出が早くなる傾向が認められ、25℃において最も良好な分離を示した。

## (2) アセトニトリル濃度の影響

溶離液のアセトニトリル濃度を24%～32%の範囲で変化させた結果、アセトニトリル濃度の増加とともに溶出容量の減少が認められた。溶離液のアセトニトリル濃度28%において良好な分離を示したが、DZPの溶出は、他の5種類の薬物に比べ溶出が遅く6種類の薬物全ての分離に約20分程度の分析時間が必要であった。

## (3) 溶離液のpHの影響

溶離液のpHを2.5～6.8の範囲で変化させた結果、PB、CBZ、PHT、CZPについては溶離液のpHに依存せずほぼ一定の溶出容量を示したが、NZP、DZPについては溶離液のpH4.5以下において溶出容量が極端に減少する傾向が認められた。

## (4) 分離条件の最適化

短時間に6種類全ての薬物の分離を行うためには、

溶出の遅いDZPを他の5種類の薬物が良好な分離のまま早く溶出する必要がある。DZPの溶出を早くするためには、5種類の薬物分離後溶離液の有機溶媒濃度を高くするか、あるいは、溶離液のpHを低くするステップグラジエント溶出法が考えられる。前者の場合、溶媒切り換え後の溶離液あるいは試料からの汚れによるゴーストピーク、ベースラインの変動が大きくなることから、後者のpHのステップグラジエント溶出法を採用した。

## 〔2〕 前処理条件の検討

オンライン自動前処理に伴う前処理時間、前処理液の過塩素酸ナトリウム濃度、pH、希釈液等種々の前処理条件について検討を行った。

## (1) 前処理時間及びカラム接続時間

標準薬物6種類を用いて前処理時間及び流速の検討を行った結果、試料注入後の前処理時間（前処理液通液時間）が3分～8分（通液量4.5ml～12ml）の範囲で一定の面積値を示した。また、前処理後の分析カラムとの接続時間は、0.5分（通液量0.75ml）以上で一定の面積値を示した。血清側定時において前処理時間3分で血清中のタンパク質等の血清由来の成分をほと

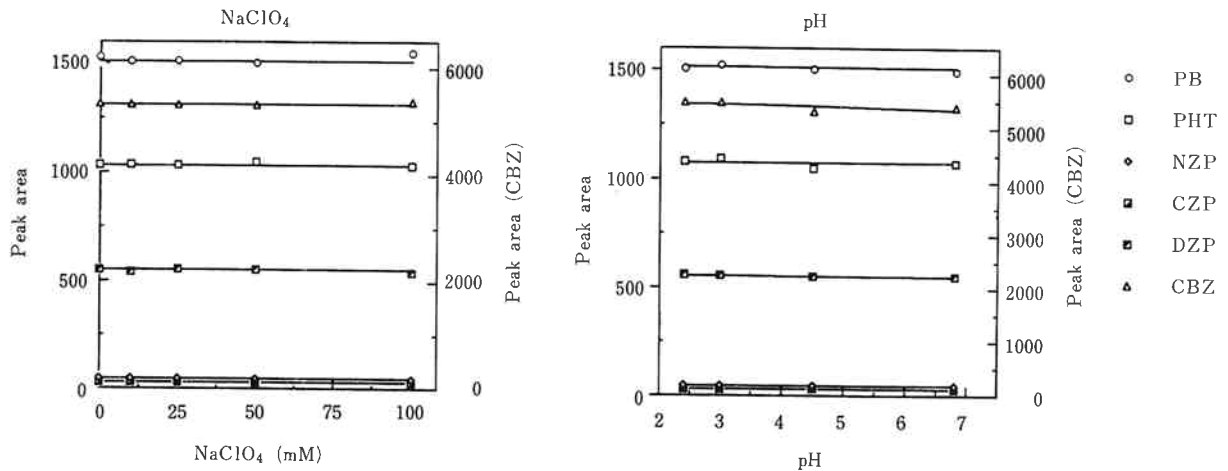


Fig. 3 Effect of NaClO<sub>4</sub> conc. and pH in the eluent on peak areas

Conditions :

Sample ; 1.PB(12.88 μg/mL), 2.CBZ(5.0 μg/mL), 3.PHT(8.1 μg/mL), 4.NZP(25.25ng/mL), 5.CZP(25.0ng/mL), 6.DZP(20.0 μg/mL)

Column ; TSKgel Super-ODS(4.6mmID×10cm)(analysis), TSKprecolumn BSA-80Ts(4.6mmID×1.0cm)(pretreat)

Flow rate ; 1.0mL/min(analysis), 1.5mL/min(pretreat)

Eluent ; (A)50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH4.5)/CH<sub>3</sub>CN(72/28), (B)50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH2.5)/CH<sub>3</sub>CN(72/28), (C)50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH6.8)/CH<sub>3</sub>CN(60/40)

pretreat ; 50mM Phosphate Buffer(pH x) + ymM NaClO<sub>4</sub>

gradient ; (A)4min (B)8min (C)5min

Eluent program ; Pretreatment 3min, Injection 0.5min, Column wash 16.5min

Sample ; 1000 μL Injection (2-fold dilution), Temp. ; 25℃, Detect ; UV(254nm)

んど除去できることから前処理時間を3分とし、カラム接続時間を0.5分とした。

### (2) 前処理及び洗浄液

前処理液の過塩素酸ナトリウム濃度及び前処理液のpHの影響をFig. 3に示す。標準添加血清を試料として用いて前処理液中の過塩素酸ナトリウム濃度及びpHを変化させたが、各薬物のピーク面積に影響は認められなかった。しかしながら、前処理液のpHが4.5以下においては、数十検体(血清量25ml程度)で前処理カラム及び分析カラムの劣化が認められた。前処理液のpHを6.8に変更することにより200検体(血清量100ml)までカラムの耐久性を改善することが可能であった。また、血清中の脂質等の疎水性の強い成分によるカラムの汚染を防ぐために、試料注入毎に前処理カラム及び分析カラムを40%のアセトニトリルを添加した前処理液にて洗浄した。

### (3) 希釈液

標準添加血清での回収率の検討において標準添加血清を前処理液で希釈した場合、疎水性の強いDZPの回収率が40%程度と他の薬物に比べ低い値を示した。回収率の低い原因として血清タンパク質との結合が考えられることから、血清希釈液の種類及び濃度の検討を行った結果をFig. 4に示す。希釈液に添加した過塩素酸ナトリウム、アセトニトリル及びラウリル硫酸ナ

トリウム(SDS)のいずれにおいても、濃度の増加とともにDZPの回収率が上昇した。しかしながら、保持力の弱い薬物(PB)は、アセトニトリル濃度の増加とともに前処理カラムに保持されなくなるため、回収率が低下した。また、SDS添加では、カラムの耐久性に問題が生じたため、希釈液を200mM過塩素酸ナトリウムとした。

### [3] 汎用逆相カラムとの分離比較

汎用シリーズであるTSKgel ODS-80T<sub>s</sub>、BSA-ODS及びTSKgel Super-ODS、BSA-80T<sub>s</sub>による標準薬物6種類のオンライン自動前処理による分離比較をFig. 5に示す。汎用の5 $\mu$ m ODS-15cmカラムであるTSKgel ODS-80T<sub>s</sub>に比べTSKgel Super-ODSでは、前処理時間を含め20分と1/3の短時間で分離測定が可能である。また、感度に関しても約2倍程度優れていた。

### [4] 回収率及び繰り返し再現性

標準薬物及び標準添加血清を測定した時のクロマトグラムをFig. 6に示す。標準添加血清においても、血清由来成分の妨害をほとんど受けることなく薬物の分離測定が可能であった。実際に投与される薬物の治療濃度及び中毒濃度は薬物により異なり、数十ng/ml~数十 $\mu$ g/mlの範囲である。各薬物の治療範囲についての回収率及び繰り返し再現性について調べた結果を

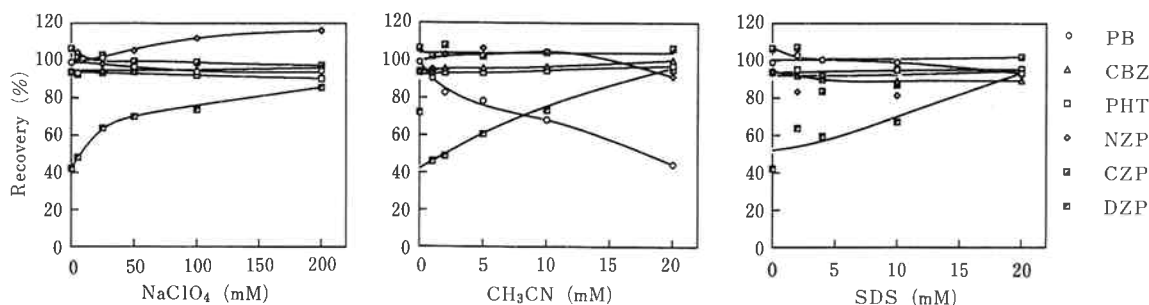


Fig. 4 Effect of additives in the diluting solution on recovery

Conditions :

Sample ; 1. PB(12.88  $\mu$ g/mL), 2. CBZ(5.0  $\mu$ g/mL), 3. PHT(8.1  $\mu$ g/mL), 4. NZP(25.25ng/mL),  
5. CZP(25.0ng/mL), 6. DZP(20.0  $\mu$ g/mL)

Column ; TSKgel Super-ODS(4.6mmID $\times$ 10cm)(analysis), TSKprecolumn BSA-80T<sub>s</sub>(4.6mmID $\times$ 1.0cm)(pretreat)

Flow rate ; 1.0mL/min(analysis), 1.5mL/min(pretreat)

Eluent ; (A)50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH4.5)/CH<sub>3</sub>CN(72/28), (B)50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH2.5)/CH<sub>3</sub>CN(72/28),  
(C)50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH6.8)/CH<sub>3</sub>CN(60/40)

pretreat ; 50mM Phosphate Buffer(pH6.8)+50mM NaClO<sub>4</sub>

gradient ; (A)4min (B)8min (C)5min

Eluent program ; Pretreatment 3min, Injection 0.5min, Column wash 16.5min

Sample ; 1000  $\mu$ L Injection (2-fold dilution), Temp. ; 25 $^{\circ}$ C. Detect ; UV(254nm)

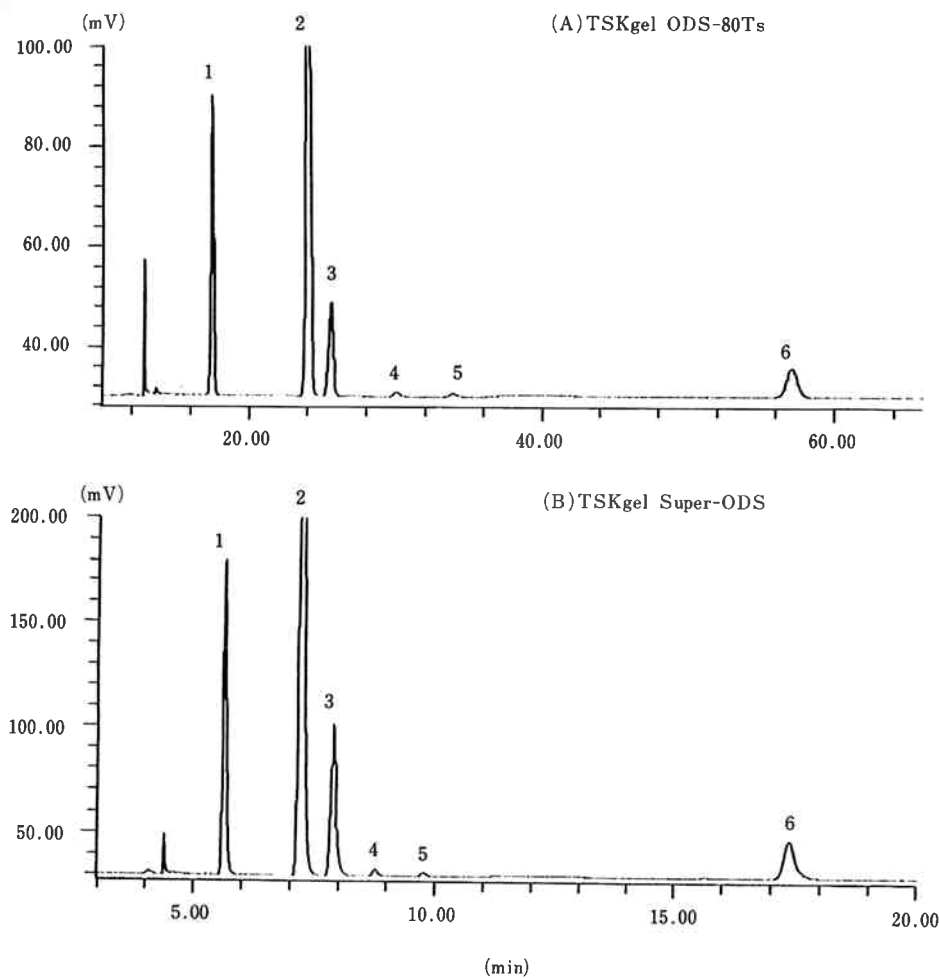


Fig. 5 Comparison of std. sample on TSKgel Super-ODS and ODS-80Ts

Conditions :

Sample ; 1.PB(12.88  $\mu\text{g/mL}$ ), 2.CBZ(5.0  $\mu\text{g/mL}$ ), 3.PHT(8.1  $\mu\text{g/mL}$ )  
4.NZP(25.25ng/mL), 5.CZP(25.0ng/mL), 6.DZP(20.0  $\mu\text{g/mL}$ )

Column ; (A) TSKgel ODS-80Ts(4.6mmID $\times$ 15cm)(analysis)  
TSKprecolumn BSA-ODS(4.6mmID $\times$ 3.5cm)(pretreat)  
(B) TSKgel Super-ODS(4.6mmID $\times$ 10cm)(analysis)  
TSKprecolumn BSA-80Ts(4.6mmID $\times$ 1.0cm)(pretreat)

Flow rate ; 1.0mL/min(analysis),  
1.5mL/min(pretreat)

Eluent ; (A) 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH4.5)/ $\text{CH}_3\text{CN}$ (72/28)  
(B) 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH2.5)/ $\text{CH}_3\text{CN}$ (72/28)  
(C) 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH6.8)/ $\text{CH}_3\text{CN}$ (60/40)

pretreat ; 50mM Phosphate Buffer(pH6.8)+50mM  $\text{NaClO}_4$

gradient ; (A) 1.25min 2.20min 3.5min, (B) 1.4min 2.8min 3.5min

Eluent program ; Pretreatment 10min(A) 3min(B), Injection 3min(A) 0.5min(B)  
Column wash 17min(A) 16.5min(B)

Sample ; 1000  $\mu\text{L}$  Injection (2-fold dilution)

Temp. ; 25 $^\circ\text{C}$

Detec ; UV(254nm)

Table 1 に示す。

(1) 回収率

各薬物をカラムに直接注入したときのピーク面積から算出した標準薬物の回収率は、各薬物のいずれの治療濃度範囲においてもほぼ80%以上の良好な回収率が得られた。また、標準添加血清では、各薬物をカラムに直接注入したときのピーク面積から算出した回収率が75%以上、カラムスイッチング法にて測定したときの標準薬物のピーク面積より算出した場合の回収率が90%以上と良好な結果が得られた。

Table 2 に標準薬物及び標準添加血清での各薬物の治療濃度範囲における薬物濃度とピーク面積の関係を示す。標準薬物及び標準添加血清とも、薬物濃度とピーク面積の間には良好な直線関係が認められ、本分析システムが、血中薬物濃度の測定に適用可能であることが示唆された。

(2) 繰り返し再現性

各薬物の治療濃度範囲前後における  $n = 6$  での変動係数 (CV) は、薬物において治療濃度が異なるためバラツキがあるが、標準薬物で4%以内、標準添加血

清では、血清中の微量成分の影響を受けるため標準薬物よりもCV値が悪くなるものの5%以内と、一般的に医療分野における血中薬物濃度測定で許容されるCV値が5%以下を十分満足する結果であった。

[5] 各種薬物への応用

気管支喘息の治療薬として広く知られているテオフィリンと飲食物あるいは感冒薬及び解熱鎮痛薬等に含まれるカフェインを同時測定したクロマトグラムを Fig. 7 に示す。また、Fig. 8 に抗不整脈剤として知られているリドカインのクロマトグラムを、Fig. 9 に精神神経薬としてうつ病や抗うつ状態の治療に使用されているイミプラミン、デシプラミン及びノルトリプチンの同時測定したクロマトグラムを示す。分離条件を最適化することにより、短時間に且つ高感度に血清中の薬物の測定が可能であった。

[6] 結 論

オンライン自動前処理法により、従来煩雑であった前処理を行うことなく簡便に血清中の薬物の前処理を行うことが可能となり、分析カラムとしてTSKgel Super-ODSと組み合わせることにより、従来の測定に

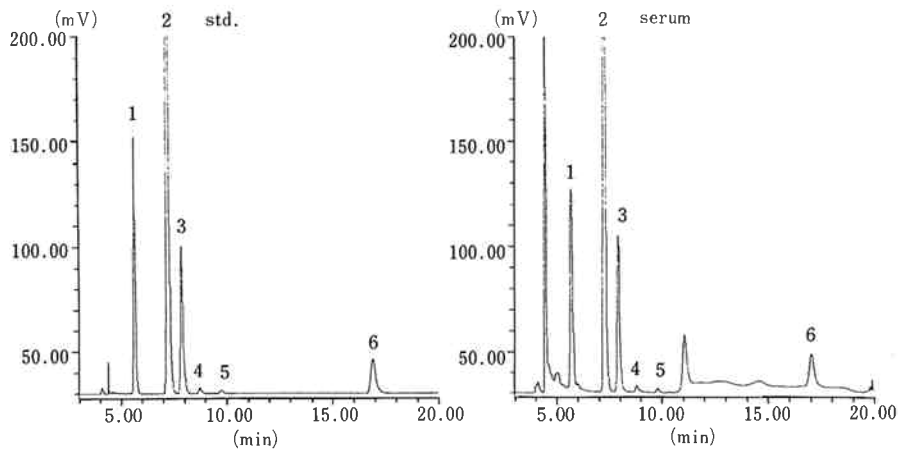


Fig. 6 Chromatograms of std. and serum on on-line HPLC system

Conditions :

Sample ; 1. PB (12.88  $\mu\text{g/mL}$ ), 2. CBZ (5.0  $\mu\text{g/mL}$ ), 3. PHT (8.1  $\mu\text{g/mL}$ ), 4. NZP (25.25  $\text{ng/mL}$ ), 5. CZP (25.0  $\text{ng/mL}$ ), 6. DZP (20.0  $\mu\text{g/mL}$ )

Column ; TSKgel Super-ODS (4.6 mm ID  $\times$  10 cm) (analysis), TSKprecolumn BSA-80T<sub>s</sub> (4.6 mm ID  $\times$  1.0 cm) (pretreat)

Flow rate ; 1.0 mL/min (analysis), 1.5 mL/min (pretreat)

Eluent ; (A) 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28), (B) 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28), (C) 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8) / CH<sub>3</sub>CN (60/40)

pretreat ; 50 mM Phosphate Buffer (pH 6.8) + 50 mM NaClO<sub>4</sub>

gradient ; (A) 4 min (B) 8 min (C) 5 min

Eluent program ; Pretreatment 3 min, Injection 0.5 min, Column wash 16.5 min

Sample ; 1000  $\mu\text{L}$  Injection (2-fold dilution), Temp. ; 25  $^{\circ}\text{C}$ , Detect ; UV (254 nm)

Table 1 Recovery and repeatability using std. and serum sample

	STD. SAMPLE			SERUM SAMPLE SPIKED		
	Conc.	Recovery(%)*	C.V.(%)***	Recovery(%)*	Recovery(**)**	C.V.(%)***
1. PB [ $\mu$ g/mL]	2.58	93.28	0.14	86.35	92.58	1.35
	5.15	89.32	0.11	82.26	92.43	3.02
	12.88	92.57	0.32	83.29	89.98	0.68
2. CBZ [ $\mu$ g/mL]	1.00	98.02	0.31	95.06	96.98	1.32
	2.00	93.98	0.20	98.60	104.92	0.29
	5.00	97.52	0.27	97.50	99.97	1.10
3. PHT [ $\mu$ g/mL]	1.62	94.53	0.26	94.53	102.42	1.79
	3.24	90.39	0.35	90.39	107.49	0.55
	8.10	94.10	0.30	94.10	100.83	1.03
4. NZP [ng/mL]	5.05	101.95	0.97	103.72	101.74	4.67
	10.10	94.43	1.05	97.57	103.32	2.91
	25.25	96.25	1.12	97.07	100.86	2.09
5. CZP [ng/mL]	5.00	98.61	3.19	100.31	101.72	3.24
	10.00	94.05	1.63	88.46	94.06	1.69
	25.00	91.37	2.07	90.52	100.94	1.00
6. DZP [ $\mu$ g/mL]	0.06	82.93	0.75	76.11	91.78	2.54
	0.11	78.54	0.62	79.59	101.34	1.22
	0.28	81.66	0.65	79.78	97.70	0.88

\* Direct analysis using analytical column.

\*\* Column switching HPLC analysis,

\*\*\* Reproducibility calcd. by peak areas (n=6)

Table 2 Correlation between sample conc. and peak areas

	PB		CBZ		PHT	
	STD	SERUM	STD	SERUM	STD	SERUM
Therapic range	1.29~25.75 $\mu$ g/mL		0.50~10.00 $\mu$ g/mL		0.81~16.20 $\mu$ g/mL	
A	60.143	58.001	590.16	590.55	73.416	73.668
B	0.359	-14.918	-14.423	-14.986	-2.136	1.212
r	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	NZP		CZP		DZP	
	STD	SERUM	STD	SERUM	STD	SERUM
Therapic range	2.53~50.50 $\mu$ g/mL		2.50~50.00 $\mu$ g/mL		0.028~0.56 $\mu$ g/mL	
A	1.064	1.073	0.802	0.739	1.012	0.989
B	-0.472	-0.378	-0.68	-0.228	-6.506	-5.593
r	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000

Regression curve ;  $Y = Ax + B$ 

Sampling data (n) ; 6



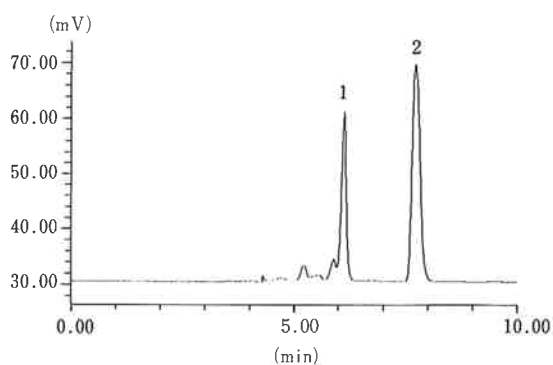


Fig. 7 Chromatogram of drugs spiked, in serum on on-line HPLC system

Conditions :

Sample ; 1. Theophyllin (5  $\mu$ g/mL), 2. Caffein (5  $\mu$ g/mL)  
 Column ; TSKgel Super-ODS (4.6mmID  $\times$  10cm) (analysis)  
 TSKprecolumn BSA-80T<sub>5</sub> (4.6mmID  $\times$  1.0cm) (pretreat)  
 Flow rate ; 1.0mL/min (analysis), 1.5mL/min (pretreat)  
 Eluent ; (A) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH4.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)  
 (B) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)  
 (C) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.8) / CH<sub>3</sub>CN (60/40)  
 pretreat ; 50mM Phosphate Buffer (pH6.8) + 50mM NaClO<sub>4</sub>  
 gradient ; (A) 4min (B) 8min (C) 5min  
 Eluent program ; Pretreatment 3min, Injection 0.5min,  
 Column wash 16.5min (B)  
 Sample ; 1000  $\mu$ L Injection (2-fold dilution)  
 Temp. ; 25°C, Detect ; UV (254nm)

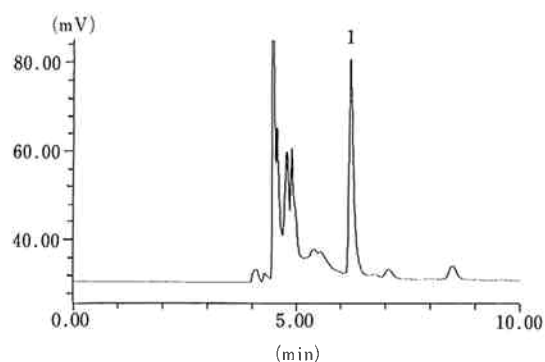


Fig. 8 Chromatogram of drug spiked in serum on on-line HPLC system

Conditions :

Sample ; 1. Lidocain (5  $\mu$ g/mL)  
 Column ; TSKgel Super-ODS (4.6mmID  $\times$  10cm) (analysis)  
 TSKprecolumn BSA-80T<sub>5</sub> (4.6mmID  $\times$  1.0cm) (pretreat)  
 Flow rate ; 1.0mL/min (analysis), 1.5mL/min (pretreat)  
 Eluent ; (A) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH4.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)  
 (B) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)  
 (C) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.8) / CH<sub>3</sub>CN (60/40)  
 pretreat ; 50mM Phosphate Buffer (pH6.8) + 50mM NaClO<sub>4</sub>  
 gradient ; (A) 4min (B) 8min (C) 5min  
 Eluent program ; Pretreatment 3min, Injection 0.5min,  
 Column wash 16.5min (B)  
 Sample ; 1000  $\mu$ L Injection (2-fold dilution)  
 Temp. ; 25°C, Detec ; UV (254nm)

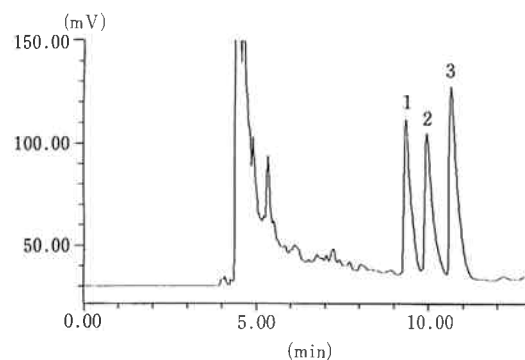


Fig. 9 Chromatogram of drugs spiked in serum on on-line HPLC system

Conditions :

Sample ; 1. Imipramine (2  $\mu$ g/mL), 2. Desipramine (2  $\mu$ g/mL),  
 3. Nortriptyline (2  $\mu$ g/mL)  
 Column ; TSKgel Super-ODS (4.6mmID  $\times$  10cm) (analysis)  
 TSKprecolumn BSA-80T<sub>5</sub> (4.6mmID  $\times$  1.0cm) (pretreat)  
 Flow rate ; 1.0mL/min (analysis)  
 1.5mL/min (pretreat)  
 Eluent ; (A) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH4.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)  
 (B) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5) / CH<sub>3</sub>CN (72/28)  
 (C) 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.8) / CH<sub>3</sub>CN (60/40)  
 pretreat ; 50mM Phosphate Buffer (pH6.8) + 50mM NaClO<sub>4</sub>  
 gradient ; (A) 4min (B) 8min (C) 5min  
 Eluent program ; Pretreatment 3min, Injection 0.5min,  
 Column wash 16.5min (B)  
 Sample ; 1000  $\mu$ L Injection (2-fold dilution)  
 Temp. ; 25°C  
 Detec ; UV (254nm)

比べ短時間かつ高感度に血清中の薬物の分離定量が可能であった。

今回検討を行った前処理条件及び分離条件を基本条件として、各種薬物の分離条件及び検出条件等を最適化することにより生体試料中の薬物の高速、高感度分析への適用が可能であると考えられる。

## 参 考 文 献

- 1) H. Yosida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, chem. Pharm. Bull., 30, 3827-3830 (1982).
- 2) I. Morita, T. Masujima, H. Yosida and H. Imai, Bunseki Kagaku, 33, E235-E240 (1984).
- 3) I. Morita, T. Masujima, H. Yosida and H. Imai, Anal. Biochem., 151, 358-364 (1985).
- 4) G. Tamai, I. Morita, T. Masujima, H. Yosida and H. Imai, J. Pharm. Sci., 73, 1825-1827 (1984)

- 5) “前処理装置を用いた生体試料の分析方法” セパレーションレポートNo.29  
 6) “前処理用充填カラムを用いた分析条件の検討” セパレーションレポートNo.68  
 7) H. Yosida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, chem. Pharm. Bull., 30, 2287-2290 (1982)  
 8) H. Yosida, I. Morita, G. Tamai, T. Tsuru, N. Takai and H. Imai, chromatographia, 19, 466-472 (1984)



著者

氏名 山崎 浩行  
 Hiroyuki YAMASAKI  
 入社 昭和54年3月16日  
 所属 ゲル製造部  
 セパレーションセンター  
 副主任研究員



著者

氏名 北村 隆司  
 Takashi KITAMURA  
 入社 昭和41年3月20日  
 所属 南陽研究所  
 主任研究員



著者

氏名 森山 弘之  
 Hiroyuki MORIYAMA  
 入社 昭和55年4月1日  
 所属 ゲル製造部  
 セパレーションセンター  
 センター長