

## — 総 説 —

# 医薬品およびその代謝物の高速液体クロマトグラフ分析に おける最近の進歩

## — 生体試料の直接注入 —

萩 中 淳

### Recent Progress in High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of a Drug and its Metabolites — Direct Injection of Biological Samples —

Jun Haginaka

#### Summary

Recent progress in a high-performance liquid chromatographic method has been described for the assay of a drug and its metabolites in biological fluids. The methods using a protein-coated ODS silica, an internal surface reversed-phase silica and a size exclusion polymer as a stationary phase, and a micellar solution as an eluent on a reversed-phase silica were discussed on direct injection of biological samples onto a column together with their applications to the assay of a drug and its metabolites in biological samples. A column-switching method was also discussed briefly.

#### 1. はじめに

血液, 尿, 唾液などの体液試料中の薬物濃度の測定に, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は不可欠な手段となっている。生体試料中には, タンパク質をはじめとして多くの共存物質が含まれているので, その中の微量の薬物およびその代謝物を分析するには, 除タンパク, 抽出, 濃縮などの前処理操作を必要とする場合が多い。しかし, 前処理操作は時間と労力を要し, かつ誤差の原因となる。そこで, 生体試料の直接注入法あるいは前処理の自動化が試みられている。生体試料の直接注入法を中心に, 薬物の HPLC 分析における最近の進歩について述べる。

#### 2. 生体試料の直接注入

生体試料中の薬物およびその代謝物の分析は, 主に, 逆相クロマトグラフィーあるいは逆相イオン対クロマト

グラフィーで行われている。血清あるいは血漿などのタンパク質成分を多く含む試料を直接逆相系のカラムに注入すると, カラム圧の上昇あるいはカラム性能の劣化が起こる。これは, フィルターあるいはカラムの先端部分でのタンパク変性による凝集・沈澱あるいは高分子成分の吸着によるものである。タンパク質の変性の度合いは, カラム温度, 移動相組成, 固定相の種類に依存する。逆相系のカラムとして最もよく使用されているのは, アルキル鎖長 C<sub>8</sub> および C<sub>18</sub> のカラムである。Nice ら<sup>1</sup> は, アルキル鎖長とタンパク質の回収率について検討したところ, Ovalbumin では C<sub>3</sub> で最大の回収率 78% を示し, C<sub>8</sub> および C<sub>18</sub> では, それぞれ 22 および 8% であると報告している。また, Cohen ら<sup>2</sup> は, papain の逆相クロマトグラフ分離において, 固定相 (アルキル鎖) とタンパク質 (papain) との接触時間が変性に大きな役割を占めると報告している。図 1 は, 勾配分離により papain を C<sub>4</sub> カラムにより分離したものである。ピーク 1 は, 未変性の (活性な) papain を, ピーク 2 は, 変性した (不活性な) papain のピークである。S は, 勾配分離のスタートを示し, I は試料の注入を示している。ク

薬品分析学 I 研究室, Department of the First Analytical Chemistry.

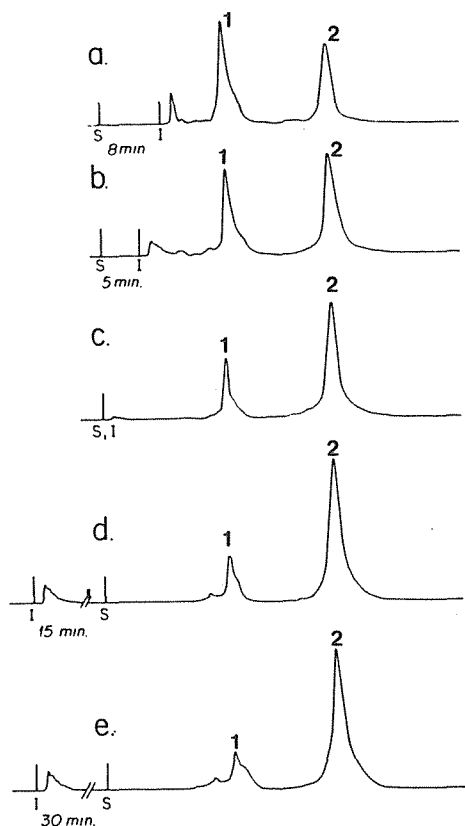


Fig. 1 Chromatographic behavior of papain as a function of incubation time on the column<sup>2</sup>. Column, C4 bonded phase on 10- $\mu$  m LiChrosphere SI 500; mobile phase A, 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.2; mobile phase B, H<sub>2</sub>O / 1-propanol, 55 / 45 (v/v), in which the total H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentration is 10 mM; linear gradient from 5 to 85% mobile phase B in 30 min; flow rate, 1 mL/min; sample, 20  $\mu$  L/mL papain in mobile phase A (40-60  $\mu$  g of sample); temperature, 5°C; detection; 210nm. I, injection; S, start of the gradient.

ロマトグラム(a)から(e)へと、固定相との接触時間が長くなるにつれ、ピーク2のピーク面積が増加している、すなわち変性が進んでいることを示している。タンパク変性を抑えるようにカラム温度、移動相組成を調節しても、図1からわかるように逆相系(C<sub>8</sub>およびC<sub>18</sub>)のカラムにタンパク質を含む血清などの生体試料を直接注入することは避ける必要がある。しかし、逆相系カラムへの血清試料の直接注入(緩衝液により希釈して注入した

場合も含めて)による薬物の分析法も報告されている。<sup>34</sup>これらの報告では、カラムの耐久性についてはほとんど述べられていない。Wahlund および Arvidsson ら<sup>5-7</sup>は、逆相系カラムへの血清試料の直接注入によるカラム効率あるいはカラム圧の変化について詳細に検討している。移動相に添加する有機溶媒の含量が高く、粒子径が小さい程カラム効率の低下が速く、流速については、最適流速があり、遅くても速くてもカラムの劣化が速いと報告している。移動相組成にもよるが、プレカラム(分離カラムの保護の目的で使用)は、血清試料10  $\mu$  Lを10回程度注入ごとに取り替える必要があり、1回注入ごとに、約0.9~2.2kg/cm<sup>2</sup>のカラム圧の上昇がみられたと報告している。

上述のように血清などの生体試料を逆相系のカラムに直接注入するとカラム効率の低下およびカラム圧の上昇が起こるために、除タンパクなどの前処理操作が必要である。しかし、タンパク変性を避ける工夫をすることにより血清試料の直接注入も可能となる。血清試料の直接注入可能なカラムとして、protein-coated ODS カラム<sup>8-16</sup>、内面逆相シリカカラム<sup>17-22</sup>およびサイズ排除カラム(ビニルアルコールのポリマー)<sup>23</sup>が開発されている。

一方、Cline Love ら<sup>24-26</sup>はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)や非イオン性の界面活性剤であるポリオキシエチレンドデシルエーテル(Brij-35)を臨界ミセル濃度(CMC)以上に加えた移動相を用いるミセルクロマトグラフィーにより逆相系のカラムを用いて血清試料の直接注入が可能であると報告している。また、カラムスイッチング法を用いる生体試料の直接注入も行なわれている。

## 2. 1 protein-coated ODS カラム

吉田ら<sup>8</sup>は、変性した血漿タンパク質でコーティングされた ODS シリカは、血漿タンパク質に対する親和性を持たないが、薬物のような小さな分子に対しては逆相充填剤としての特性を持つことを報告している。このカラムは、protein-coated ODS のカラムと呼ばれている。図2は、protein-coated ODS カラムの概念図である。<sup>13</sup>充填剤粒子の外表面は、変性タンパク質で覆われ、細孔内部は、ODS 基が化学結合した状態を示している。薬物を含んだ血清をこのカラムに注入すると、血清中のタンパク質(アルブミンやグロブリン)は、巨大分子なので細孔内に入らず、また、外表面に吸着されることなくカラムを素通りする。それに対して薬物は小分子なので細孔内に拡散し疎水性表面で吸着され溶出が遅れる。従って、除タンパクや抽出などの前処理を行わずに、直接血

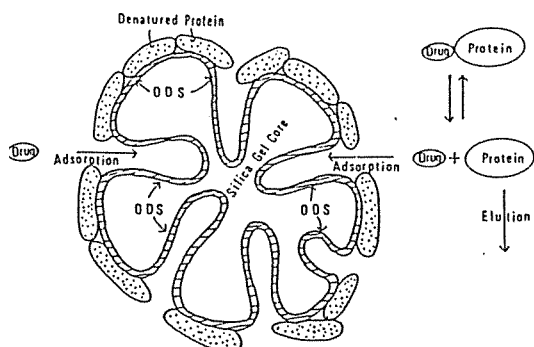


Fig. 2 Illustrated concept of protein-coated ODS resin<sup>13</sup>.

青試料を注入し、薬物を分離・定量することが可能となる。図3は、メトトレキサートを含む血漿を分析した際のクロマトグラムを示している。血漿タンパク質は、ポイドポリウムに溶出し、メトトレキサートは溶離液を変えた後、ただちに溶出している。<sup>8</sup> 一般に血清中の薬物は、血清タンパク質と結合し、遊離薬物と平衡状態にある。血清試料をカラムに注入すると、移動相によって希釈されるため平衡がずれたり、結合部位のタンパク質の部分的な変性が起こることにより遊離の薬物量が増加する。その程度すなわち薬物の回収率は、本カラムでは、ほぼ、100%であると報告されている。すなわち、総薬物量を定量していることになる。

このカラムは、分析用のカラムとしての用途よりは、後で述べるカラムスイッチング法の前処理カラムとしての用途が多いようである。前処理用のカラムとして、BSAをODSシリカ表面に共有結合させたカラム(BSA-ODSカラム)が市販されている。

## 2. 2 内面逆相シリカカラム

図4に内面逆相(internal surface reversed-phase, ISRP)シリカカラムの概念図を示したが、親水性の外表面と疎水性細孔内表面とを持っているのが特徴である。<sup>11</sup> protein-coated ODSカラムの場合と同様に、血清中のタンパク質(巨大分子)は、サイズ排除により細孔内に入

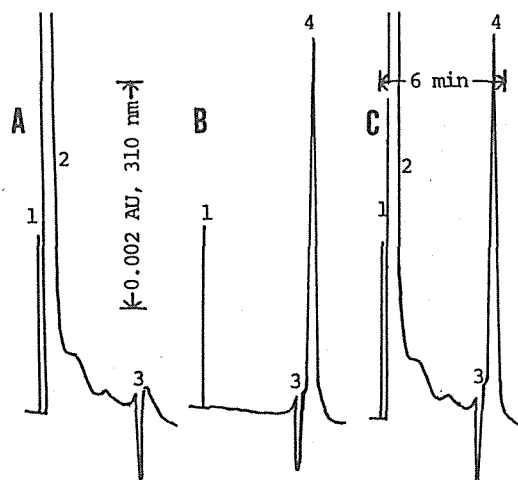


Fig. 3 Chromatograms of methotrexate analysis<sup>8</sup>. Column, protein-coated ODS column (6cm×4mm, 20-32 μm); eluent A, phosphate saline (pH 7.4); eluent B, eluent A/acetonitrile (92/8, v/v); eluent was changed from A to B; flow rate, 1.5mL/min, temperature, 30°C; detection, 310nm. Sample; A, human plasma (50 μL); B, methotrexate (2.0 μg/mL, 50 μL); C, human plasma spiked with methotrexate (2.0 μg/mL, 50 μL). Signals: 1, injection marker; 2, proteins and others; 3, buffer change drift; 4, methotrexate.

れず、薬物(小分子)だけが細孔内表面の固定相と疎水性相互作用を持つので血清試料の直接注入が可能となる。内面逆相シリカは図5の反応により合成される。<sup>11</sup> 平均粒子径5 μm, 平均細孔径80 Åのシリカの全表面のシラノール(Si-OH)基を、γ-グリンドキントリメトキシシランと反応させてジオールシリカに誘導し、これにカルボニルジイミダゾールの存在下 glycyl-phenylalanyl-phenylalanine (Gly-Phe-Phe)を反応させる。この反応によって平均細孔径は52 Åとなる。次に、カルボキシピペチダーゼAを用いて加水分解する。この酵素はペプチドのC末端のアミノ酸残基を端から順に切断する。しかし、それ自身が巨大分子(分子半径32 Å)なので細孔内には侵入できない。その結果、細孔内表面のGly-Phe-Pheはそのまま残り、外表面の2個のPheは切断されてGlyが末端に残る。そのため、この内面逆相シリカ固定相はサイズ排除、逆相吸着(Phe側鎖のフェニル

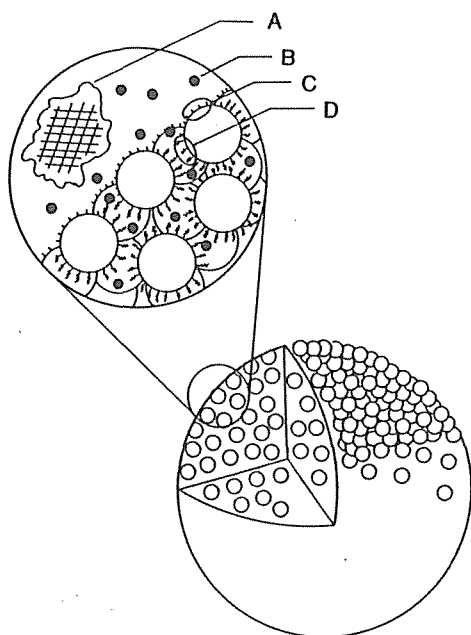


Fig. 4 Cutaway view of internal surface reversed-phase (ISRP) support particulate.<sup>17</sup> (A) protein, (B) analyte, (C) hydrophilic glycerylpropyl bonded external phase, (D) hydrophobic polypeptide internal partitioning phase.

基), イオン交換 (細孔内固定相の Phe の C 末端カルボキシル基および外表面固定相の Gly の C 末端カルボキシル基) の 3 つの機能を併せ持っている.<sup>17</sup> イオン交換能を持つ点が, 前述の protein-coated ODS カラムと異なっている. このカラムの弱点のひとつに, 移動相条件の選択範囲の問題がある. 有機溶媒の含有率については, アセトニトリルでは 25 (v/v) % 以下, イソプロピルアルコールでは 20% 以下, テトラヒドロフランでは 10% 以下, 全体では, 25% 以下が望ましいとされている. また, pH については 6.0~7.5, イオン強度については 0.1~0.2 が望ましくとされている. しかし, 水溶性薬物をこの移動相の範囲内で血清成分から分離することは難しい. 後述するミセルクロマトグラフィーとの併用により水溶性薬物であるセファクロー (CCL)\*<sup>2</sup> の血清成分からの分離も可能となる. 図 6 (A) および (B) は, コントロール血清およびコントロール血清に 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の CCL を標準添加したもののクロマトグラムである.<sup>17</sup> 移動相は, 20mM の SDS を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 4.4) を用いて分離を行った. 上述の移動相条件の選択範囲内では, CCL をタンパク質成分から分離できないが, アニオン性のイオン対試薬である SDS を加えた酸性の移動相を用いることにより, CCL は, 血清成分から分離される. 一方, 血清タンパク質は, SDS により可溶化されるため直接注入分析が可能となる (2.4 ミセルクロマトグラフィー参照).

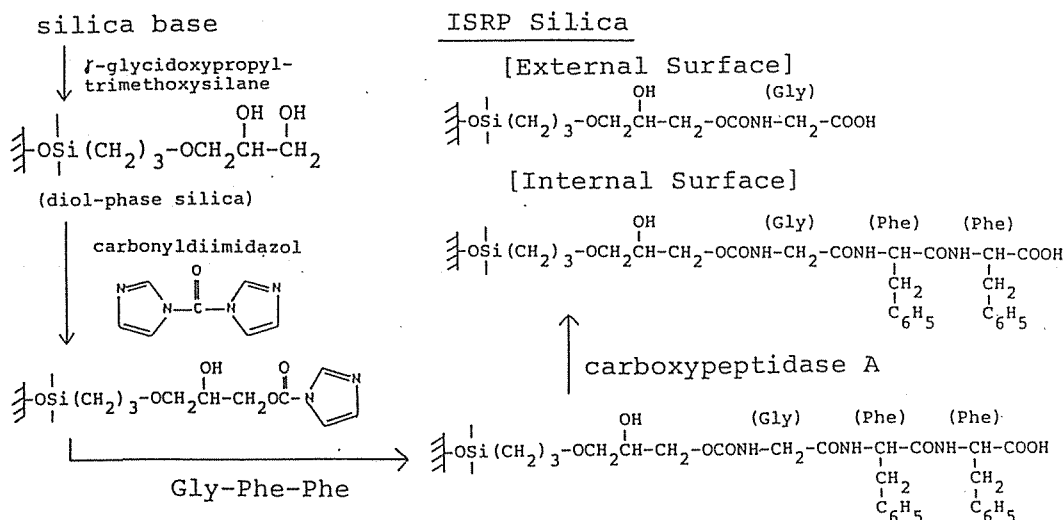


Fig. 5 Reaction for the preparation of ISRP silica.

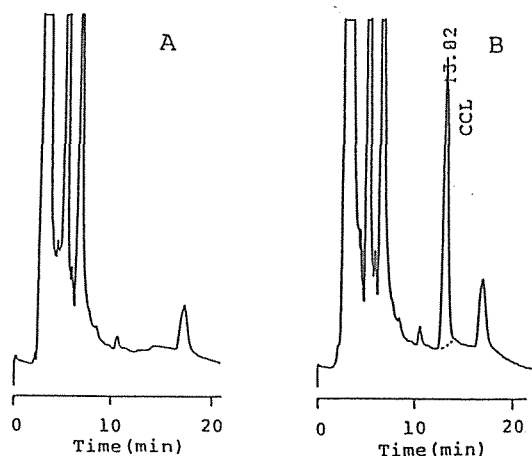


Fig. 6 Separation of cefaclor (CCL) from human serum.<sup>27</sup> Mobile phase, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.38) containing 20 mM SDS; flowrate, 0.8 mL/min; stationary phase, ISRP (GFFS5-80); column, 25 cm X 4.6 mm; detection, 254 nm, injection, 10  $\mu$  L of (A) human serum and (B) 20  $\mu$  g/mL of CCL human serum solution.

このカラムにおいても総薬物量の定量が可能であるが、移動相の条件によって薬物の回収率が変化することがあるので注意する必要がある。<sup>27</sup>また、血漿試料を繰り返し注入 (10×100回以上) してもタンパク質の沈澱に伴うカラム性能の低下やカラム圧の上昇は全く起こらない。しかし、カラムの寿命を長くするためには、ガードカラム [同じ固定相を充填した短いカラム (1 cm×3 mm)] を分析カラムの直前に連結することが望ましい。血清試料 (10  $\mu$  L) を100~500回注入後、ガードカラムを新しいものと取り替えることにより分離カラムは、1200回の注入後も元のカラム効率を維持していたと報告されている。<sup>22</sup>

Hagestam および Pinkerton<sup>18,20</sup> は、N-tert. -butoxycarbonyl-L-phenylalanine (Boc-L-Phe) をグリセリルプロピルシリカにスペーサーとしてジアミンを用いて結合させ、次にキモトリプシンを用いて、同様に内面逆相シリカカラムを調製している。上述のカラム (ピンカートンカラム) に比べ、疎水性が高いので、水溶性の物質の分離には優れているように思われる。

\*1 図5のようにして合成された内面逆相シリカ固定相は、ピンカートンカラムとして市販されている。

\*2 分子内にカルボキシル基およびアミノ基を持っている。

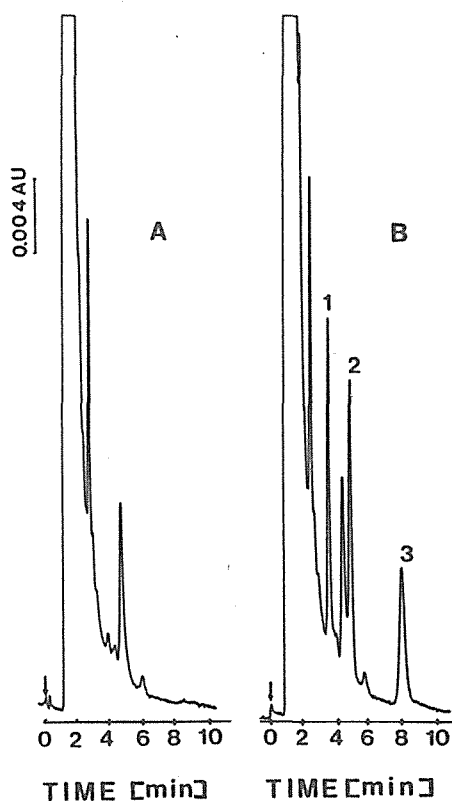


Fig. 7 Chromatogram of (A) blank serum and (B) serum with (1) 2.5  $\mu$  g/mL acetaminophen, (2) 15  $\mu$  g/mL phenobarbital, and (3) 10  $\mu$  g/mL chloramphenicol.<sup>24</sup> Chromatographic conditions were as follows: column I (Table I); mobile phase, 0.02 M SDS adjusted to pH 7.0 with phosphate buffer; flow rate, 1.0 mL/min.

### 2. 3 サイズ排除カラム

ビニルアルコールポリマーである旭化成の GS-320 カラム (排除限界分子量は約40,000) が、血清試料の直接注入による薬物の分析に用いられている。このカラムにおいても、タンパク質、核酸、多糖類などの親水性高分子をサイズ排除モードで先に溶出させ、薬物あるいはその代謝物のように比較的小さな分子は、疎水性相互作用により遅らせて溶出させるものである。実際の分析例については、旭化成のデータ集<sup>23</sup>を参照して頂きたい。このカラムにおいても、総薬物濃度が測定されている。カラム自体は、pH 2~12の範囲で使用可能である。しか

Table 1 Chromatographic Conditions for Therapeutic Drug Monitoring by Micellar Chromatography with Direct Serum Injection<sup>24)</sup>

drug	column <sup>a</sup>	[SDS]mobile phase, M	flow rate, mL/min	retention time, min
acetaminophen	I	0.05	1.0	4
acetylsalicylic acid	II	0.08	2.0	3.5
		pH 3.0		
carbamazepine	I	0.02	1.0	6
chloramphenicol	II	0.03	2.0	7.5
phenobarbital	I	0.05	1.0	5.5
phenytoin	I	0.08	1.0	5
procainamide	I	0.05	2.0	3
quinidine	I	0.10 <sup>b</sup>	2.0	4.5
theophylline	III	0.05	1.0	11

<sup>a</sup>Column I, 15cm×4.6mm i.d. packed with 5 μm Supelcosil LC-CN (Supelco, Inc.); column II, 15cm×4.6mm i.d. packed with 5 μm Supelcosil LC-18 (Supelco, Inc.); column III, 25cm×4.6mm i.d. packed with μ Bondapak C-18 (Waters Associates). <sup>b</sup>Absorbance UV wavelength of 254 nm employed for all analytes except quinidine for which fluorescence detection was used.

し、高タンパク質成分を含む血清などの生体試料をどの程度まで連続的に注入できるのか、あるいはタンパク変性を起こす pH 領域で、生体試料を注入可能であるかなどに関する詳細な報告はない。

#### 2. 4 ミセルクロマトグラフィー

SDS あるいは Brij-35 を CMC 以上に含む移動相を用いることにより血清タンパク質は可溶化されるため、逆相系のカラム (C<sub>18</sub>あるいは CN カラム) を用いて血清試料を直接注入 (10 μl × 250回) することが可能である。図 7 に、血清中のアセトアミノフェン、フェノバルビタールおよびクロラムフェニコールの分離を示した。<sup>24</sup>表 1 に、検討された薬物、使用したカラム、SDS 濃度、流速および保持時間を示した。<sup>24</sup>移動相の pH は、ほとんどの場合 7.0 であるが、アセチルサリチル酸 (アスピリン) は、3.0 で行われている。<sup>24</sup> SDS を含む中性および酸性の溶離液を用いて、C<sub>18</sub>カラム上でのタンパク質の回収率について検討したところ、いずれの場合もタンパク質の回収率は、ほぼ 100% であった。<sup>25</sup>

ピンカートンカラムでは、移動相の pH は、6.0~7.5 が推奨されていたが、この方法では、逆相系のカラムで使用できる全範囲 (pH 2~8) で使用可能であるといえる。また、有機溶媒は、プロパノール、イソプロパノール、アセトニトリルおよびメタノールを約 10% まで使用可能であり、カラム温度は、40℃ まで使用可能であると

報告されている。この方法では、血清タンパク質は、界面活性剤により可溶化され、一方、タンパク結合していた薬物は界面活性剤のモノマーと置き換わり、遊離型になるため、総薬物量が定量されるものと考えられる。しかし、総薬物量が測定されない場合もある。図 8 は、セファロsporin 系抗生物質であるセフメノキシム (C-MX) およびセフトリアム (CTM) のクロマトグラムである。<sup>26</sup>固定相として Nucleosil C<sub>18</sub> (粒子径 5 μm, 15cm×4.6mm) を、移動相として 80mM の SDS, 50mM のりん酸緩衝液および 8% のイソプロパノール (移動相の pH 3.1) を用いて分離を行った。(A) は、CMX および CTM の標品を、(B) は、血清中に標品と同濃度で CMX および CTM を溶解したものを、(C) は、(B) の試料に 1/5 量の 1 M の塩酸を加え、酸性にしたものをカラムに注入した結果得られたクロマトグラムである。これらの抗生物質のタンパク結合率は、CMX では約 80%、CTM では 7~8% である。タンパク結合率の高い CMX は、(A) では、保持時間 7.24 分に、(B) では、6.46 および 7.39 分に、(C) では、7.05 分にピークを与える。一方、タンパク結合率の低い CTM では、(A)~(C) いずれの場合も、単一のピークを与えた。1) 移動相の pH を 2.9 として他の条件は、図 8 と同様の条件下では、血清中においても [クロマトグラム (B) に対応] CMX は、単一のピークとして観測された。2) 1~10% 牛血清アルブミン (BSA) 中に CMX を溶解したもののクロマトグラムでは、BSA

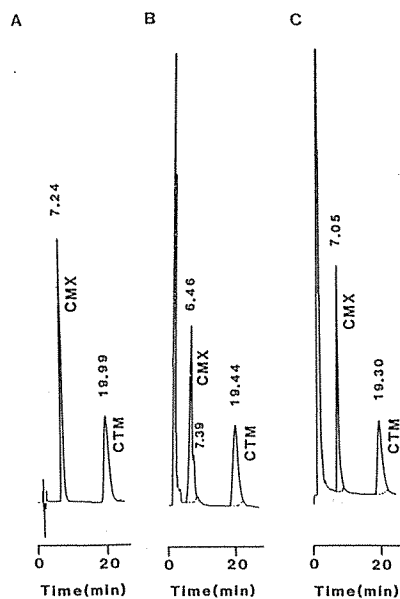


Fig. 8 Chromatograms of cefmenoxime (CMX) and cefotiam (CTM) in distilled water (A), in a serum sample (B) and in the acidified serum sample (C).<sup>29</sup> Column, Nucleosil 5C<sub>18</sub> (15cm×4.6mm); eluent, 80mM SDS plus 45mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 5mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-2-propanol (92:8, v/v) (final pH 3.1); flow rate, 1.0mL/min; detection, 260nm, injection volume, 10 $\mu$ L. Concentration: CMX, 84 $\mu$ g/mL; CTM, 100 $\mu$ g/mL.

濃度の減少につれ保持時間7.39分に対応するピークの割合が増加した。3) あらかじめ血清試料を酸性とすることにより CMX は、単一のピークを与えた [図8の(C)]。4) 血清試料を限外ろ過することにより保持時間7.39分

\*3 アセチルサリチル酸は、投与後、腸間粘膜、肝臓あるいは血清中に存在するエステラーゼによりサリチル酸に変換される。アセチルサリチル酸を血清中に溶解して室温に放置するとアセチルサリチル酸のピークと共にサリチル酸のピークもクロマトグラム上に観測される。また、この条件下では、アセチルサリチル酸とサリチル酸とを分離することができない。従って、表1で保持時間3.5分のアセチルサリチル酸のピークは、アセチルサリチル酸とサリチル酸の混合物であると考えられる。

\*4 クロマトグラム上に観測されているピークは、分離の過程でタンパクと結合していた CMX が遊離して観測されたものである。カラムに注入される前のタンパク結合に関する情報をクロマトグラフ的に観測している。すなわち、結合型の CMX と遊離型の CMX のクロマトグラフ挙動が異なると考えている。

に対応するピークだけ観測された。以上の結果より、血清中の CMX の場合に観測された2つのピークは、タンパク結合型の CMX (保持時間の短いピーク)<sup>34</sup>および遊離型の CMX (保持時間の長いピーク)によるものではないかと推定した。そこで、図8の CMX の2つのピーク面積からタンパク結合率を算出したところ、81%であり、この値は、限外ろ過法により求めたタンパク結合率76%とほぼ一致した。しかし、ミセルクロマトグラフィーによりタンパク結合率を調べることが可能かどうかの一般的な結論は得られていない。

## 2.5 その他の直接注入法

Shihabi ら<sup>30</sup>は、固定相としてポリマー系の充填剤 (PRP-1) を、移動相としてアルカリ性の溶離液 (pH 11.8) を用いて直接注入法による血清中のペントバルビタールの HPLC 分析法について報告している。血清試料の繰り返し注入 (2 $\mu$ l×300回) においても、カラム効率の変化およびカラム圧の上昇がみられなかった。アルカリ性では、血清タンパク質の溶解度が高くなるため、タンパク質の沈澱の生成が抑えられると推定されるが、他の薬物の分析に適用できるか疑問である。

## 2.6 カラムスイッチング法

カラムスイッチング法とは、分析カラムの前に、前処理用のプレカラムを接続し、移動相の流路を切り換えることにより、目的物質の濃縮や試料の前処理および分析をすべて自動的に行なう手法である。その例を図9に示した。<sup>31</sup>バルブ7を実線状態にしておき、オートサンプラー6により血清試料を注入する。血清中の薬物は、前処理カラム (BSA-ODS) に保持されるが、カラムに保持されない成分 (タンパク質成分など) は除去される (後述するように、血清タンパク質の挙動は、用いる前処理カラムにより異なり、前処理カラムに血清タンパク質が保持される場合もある)。次に、バルブ7を点線状態に切り替え、前処理カラムに保持されている薬物を分析カラムに送る。その後、再びバルブ7を実線状態に切り替え、分析が行われている間に、前処理カラムの洗浄・再生が行われ、次の分析に備える。この行程を繰り返すことにより、連続分析が可能となる。バルブの切り替えは、全てシステムコントローラーにより行われるため全自動分析が可能となる。図10にカラムスイッチング法による血清中の鎮痛剤のクロマトグラムを示した。<sup>31</sup>

従来、前処理カラムとしてシリカを基体とする逆相系の充填剤が使用されていた。しかし、タンパク質成分あるいは脂質などの高分子成分などが強固に吸着し、再生

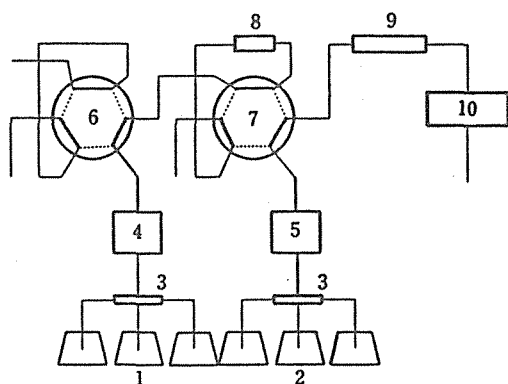


Fig. 9 Flow diagram of HPLC drug analysis with automatic sample preparation.<sup>31</sup> 1, eluent for pretreatment; 2, eluent for analysis; 3, solvent switching valve; 4, pump for pretreatment; 5, pump for analysis; 6, auto sampler; 7, column switching valve; 8, pretreatment column; 9, analytical column; 10, detector.

することができないため、数回の使用で、新しい充填剤と取り替える必要があった。しかし、近年、前処理用のカラムとして、再生可能な（繰り返し使用可能な）充填剤が多数開発されている。

protein-coated ODS カラム、BSA-ODS カラムあるいは内面逆相シリカカラムが前処理カラムとして用いられる。薬物は、疎水性相互作用によりカラムに保持され、血清タンパク質は、親和性を持たないために、除去される。また、サイズ排除カラムも同様な原理で前処理カラムとして使用可能である。<sup>32</sup> アクリレート共重合体（テトラエチレングリコールジアクリレートとテトラメチロールメタントリアクリレートの共重合体）は、薬物および血清タンパクを吸着する。<sup>33-34</sup> タンパク質はそのアミド部分と固定相の水酸基との水素結合および疎水性相互作用により樹脂に吸着しているものと考えられる。薬物は、有機溶媒で溶出されるが、タンパク質は、吸着したままである。タンパク質は、トリエチルアミン溶液で溶出される。<sup>5</sup> 今井ら<sup>35-38</sup> は、ブチルトヨパール650-Mやフェニル5-PW は、疎水性相互作用により HW-65 は、水素結合によりタンパク質を吸着することを利用して、血清中の薬物の前処理カラムとしての使用を検討し

\*5 トリエチルアミンが固定相表面の吸着活性点でタンパク質と競合的に水素結合するためにタンパク質の吸着が抑制されるものと思われる。

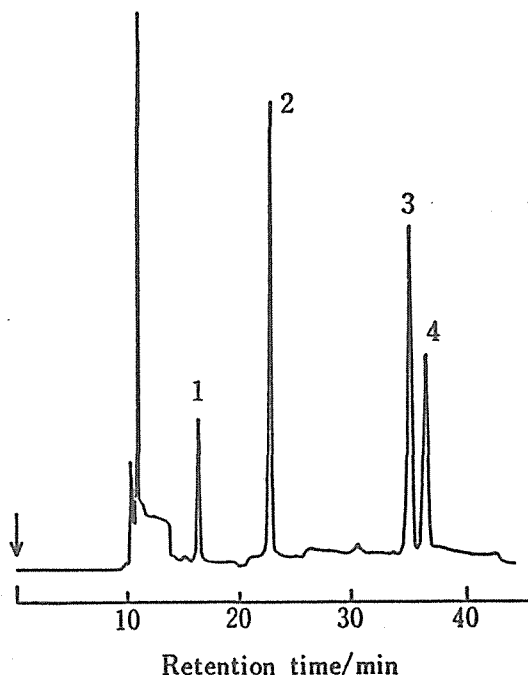


Fig. 10 Chromatogram of anticonvulsant drugs.<sup>31</sup> Pretreatment column, TSKprecolumn BSA-ODS; eluent, 50mM phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 1.0mL/min; analytical column, TSKgel 120 T; eluent, 17% CH<sub>3</sub>CN in 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 0-15min, 22% CH<sub>3</sub>CN in 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 15-20min, 27% CH<sub>3</sub>CN in 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 20-35min; flow rate, 1.0mL/min; detection, 220nm; sample, 1=primidone (10 μg/mL), 2=phenobarbital (20 μg/mL), 3=carbamazepine (10 μg/mL), 4=phenytoin (20 μg/mL); injection volume, 20 μL; pretreatment time, 10min, flow direction from pretreatment to analytical column, reversed direction; conjunction time of pretreatment column and analytical column, 4 min.

ている。近藤ら<sup>39</sup> は、LiChrosorb-CN を血清中のサイクロスポリンの分析のための前処理カラムとして用いているが、この場合も水素結合によりタンパク質を吸着していると推定される。

### 3. おわりに

生体試料中の薬物およびその代謝物の HPLC 分析の最近の進歩として、生体試料の直接注入法を中心に述べた。生体試料の直接注入法の場合には、高感度・高選択



的分析という点においては、問題が残る。高感度・高選択的に薬物およびその代謝物を分析するためには、分離後、ポストカラム反応検出を行わなければならない場合も生じてくるであろう。また、最近の進歩として、ロボットシステムを用いる前処理の自動化の試みもなされている。紙面の都合上この点に関しては述べることができなかったが、今後最も発展が期待される分野である。

## 文 献

- 1 Nice, E. C., M. W. Capp, N. Cooke, M. J. O'Hare, *J. Chromatogr.*, **218**, 569 (1981).
- 2 Cohen, S. A., K. P. Benedek, S. Dong, V. Tapuhi, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **56**, 217 (1984).
- 3 Manno, B. R., J. E. Manno, B. Hilman, *J. Anal. Toxicol.*, **3**, 81 (1981).
- 4 Manno, B. R., J. E. Manno, C. A. Dempsey, M. A. Wood, *J. Anal. Toxicol.*, **5**, 24 (1981).
- 5 Wahlund, K. -G., *J. Chromatogr.*, **218**, 671 (1981).
- 6 Wahlund, K. -G., T. Arvidsson, *J. Chromatogr.*, **282**, 527 (1983).
- 7 Arvidsson, T., K. -G. Wahlund, N. Daoud, *J. Chromatogr.*, **317**, 213 (1984).
- 8 Yoshida, H., I. Morita, T. Masujima, H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2287 (1982).
- 9 Yoshida, H., I. Morita, T. Masujima, H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3827 (1982).
- 10 Imai, H., H. Yoshida, T. Masujima, I. Morita, K. Matsuura, A. Nakamura, K. Katayama, H. Matsu-o, *Anal. Lett.*, **16**, 1109 (1983).
- 11 Yoshida, H., K. Takano, I. Morita, T. Masujima, H. Imai, *Jap. J. Clin. Chem.*, **12**, 312 (1983).
- 12 Tamai, G., I. Morita, T. Masujima, H. Yoshida, H. Imai, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1825 (1984).
- 13 Yoshida, H., I. Morita, G. Tamai, T. Masujima, T. Tsuru, N. Takai, H. Imai, *Chromatographia*, **19**, 466 (1984).
- 14 Morita, I., T. Masujima, H. Yoshida, H. Imai, *Bunseki Kagaku*, **33**, E235 (1984).
- 15 Morita, I., T. Masujima, H. Yoshida, H. Imai, *Anal. Biochem.*, **151**, 358 (1985).
- 16 Tamai, G., H. Yoshida, H. Imai, T. Takashina, K. Kotoo, T. Fuwa, V. Tsuchioka, M. Matsuura, G. Kajiyama, *Chromatographia*, **20**, 671 (1985).
- 17 Hagestam, I. H., T. C. Pinkerton, *Anal. Chem.*, **57**, 1757 (1985).
- 18 Hagestam, I. H., T. C. Pinkerton, *J. Chromatogr.*, **351**, 239 (1986).
- 19 Pinkerton, T. C., J. A. Perry, J. D. Rateike, *J. Chromatogr.*, **367**, 412 (1986).
- 20 Hagestam, I. H., T. C. Pinkerton, *J. Chromatogr.*, **368**, 77 (1986).
- 21 Cook, S. E., T. C. Pinkerton, *J. Chromatogr.*, **368**, 233 (1986).
- 22 Pinkerton, T. C., T. D. Miller, S. E. Cook, J. A. Perry, J. D. Rateike, T. J. Szczerba, *Bio Chromatography*, **1**, 96 (1986).
- 23 Asahipak 総合テクニカルデータ集, 1987.
- 24 DeLuccia, F. G., M. Arunyanart, L. J. Cline Love, *Anal. Chem.*, **57**, 1564 (1985).
- 25 Cline Love, L. J., S. Zibas, J. Noroski, M. Arunyanart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **3**, 511 (1985).
- 26 Arunyanart, M., L. J. Cline Love, *J. Chromatogr.*, **342**, 293 (1985).
- 27 Nakagawa, T., A. Shibukawa, N. Shimono, T. Kawashima, H. Tanaka, J. Haginaka, *J. Chromatogr.*, **420**, 297 (1987).
- 28 Haginaka, J., E. Ohnuma, J. Wakai, H. Yasuda, 未発表データ。
- 29 Haginaka, J., J. Wakai, H. Yasuda, T. Nakagawa, *Anal. Chem.*, **59**, 2732 (1987).
- 30 Shihabi, Z. K., R. D. Dyer, J. Scaro, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 663 (1987).
- 31 高橋裕明, 森山弘之, 松原健一, 深町充, 海野益郎, *分析化学*, **35**, T22 (1986).
- 32 Takahagi, H., K. Inoue, M. Horiguchi, *J. Chromatogr.*, **352**, 369 (1986).
- 33 Hasegawa, S., R. Uenoyama, T. Takeda, J. Chuma, K. Suzuki, F. Kamiyama, K. Yamazaki, S. Baba, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 2267 (1984).
- 34 村北宏之, 林守正, 三上博久, 石田泰夫, *分析化学*, **35**, 236 (1986).
- 35 Imai, H., G. Tamai, S. Sakura, *J. Chromatogr.*, **371**, 29 (1986).
- 36 玉井元, 吉田久信, 今井日出夫, *分析化学*, **35**, 335 (1986).
- 37 Tamai, G., H. Imai, H. Yoshida, *Chromatographia*, **21**, 519 (1986).
- 38 Tamai, G., H. Yoshida, H. Imai, *Anal. Sci.*, **2**, 481 (1986).
- 39 近藤孝子, 内田和治, 阿知波雅人, 前田和男, 奥田剛, 高木弘, *日本臨床化学会年會記録*, **24**, 39 (1984).

(1987年9月7日受理)