[薬 学 雑 誌]
YAKUGAKU ZASSHI
102 (9) 895-897 (1982)

生体試料のプログラム流れ分析システム¹⁾

原 昭二,* 井実孝則, 岡 希太郎
東京薬科大学

Programmed Flow Preparation System for Clean-up and Analysis of Biological Fluids¹⁾

SHOJI HARA,* TAKANORI IJITSU, and KITARO OKA
Tokyo College of Pharmacy, Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-03, Japan

(Received May 26, 1982)

A flow procedure for the analysis of biological samples was developed by incorporating a highly efficient extraction-column and an on-line evaporator as an interface for switching column extraction and chromatography. Drug metabolites in the biological fluids were quantitatively extracted by aqueous liquid-liquid column distribution with eliminating tedious manual clean-up process. Extracts were switched directly to the analytical column injection by passing through the programmed course in the system. This procedure was automated by employing sequencer to provide a high sensitivity and a reproducibility.

Keywords—liquid-liquid distribution; extraction chromatography; column switching HPLC; drug monitoring system; automation of biological fluid analysis

尿や血液などの生体試料の分析においては、前処置として水相から有機溶媒による抽出を行うことが多い。粗分画された目的成分はクロマトグラフィーなどにスイッチされて分析されるが、抽出、蒸発等の一連の工程は、普通マニュアルな不連続の操作で行われている。

すでに著者らは、通常の実験室において行われる反応、抽出、濃縮、クロマトグラフィー分離を含む合成反応過程のプログラム流れシステムについて報告した。^{2,3)} この方法では、あらかじめ設定されたプログラムにしたがい、バルブ操作によって全過程が実施される。今回このシステムを縮小化すると共に、抽出過程に著者の開発した効率の高いカラム⁴⁾を用い、また蒸発、濃縮、再溶解してモードの異なる分離カラムに注入するための装置を組み込んだ。このシステムを生体成分、薬物代謝物の分析に適用し、連続操作による分析が可能であることを確めた。さらに自動化をも達成した。

このシステムの概要を Fig. 1 に示す。a は抽出、b は蒸発、再溶解、注入部分、c は最終的な分離分析のためのクロマトグラフ装置である。a は抽出溶媒としてのジエチルエーテルの予備的精製、水飽和のための液滴をつくる装置 (管 1, 2, 3)⁵⁾ と、試料

Fig. 1. Schematic Diagram of Programmed Flow Preparation (PFP) Analysis System

1. 15% NaOH solution,
2. NaCl-saturated water,
3. distilled water,
4. injector,
5. aqueous two-phase distribution column,
6. micro pump,
7. evaporator,
8. six way valve,
9. silica gel column for resolution,
10. UV detector,
11. recorder,
12. back pressure coil,
13. three way valve.

の注入口 4, ケイソウ土 (AquEx®-10, DSD 製) を充填した効率の高いカラム⁴⁾ 5 (内径 4 mm×30 cm), 送液ポンプ 6 から成り立つ。b はガラス管, PTFE 管を用いて組み立てたエバポレータ (ガラス管 7 の上下に排出口を設け, その中に内径 1 mm, 長さ 50 cm の PTFE 管をコイル状に巻いたもの) である。これをアスピレータとつなぎ, 管内を減圧にし, PTFE 管の外, ガラス管内に温水を通して溶離液を蒸発させる。PTFE 管の内壁で蒸発された残渣は, バルブを切り換え, c の液体クロマトグラフの送液系から導かれた溶離液に溶解され, 分析カラム 9 (シリカゲルを充填した HPLC カラム, 内径 4 mm×25 cm) に注入される。10 は UV 検出器, 11 は記録計である。

一例としてアスピリンを服用後 2 時間後の人尿 100 μ l を注入した場合の操作は次の通りである。ジエチルエーテルの送液は 1 ml/min, 抽出時間約 5 分の後,⁶⁾ バルブによってエバポレータ外部の温水を冷水に切り換え, 常圧に戻して 2 分後に, 代謝物⁷⁾ の分離分析用の溶離液として 5(v/v)% エタノール/*n*-ヘキサンを送る。エバポレータ内の残渣を溶解しつつバルブを作動してエバポレータ内の残留空気を除き, 分析カラムに注入する。分析例を Fig. 2a に示す。また未服用の時の同一人の尿のクロマトグラムを Fig. 2b に示す。効率の高い抽出カラム⁴⁾ を用いるクリーンアップにより夾雑物のピークは少なくなる。標準品を用いて作製した検量線により, 薬物代謝物などを定量した。⁸⁾ これらの工程において, 送液ポンプおよびバルブの開閉はシーケンサにより制御された。

Fig. 2. An Example of Chromatograms by PFP Analysis System

(a) Metabolites of acetylsalicylic acid in human urine

(b) Extracts from normal human urine

V_0 : hold-up volume, SA: salicylic acid, A: acetylsalicylic acid, SU: salicyluric acid, $\downarrow$: injection for resolution of the extract by column switching. Column 9 (Fig. 1) for resolution (silica gel); eluent: 5 (v/v) % ethanol/*n*-hexane; flow rate: 1.1 ml/min; chart speed: 2 mm/min; wave length: 244 nm; sensitivity: 0.32; amount of urine: 100 μ l.

この装置を用いる結果の再現性は良好である。またクローズドシステムなので実験室の汚染が少なく、試料の損失が無いので内部標準を省略することもできる。定量的な抽出およびスイッチングが行われるため、微量試料の高感度自動分析法として広く利用できる。

謝辞 アスピリン代謝物の標品を分与された第一製薬株式会社 伯水英夫博士に深謝します。

引用文献および注

- 1) 第5回生体成分の分析化学シンポジウムで発表, 1981, 10月, 東京.
- 2) 原 昭二, 岡 希太郎, 土橋保夫, 大熊俊一, 薬誌, **102**, 107 (1982).
- 3) K. Oka, Y. Dobashi, T. Ohkuma, S. Hara, *J. Chromatogr.*, **217**, 387 (1981).
- 4) 原 昭二, 井実孝則, 土橋保夫, 岡 希太郎, 薬誌, 印刷中.
- 5) S. Hara, Y. Dobashi, K. Oka, *J. Chromatogr.*, **239**, 677 (1982).
- 6) あらかじめ標準試料の分配比または保持比を測るか, テストランによって定量的に溶出するための時間を決定しておく.
- 7) 伯水英夫, 佐野光司, “バイオメディカルクロマトグラフィー第2集”, 原 昭二, 中嶋暉躬, 広部雅昭編, 化学の領域増刊, 133号, 南江堂, 東京, 1981, pp. 189—201.
- 8) 生体分析, 薬物代謝物の定量, それらの臨床医学への応用については後に報告する.