

今回は、MonoSpin SCX を用いた前処理法とレーザー励起蛍光検出器 LIF726 を用いた生体試料中の塩酸プロプラノロール分析をご紹介します。

塩酸プロプラノロールは β 遮断薬で、狭心症、不整脈、高血圧などの治療に用いられています。薬物代謝の個人差が大きいうえに、血中濃度の治療域と中毒域が近いため、血中モニタリングが必要とされている薬物の1つです。治療域は血漿中濃度で 10 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ とされており、非常に高感度な検出法が求められます。

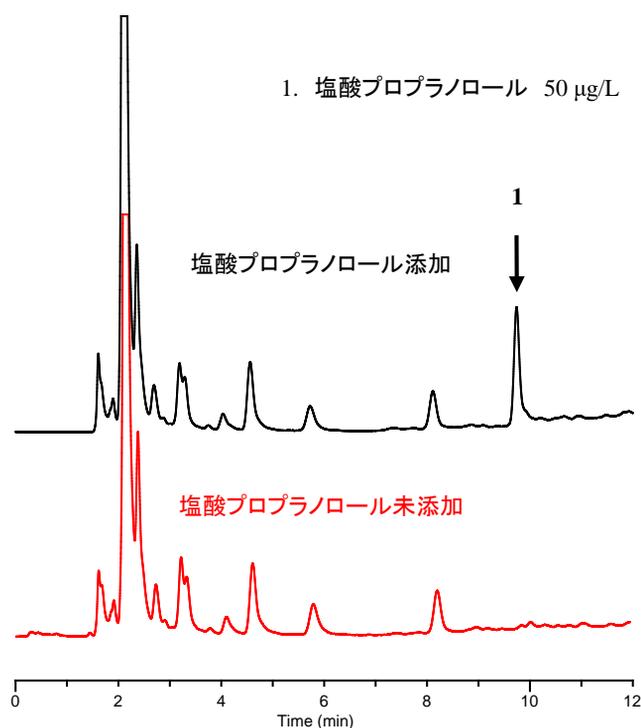
今回使用しましたレーザー励起蛍光検出器は、蛍光検出器の光源にレーザーを用いることによって高感度かつ選択的な検出を可能にしています。

1 ページ目では血清に塩酸プロプラノロールを添加後、有機溶媒にて除タンパクを行い、HPLC測定しました。3 ページ目では血漿に塩酸プロプラノロールを添加後、MonoSpin SCX を用いて前処理を行い、分析しました。

(A. Tamura)

1. 血清中塩酸プロプラノロールの分析

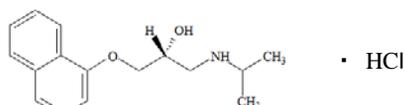
コントロール血清に塩酸プロプラノロール溶液を添加後、除タンパク操作を行い、分析しました。



Conditions

Column	: Monocap C18 fast-flow (150 × 0.1 mm I.D.)
Eluent	: A) CH ₃ CN/H ₂ O / TFA = 10/90/0.1, v/v B) CH ₃ CN/H ₂ O / TFA = 95/5/0.1, v/v A/B = 90/10 - 15 min - 30/70, v/v (gradient mixer)
Flow rate	: 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
Col. Temp.	: 20 °C
Detection	: LIF Ex. 266 nm Em. 300 - 350 nm (LIF726)
Injection Vol.	: 20 nL

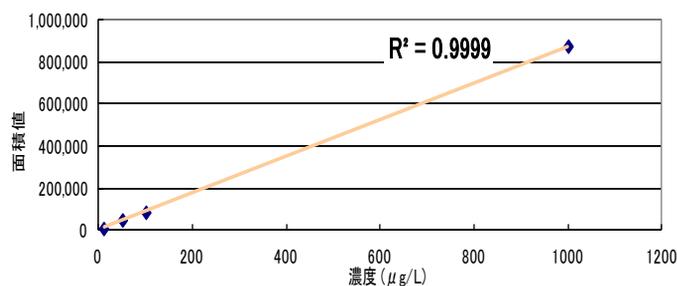
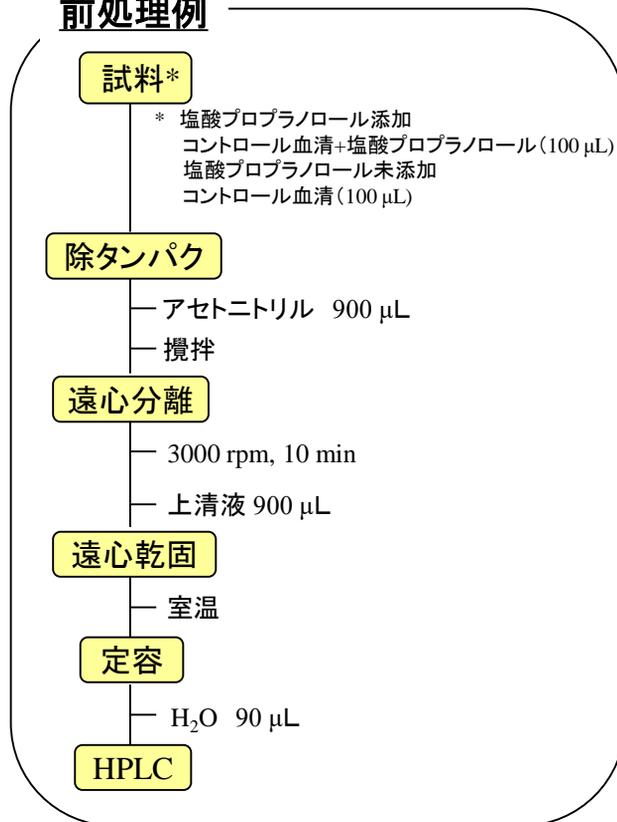
構造式



塩酸プロプラノロール

Structures are created using Chemistry 4-D Draw which is provided by ChemInnovation Software, Inc.

前処理例

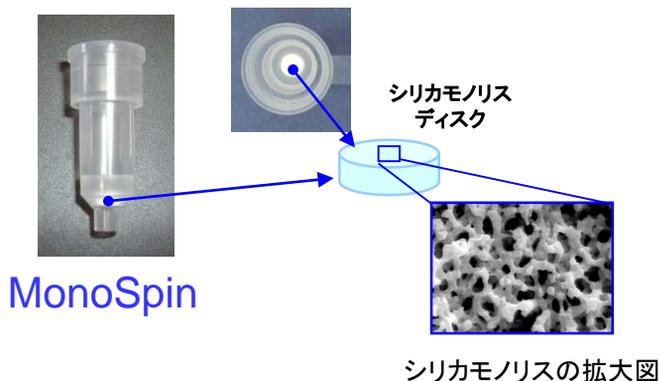
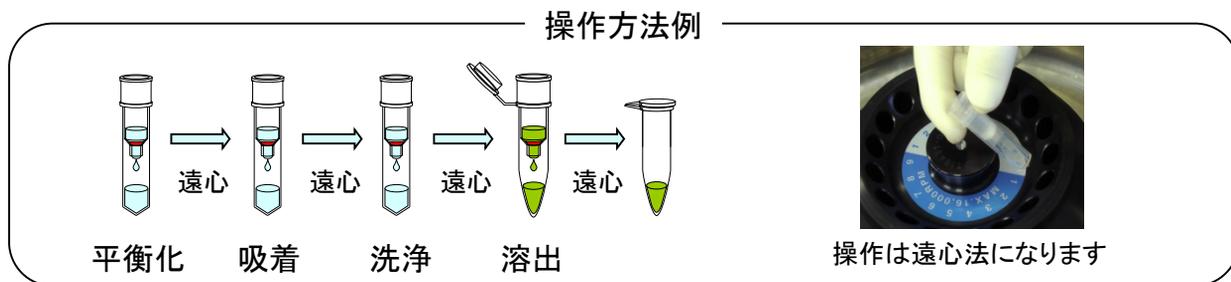


血清添加塩酸プロプラノロール検量線

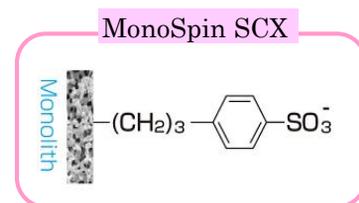
LIF726 は選択性の高い検出器であるため、血清中薬物を分析するには簡便な除タンパク操作のみでも可能でした。しかし、血漿中薬物の場合は血清と比較して夾雑物質が多いため、一工夫した前処理法として、MonoSpin を使用した例をご紹介します。

MonoSpin とは？

MonoSpin シリーズは、均一な連続孔を持つシリカモノリスを用いたスピнкаラムです。空隙率の高いシリカモノリスを担体として用いているので、遠心操作だけで通液させることができます。そのため、短時間の簡便な操作で試料の精製・濃縮を行うことができます。また、ベッドボリュームが小さく液切れも良いので、試料量が少ない場合にも適しています。



MonoSpin SCX について



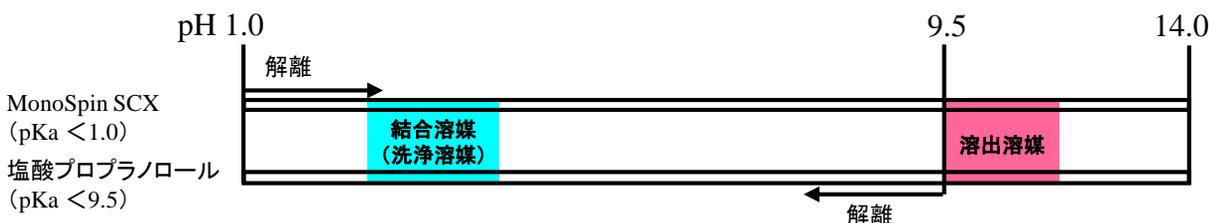
MonoSpin SCX には、強酸性の官能基が修飾されています。強陽イオン交換作用と弱い疎水性相互作用を併せ持ちますので、塩基性薬物の抽出に最適です。

MonoSpin SCX を使用した前処理の原理

MonoSpin SCX には、強酸性の官能基であるプロピルベンゼンスルホン酸 (SO_3H) が修飾されており、通液する溶液の pH に関わらずスルホン酸が解離状態 (SO_3^-) となっています。一方、塩基性化合物は酸性、中性溶液中で解離状態にあります。

まず、MonoSpin SCX に酸性条件下で塩基性化合物を添加すると、イオン交換作用により、塩基性化合物が吸着します。次に、酸性水溶液で洗浄すると酸性 ~ 中性化合物と親水性化合物は保持されず通過します。最後にアンモニア水を添加した有機溶媒により、吸着した塩基性化合物の解離と疎水性吸着を抑え、溶出させることができます。

塩基性化合物においては、疎水性相互作用のみの MonoSpin C18 と比べて選択的に目的成分を溶出させることができます。



2. 血漿中塩酸プロプラノロールの分析

血漿に塩酸プロプラノロール溶液を添加後、MonoSpin SCXにて前処理を行い、分析しました。

前処理工程の Protokol

あらかじめ準備するもの

- ① 洗浄溶媒: メタノール
- ② 洗浄溶媒: 2% ギ酸水溶液
- ③ 溶出溶媒: 28% アンモニア水/メタノール=5/95, v/v

試料液

血漿	90 μ L
+ 500 μ g/L 塩酸プロプラノロール液	10 μ L
+ H ₂ O	400 μ L
	500 μ L

MonoSpin SCX に廃液用チューブを取りつける

↓ + ① 洗浄溶媒 450 μ L

遠心*

↓ + ② 洗浄溶媒 450 μ L

遠心

↓ + 試料液 450 μ L

遠心

↓ + ② 洗浄溶媒 450 μ L

遠心

↓

回収用チューブに付け替える

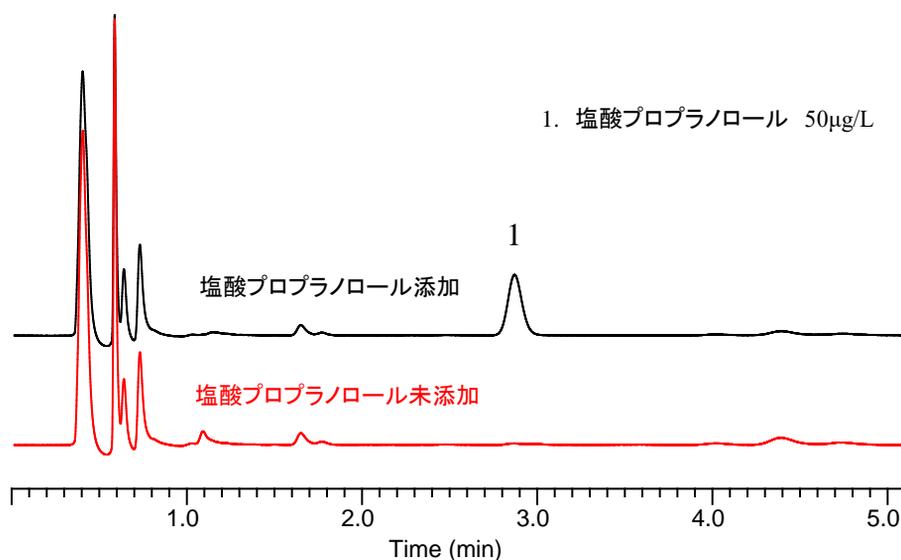
↓ + ③ 溶出溶媒 90 μ L

遠心

↓

回収された溶液を HPLC システムにインジェクト

* 遠心は全て、10,000 g で 1 分間としました。



Conditions

System:	LC800 System
Column:	Inertsil ODS-4 HP (3 μ m, 100 \times 2.1 mm I.D.)
Eluent:	A) CH ₃ CN B) 20 mM KH ₂ PO ₄ (pH 2.5, H ₃ PO ₄) A/B = 25/75, v/v (gradient mixer)
Flow rate:	0.6 mL/min
Col. Temp.:	40 $^{\circ}$ C
Detection:	LIF Ex. 266 nm Em. 300 - 350 nm (LIF726)
Injection Vol.:	5 μ L



レーザー励起蛍光検出器 LIF726

Cat. No. 6001-72600 6 nLセル付

Cat. No. 6001-72601 18 nLセル付

Cat. No. 6001-72610 1.5 μ Lセミマイクロセル付

- 光源に 266 nm のレーザー光源を使用することにより、誘導体化せずに自然蛍光物質の高感度検出が可能です。
- フローセルを自由に配置することができるので、カラム出口からフローセルまでの配管を短くすることが可能です。



Smart HPLC システム LC800

Cat. No. 6001-88015 Analyst Control

Cat. No. 6001-88009 Open Lab Control

- LIF オプションを追加すればカラムオープン内にフローセルを内蔵することができます。UV検出器のフローセルと直列につなぐこともできます。
- オートサンプラーの冷却機能及びプランジャー洗浄機構が標準で搭載されています。

MonoSpin SCX

Cat. No. 5010-21725 (50個)

Cat. No. 5010-21726 (100個)

※ 初期検討のためのトライアルキットもあります！

MonoSpinトライアルキット1：薬物、農薬分析に最適です。
(C18, SCX, SAX, TiO 各10個入)
Cat. No. 5010-21740

MonoSpinトライアルキット2：糖鎖や親水性化合物分析に最適です。
(C18, Amide, CBA, NH₂ 各10個入)
Cat. No. 5010-21741

MonoSpinトライアルキット3：イオン性化合物の分析に最適です。
(SCX, SAX, CBA, NH₂ 各10個入)
Cat. No. 5010-21742



ジールサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお勧めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しましても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行なっております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

04-2934-1100 **info@glsc.co.jp**



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.glsc.co.jp/technique/app/app_search.html