

TOSOH

SEPARATION REPORT

前処理用充填カラムを用いた分析条件の検討

—— TSKprecolumnシリーズによるカラムスイッチング法 ——

—— 目 次 ——

| | ページ |
|----------------|-----|
| 1. はじめに | 1 |
| 2. 前処理充填カラムの特性 | 1 |
| 3. 前処理の原理 | 2 |
| 4. 前処理条件の選択方法 | 2 |
| 5. 取扱上の注意事項 | 4 |
| 6. 分析例 | 5 |
| 7. おわりに | 10 |

1. はじめに

血清や血漿などの血液試料や尿等の生体液中に含まれる低分子物質の分析は、投薬のモニタリングや薬物の代謝研究等に必要項目となっています。このような生体液中の低分子物質の分析では、生体試料中に多量に含まれる高分子物質、特にタンパク質の除去が欠かせません。従来の試料前処理では、生体試料溶液に有機溶媒や酸溶媒等を添加し、予め除タンパクする必要がありました。しかし、試料の回収や再現性、内標の決定や工程の煩雑

さなど問題も多く、簡便な、しかも効果的な前処理方法が求められていました。

当社のTSKprecolumnシリーズは、生体試料を直接カラムに注入するだけで除タンパク操作が行え、簡便な操作で生体試料の前処理を可能にした試料前処理用充填カラムです。本稿では、TSKprecolumnシリーズを効果的に用いていただく為の試料前処理の条件の選択法について述べます。

2. 前処理充填カラムの特性

TSKprecolumnシリーズには疎水性の異なった3種類の充填カラムが用意されており、それぞれの特性を表-1に示します。

表-1 試料前処理用充填カラムTSKprecolumnシリーズの特性

| | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKprecolumn SW | TSKprecolumn PW |
|--------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 基材 | シリカゲル | シリカゲル | ポリマーゲル |
| 疎水性層 | ODS(C18) | -CH ₂ - | -CH ₂ - |
| 親水性層 | BSA | ジオール | ジオール |
| 粒子径 | 20 μ m | 10 μ m | 12 μ m |
| カラムサイズ | 4.6mmID×3.5cm | 4.6mmID×3.5cm | 4.6mmID×3.5cm |
| 出荷時溶媒 | 20%エタノール | 0.05%NaN ₃ | 0.05%NaN ₃ |
| 適用物質 | 中低疎水性物質 | 高疎水性物質 | 高疎水性物質 |
| 品番 | 08421 | 08422 | 14099 |

TSKprecolumn BSA-ODSはシリカゲルを基材とした充填剤であり、その細孔内部はODS層、外部表面は架橋された変性BSA(牛血清アルブミン)で被覆されています。この為充填剤の細孔内部は疎水性ですが、粒子の外部表面はBSAにより親水性となっています。TSKprecolumn BSA-ODS充填剤の模式図を図-1に示します。

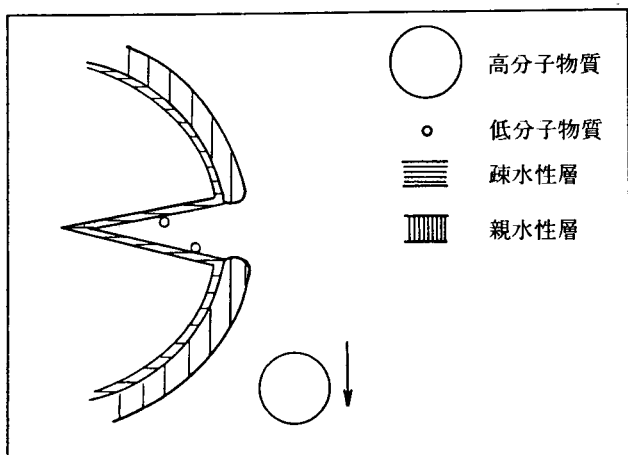


図-1 TSKprecolumn BSA-ODS充填剤の模式図

TSKprecolumn SWは、シリカゲルを基材とした親水性のゲル濾過クロマトグラフィー用充填剤であり、充填剤表面は親水性の水酸基で覆われ、また、炭化水素基が存在するためわずかに疎水性も持ち合せています。また、TSKprecolumn PWはポリマー系の親水性ゲル濾過クロマトグラフィー用充填剤であり、TSKprecolumn SWと同様に親水性の水酸基とポリマー主鎖部分の疎水性を持ち合わせています。TSKprecolumn SW、TSKprecolumn PWは、BSA-ODSに比べ疎水性が小さいため、TSKprecolumn BSA-ODSでは強く吸着してしまう物質などの高疎水性物質の分析に適しています。このように、TSKprecolumnシリーズは異なった疎水性を持っており、試料の疎水性により充填剤を選択します。疎水性の強さはTSKprecolumn BSA-ODSが最も強く、TSKprecolumn PW、TSKprecolumn SWの順となっています。

3. 前処理の原理

TSKprecolumnを用いた前処理の模式図を図-2に示します。TSKprecolumnはいずれも充填剤表面の親水性が高いため、生体試料液中のタンパク質との疎水性相互作用はなく、また充填剤の細孔中にも浸透しないので充填剤に吸着されずに素通りします(B)。しかし、低分子物質は、細孔内にも浸透し疎水性部分、すなわちODS層や炭化水素部分へ吸着します。これにより、検体試料液

中の高分子物質(タンパク質)は低分子物質から分離されます。通液によりタンパク質分画が溶出し終わったら、溶離液組成の変更で吸着している低分子物質を溶出し(C)、分析カラムで分析します。前処理カラムを洗浄し、初期化した後、引き続き前処理を行います。

これらの流路の切換えや溶離液の変更を自動的に行えば、ルーチンで使用できます。

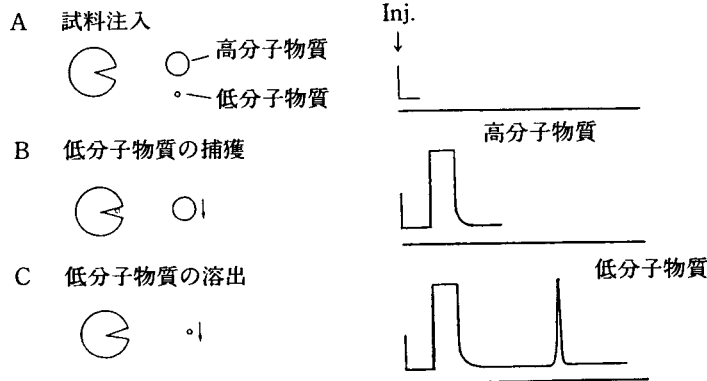


図-2 TSKprecolumnを用いた試料前処理法の模式図

4. 前処理条件の選択方法

TSKprecolumnを用いた前処理方法は、次の操作手順に従います。

1. 検体試料が前処理カラムに保持されるかどうかを確認します。

水100%でpHや塩濃度を変化させても保持されない物質の測定は困難です。

2. タンパク質分画溶出に必要な前処理時間を調べます。

試料量により異なります。多量のタンパク質の除去が不十分である場合、分析カラムへタンパク質が導入されカラムの劣化を早めることになります。

3. 予め試料の溶出位置を分析カラムを用いて決定します。(分析条件の決定)

分析条件は通常の溶出条件を用います。

4. 標準試料を用い前処理カラム及び分析カラムによるカラムスイッチングを用いテストランを行います。

試料の溶出位置が適当かを調べます。溶離液の再調整を行います。

5. 検体試料を用いて分析を行います。

前処理条件決定の順序をフローシートに示します(図-3)。

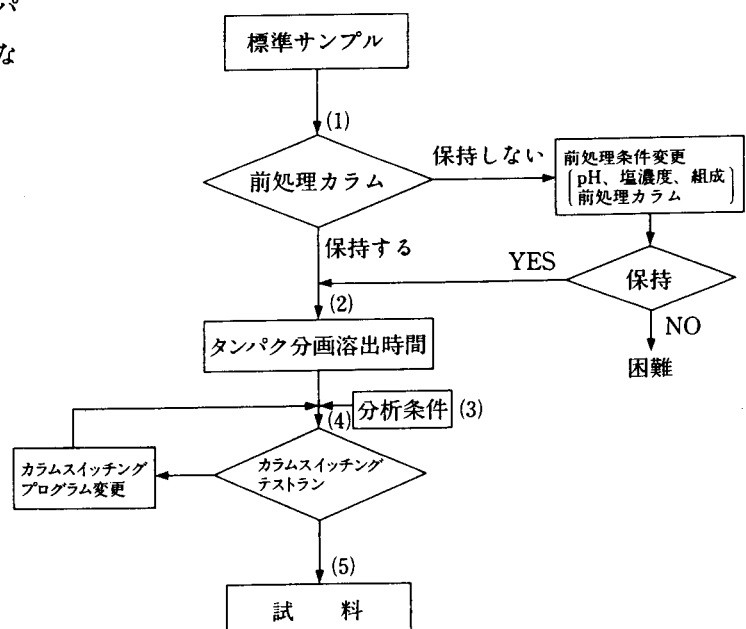


図-3 カラムスイッチングによる前処理操作のフローダイアグラム

前処理カラムの選択は、目的物質の物性と測定系に基づき行います。目的物質が比較的親水性である場合は、高疎水性のODS層を持つTSKprecolumn BSA-ODSが適しています。TSKprecolumn PWやTSKprecolumn SWでは疎水性が弱いタンパク分画と同時に溶出してしまうことがあります。一方、TSKprecolumn PWやTSKprecolumn SWは目的物質の疎水性が高い場合に適しており、TSKprecolumn BSA-ODSでは強く吸着してしまう場合や、回収率が悪い場合に用います。またTSKprecolumn PWはポリマー充填剤であるため、アルカリ洗浄できる利点も有ります。

一般に、ODSカラムによる分析において、有機溶媒の含有量が60~70%以上で分析が行われる物質については、低疎水性のTSKprecolumn PWかTSKprecolumn SWが適しています。TSKprecolumn BSA-ODSは親水性物質から、ある程度高疎水性物質まで広く利用できます。

TSKprecolumn BSA-ODSを用いた一般的な溶出テストを次に示します。

1) 溶出の確認

TSKprecolumn BSA-ODSカラムを前処理液で平衡化した後、標準試料(STD)を注入します。STDが保持されない場合は測定不可能です。STDがカラム容量の約10倍以上保持される条件が適当です。

分析用溶離液でSTDを溶出します。TSKprecolumn BSA-ODSからすばやく溶出される条件が適当です。溶出が遅い場合、前処理カラムで試料が広がってしまう場合があります。

2) 測定条件

TSKprecolumn BSA-ODSと分析カラムを連結し、分析用溶離液で平衡化した後、STDを注入し面積を求めます。前処理カラムと分析カラムからの溶出時間は約10~20分が適当です。

TSKprecolumn BSA-ODSを前処理液で平衡化した後、STDを注入し流路を切換え、分析カラムから得られたピーク面積を求めます。回収率が90%以上であれば分析可能です。

試料にSTD添加血清あるいは血漿をTSKprecolumn BSA-ODSに注入し、カラムスイッチングを行いSTDの回収率を調べます。回収率が悪い場合は、前処理時間を変更したり、前処理の流速を変更する微調整が必要です。

条件が決定したら、試料濃度の異なる添加血清あるいは血漿を調整し、各濃度で測定値のC.V.が良好であることを確認してください。

5. 取扱上の注意事項

(1)前処理

1)前処理用溶離液

前処理用溶離液としては、純水あるいは薄い緩衝液(10~20mM程度、pH3~7)が適しています。目的物質の疎水性が高い場合は有機溶媒を数%添加する場合があります。有機溶媒を添加する場合は、検体試料中のタンパク質が変性し、析出しないよう注意してください。また、塩濃度が高い場合、分析用溶離液の有機溶媒によって塩析が起こることがあります。また、溶離液のpHは、通常、3~7で使用します。試料がイオン性の場合、解離を抑えるためにpHの変更が必要となる場合があります。また、TSKprecolumn BSA-ODSで分析する場合は、pH 5 付近以上では、充填剤は負に帯電していますので、イオン性物質はイオン反発や、吸着されることがあります。この場合は、塩濃度を高めるかpHを変更して分析を行ってください。

前処理液の流速は、通常1.0~1.5ml/minで使用します。前処理カラムの許容最大圧力の20kg/cm²を越えない範囲で流速を設定してください。前処理に必要な時間は試料量によっても異なりますが、1.5ml/minで通液した場合、25 μ lまでは2分程度、また250 μ lまでは3~5分程度が目安です。

2)洗浄

前処理カラムの洗浄は、分析終了後に毎回行ってください。洗浄溶媒は、有機溶媒含有量(任意の含有量で洗浄可能)の多い溶離液を通液します。通常は、メタノール、アセトニトリルが50%以上含まれた溶液が適当です。i-プロパノールを用いる場合は測定圧が高くなるため、流速を下げても通液してください。

3)試料

試料中に不溶物がある場合には、必ずメンブランフィルターによる濾過かあるいは遠心分離によって予め除去してください。前処理カラムでの目詰りの原因となります。血清などの粘度の高い試料の場合は前処理液か純水で2倍程度希釈してから注入してください。カラム圧の一時的な上昇によりカラムの劣化を早めることが有ります。

前処理カラムに注入可能な試料量は、検体試料にもよりますが、血清試料で数 μ l~250 μ lが適量です。

また前処理カラムの耐久性は、試料量、洗浄回数、分析時間にもよりますが、血清試料の場合、総注入量は10~20mlです。分析の際、ピーク形状の変化がみられた場合は、ガードカラムか前処理カラムの交換を行ってください。

(2)分析

1)分析液

分析用溶離液は、使用する分析用充填カラムの取扱説明書に従って調整してください。

2)ガードカラム

分析カラムにはガードカラムを必ず装着してください。また、ガードカラムは定期的に交換してください。標準物質のピークが幅広くなったり、割れたりした場合には、ガードカラムの劣化が原因であることが多いため、交換の目安となります。ガードカラム交換後もピーク形状あるいは分離能が改善されない場合は、前処理カラム又は分析カラムの劣化が考えられますので、交換してください。

6. 分析例

TSK precolumnシリーズは、カラムスイッチングにより試料の前処理を行うように設計されているため、高圧6方バルブが2個必要です。当社では前処理装置として、高圧6方バルブ2個、溶離液切換え電磁弁4個(溶離液6液選択可能)を搭載した試料前処理装置PT-8000を用意しており、シーケンサにより任意にバルブや溶離液の切

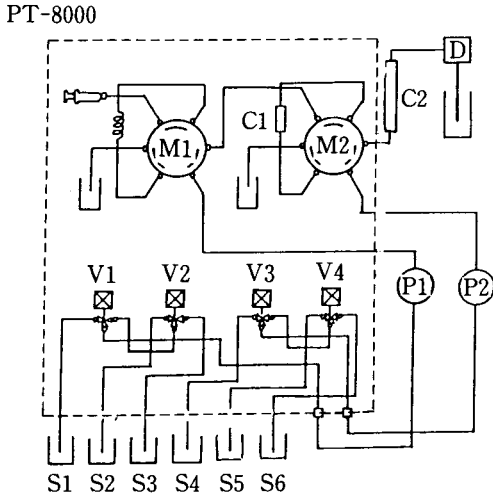


図-4 PT-8000ブロックダイアグラム

M1, M2: 高圧6方バルブ、C1: 前処理カラム、C2: 分析カラム、V1~V4: 電磁弁、P1: 前処理用ポンプ、P2: 分析用ポンプ、S1~S6: 前処理用、分析用溶離液、D: 検出器

換えを行うことができます。図-4にPT-8000のブロックダイアグラムを示します。また図-5にPT-8000を用いて自動前処理を行うためのシステムを示しました。もちろんスーパーシステムコントローラSC-8010、バルブユニットSV-8010、MV-8010を用いてシステムを構成することも可能です。

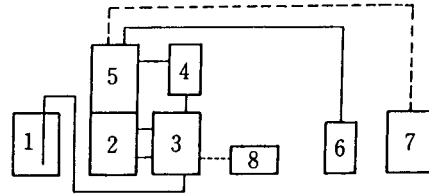


図-5 装置の構成

1. 溶離液 2. 送液ポンプ(CCPM) 3. 試料前処理装置(PT-8000) 4. カラム(TSK precolumn BSA-ODS、TSKgel ODS-80T_M) 5. 検出器 6. 廃液瓶 7. インテグレータ 8. オートサンプラ(AS-8010)

自動前処理による血漿中のテオフィリン分析例を以下に示します。

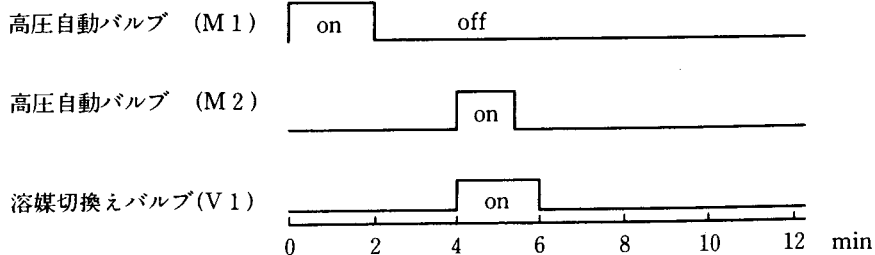
(1) 試料の調整

1. テオフィリン標準溶液(濃度20 μ g/ml)を調整します。
2. 血清1mlに標準溶液を20 μ l添加します。

(2) 溶離液

1. K₂HPO₄ 8.71gを精製水1lに溶解し、リン酸でpH 7.0に調整します。
2. アセトニトリルとリン酸緩衝液1を10対90で混合し、超音波あるいは減圧脱気を行います。

タイムシーケンス



(3) 測定

1. 検出器(紫外吸収)の波長を273nmに設定します。
2. 前処理液を流速1.5ml/minに、また、分析用溶離液を1.0ml/minに設定します。
3. PT-8000のプログラムを以下の要領で設定します。
4. 前処理カラム及び分析カラムに通液し平衡化後テオフィリン添加試料20 μ lを注入します。

このようにして得られたクロマトグラムを図-6に示します。前処理を含め10分で分析されています。しかし、2回目からの分析は、前処理操作が分析カラムでの分析中に行えるため、更に分析時間の短縮が可能です。

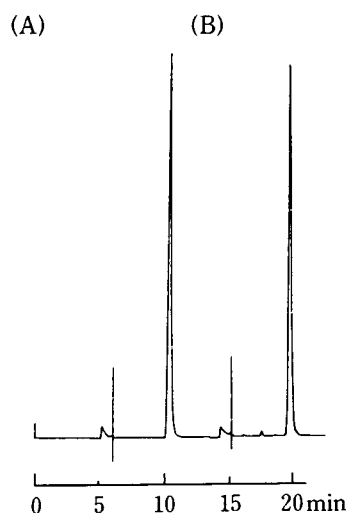


図-6 テオフィリンの分析

サンプル : (A) テオフィリン標準品、
(B) テオフィリン添加血清
試料注入量(濃度) : $20\mu\text{l}$ ($20\mu\text{g}/\text{ml}$)
カラム : TSKprecolumn BSA-ODS
($4.6\text{mmID}\times 3.5\text{cm}$)
TSKgel ODS-80T_M
($4.6\text{mmID}\times 15\text{cm}$)
前処理液 : $50\text{mM K}_2\text{HPO}_4$ (pH7.0)
 $1.5\text{ml}/\text{min}$
分析液 : $10\%\text{CH}_3\text{CN}$ in $50\text{mM K}_2\text{HPO}_4$
 $1.0\text{ml}/\text{min}$
測定波長(レンジ) : 273nm (0.32AUFS)
M2 ; $4\rightarrow 5.5\text{min}$ 、V1 ; $4\rightarrow 6\text{min}$ 、inj. cycle ; 9min

図-7は抗てんかん薬について同様な操作で分析した例です。抗てんかん薬の疎水性が異なるため単一溶媒での溶出には時間がかかります。このような場合には、PT-8000の溶媒切換えバルブにより分析用溶離液をステップワイズで変更することで分析時間の短縮が可能です。

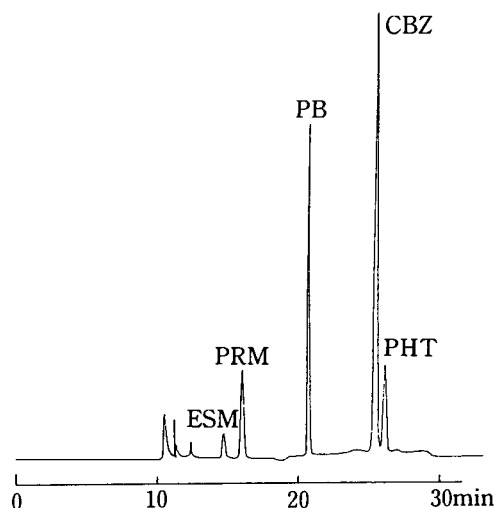


図-7 抗てんかん薬の分析

サンプル : 標準品添加血漿
ESM : エトサクシミド、
PRM : プリミドン、PB : フェ
ノバルビタール、CBZ : カルバ
マゼピン、PHT : フェニトイン
試料注入量(濃度) : $20\mu\text{l}$ (各 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$)
カラム : TSKprecolumn BSA-ODS
($4.6\text{mmID}\times 3.5\text{cm}$)
TSKgel ODS-80T_M
($4.6\text{mmID}\times 15\text{cm}$)
前処理液 : $50\text{mM K}_2\text{HPO}_4$ (pH7.0)
 $1.0\text{ml}/\text{min}$
分析液 : (A) $20\%\text{CH}_3\text{CN}$ in $50\text{mM K}_2\text{HPO}_4$
(pH7.0)
(B) $35\%\text{CH}_3\text{CN}$ in $50\text{mM K}_2\text{HPO}_4$
(pH7.0)
(A) $\xrightarrow{14\text{分}}$ (B) $\xrightarrow{10\text{分}}$ (B)
 $1.0\text{ml}/\text{min}$
測定波長(レンジ) : 220nm (0.16AUFS)

図-8は、血漿中のリドカインの分析例です。低波長での分析では、夾雑物質のピークが現れます。目的物質のピークと重なるようであれば分析条件の変更が必要です。また図-9は、血漿中のプロプラノロールの分析例ですが、低波長での分析で夾雑物質の影響がでる場合や、更に微量成分である場合などは、このように蛍光検出することで高感度に、また夾雑ピークも少なくすることができます。図-10にプロプラノロールの検量線を示します。広い範囲にわたって直線関係が成りたっていることが分かります。

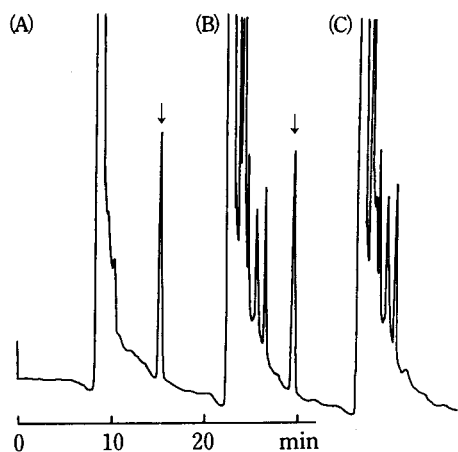


図-8 リドカインの分析

サンプル : (A)リドカイン標準品、
(B)リドカイン添加血漿、
(C)血漿ブランク
試料注入量(濃度) : 20 μ l (2.5 μ g/ml)
カラム : TSKprecolumn BSA-ODS
(4.6mmID \times 3.5cm)
TSKgel ODS-80T_M
(4.6mmID \times 15cm)
前処理液 : 50mM K₂HPO₄ (pH7.0)
1.0ml/min
分析液 : 15%CH₃CN in 50mM KH₂PO₄
(pH2.5)
1.0ml/min
測定波長(レンジ) : 210nm(0.08AUFS)
M2 ; 6 \rightarrow 8min、V1 ; 6 \rightarrow 9min、inj.cycle ; 14min

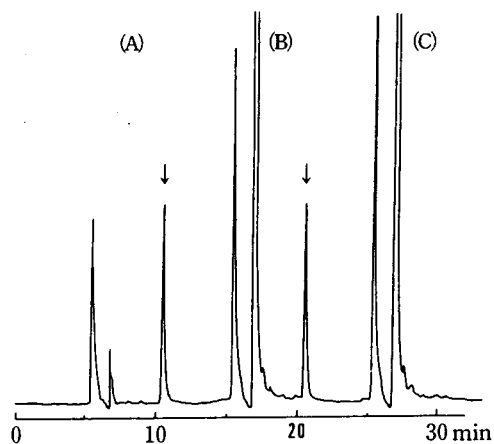


図-9 プロプラノロールの分析

サンプル : (A)プロプラノロール標準溶液、
(B)添加血漿、(C)血漿ブランク
試料注入量(濃度) : 20 μ l (100ng/ml)
カラム : TSKprecolumn BSA-ODS
(4.6mmID \times 3.5cm)
TSKgel ODS-80T_M
(4.6mmID \times 15cm)
前処理液 : 50mM K₂HPO₄ (pH7.0)
1.5ml/min
分析液 : 30% CH₃CN in 50mM
KH₂PO₄ (pH2.5)
1.0ml/min
測定波長 : 励起波長290nm、
蛍光波長350nm

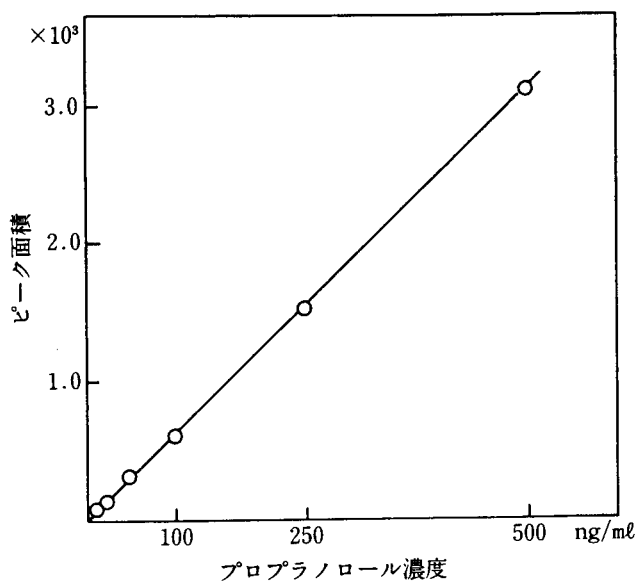


図-10 カラムスイッチング法におけるプロプラノロールの検量線

分析条件は図-8と同じ

表-2、3にカラムスイッチングによる試料の回収率及び再現性を示します。いずれも良好な結果を与えています。

TSKprecolumn SWカラムを用いた高疎水性のプロブコールの分析例を図-11に示します。このような高疎水性物質はTSKprecolumn BSA-ODSを用いた場合、回収率が悪くなることがあります。TSKprecolumn SWは

| 薬物 | 血漿中濃度 | | 回収率 |
|-----------|----------------------------|-----------------------------------------|-------|
| | 添加量 | 測定値 | |
| フェノバルビタール | 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 17.2 \pm 0.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 95.6% |
| フェニトイン | 12 | 12.0 \pm 0.25 | 100.0 |
| カルバマゼピン | 6 | 5.8 \pm 0.22 | 97.2 |
| エトサクシミド | 50 | 51.3 \pm 0.82 | 102.0 |
| | 100 | 100.3 \pm 1.44 | 100.0 |
| バルプロ酸 | 100 | 94.0 \pm 2.30 | 94.0 |

表-2 前処理カラムによる自動前処理の回収率

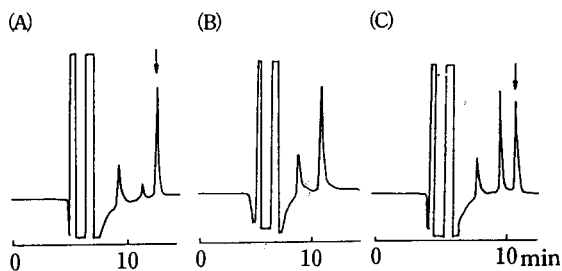


図-11 プロブコールの分析

サンプル : (A)プロブコール標準溶液、
(B)血清ブランク、(C)添加血清
試料注入量(濃度) : 50 μl (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
カラム : TSKprecolumn SW
(4.6mmID \times 3.5cm)
TSKgel ODS-80T_M
(4.6mmID \times 15cm)
前処理液 : 20mM NaCl
1ml/min
分析液 : 95%CH₃CN+0.03%リン酸
1ml/min
測定波長 : 254nm
M2 ; 2 \rightarrow 3.5min

疎水性がTSKprecolumn BSA-ODSに比べ低いため、簡単に溶出し回収率も良好です。また、図-12はTSKprecolumn PWカラムを用いたシクロスポリンの分析例です。シクロスポリンも疎水性の高い物質ですが、TSKprecolumn PWを用いることにより高回収率で分析できます。

表-4に代表的な薬物の分析条件を示しました。

| 薬物 | 回数 | 濃度 | 再現性(C.V.) | |
|----------|----|-----------------------------|-----------|-------|
| | | | 溶出時間 | ピーク面積 |
| リドカイン | 7 | 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 1.9% | 2.0% |
| プロプラノロール | 16 | 50ng/ml | 0.3 | 3.4 |
| | | 100 | 0.2 | 2.4 |

表-3 前処理カラムによる自動前処理の再現性

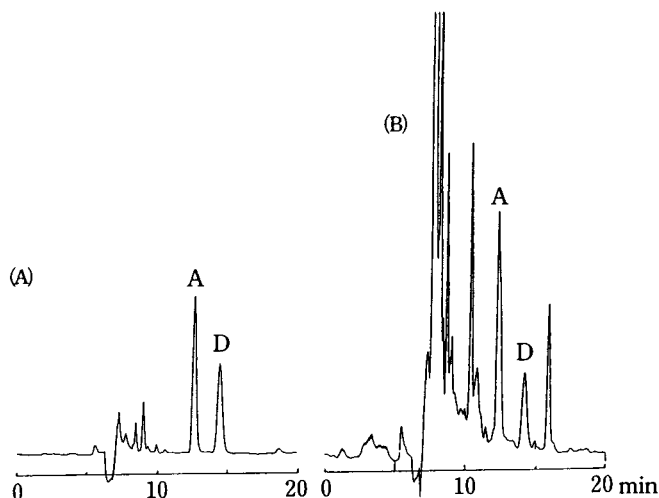


図-12 シクロスポリンD、Aの分析

サンプル : (A)シクロスポリンD、A標準溶液、
(B)添加血清
試料注入量(濃度) : 100 μl (各5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
カラム : TSKprecolumn PW
(4.6mmID \times 3.5cm)
TSKgel ODS-80T_M
(4.6mmID \times 15cm)
前処理液 : 純水
1ml/min
分析液 : 72%CH₃CN
1ml/min
測定波長 : 220nm
M2 ; 4.5 \rightarrow 6min

表-4 薬物の分析条件

| 薬物 | 前処理カラム | 分析カラム | 分析条件 |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Procainamide (PA) N-AcetylPA | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH7.0)1.0ml/min (A)CH ₃ CN/リン酸緩衝液(pH4.5) =7.5/92.5 1.0ml/min、UV210nm |
| Ethosuccimide | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-120T | (P)20mMリン酸緩衝液(pH7.0)1.0ml/min (A)CH ₃ CN/リン酸緩衝液(pH7.0)=15/85 1.0ml/min、UV210nm |
| Mianserin, Amoxapin Desipramine Imipramine aprotiline Clomipramine | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-120T TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0) CH ₃ CN/リン酸緩衝液(pH3.0)=35/65 1.0ml/min (A)CH ₃ CN/リン酸緩衝液(pH3.0)=30/70 CH ₃ CN/リン酸緩衝液(pH3.0)=35/65 1.0ml/min、UV210nm |
| Nitrazepam Diazepam | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=65/35 1.0ml/min、UV254nm |
| Sulfacetamide Sulfathiazole Sulfamerazine | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=20/80 1.0ml/min、UV254nm |
| Oxyfenbutazone Phenylbutazone | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=70/30 1.0ml/min、UV254nm |
| Acetazolamine | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=20/80 1.0ml/min、UV254nm |
| Sulfabenzamide Sulfisoxazole | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=40/60 1.0ml/min、UV254nm |
| p-Acetaminophen Caffein Salicylamide | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=40/60 1.0ml/min、UV254nm |
| Ethoxybenzamide Phenacetin | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=45/55 1.0ml/min、UV254nm |
| Ampicilin | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=35/65 1.0ml/min、UV254nm |
| Vanilin | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=40/60 1.0ml/min、UV254nm |
| Phenobarbital 8-Cl-Theoffilin | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)20mMリン酸緩衝液(pH3.0)1.5ml/min (A)CH ₃ OH/リン酸緩衝液(pH3.0)=50/50 1.0ml/min、UV273nm |

| | | | |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prednisone Cortisone Cortisol Dexamethasone Corticosterone | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)H ₂ O, 10%CH ₃ OH 1.0ml/min、各5min通液 (A)45% CH ₃ OH 1.0ml/min UV234nm |
| Creatinine | TSKprecolumn BSA-ODS | TSKgel ODS-80T _M | (P)0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0)1.5ml/min (A)0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0)1.2ml/min UV234nm |

*前処理時間はいずれも1~1.5ml/minで2~4分、その後カラムスイッチングを行いました。

* (P): 前処理液、(A): 分析液

7. おわりに

TSKprecolumnシリーズの充填カラムは、タンパク質などの高分子物質を含む試料中の低分子物質を疎水的に吸着することによって、オンカラムで高分子物質を除去できる試料前処理用カラムです。本カラムの特長は、こ

れまで煩雑であった除タンパク操作が試料を直接注入するだけで簡便に達成できる点にあります。また、オートサンプラAS-8010や、スーパーシステムコントローラSC-8010と接続することにより全自動分析が可能です。

参考文献

1. “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
2. “Direct Enrichment of Tryptophan and Its Metabolites in Plasma onto a Precolumn Followed by Reversed Phase HPLC Analysis”, H. Yoshida, et al, Chem. Pharm.Bull.,30(10)3827-3830(1982)
3. “Enrichment and High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Tryptophan Metabolites in Plasma”, H.Morita, et al, Anal. Biochem.,118,142-146(1981)
4. “試料の前処理を自動化した高速液体クロマトグラフィーによる薬物の分析”高橋裕明、他、分析化学、35(3),T22-T27(1985)
5. “液体クロマトグラフィー(血清直接注入法)による血中Cortisolの測定”野崎修、他、臨床化学、16(4)188-193(1987)
6. “抱合体加水分解不要な尿中17ケトステロイド測定法の考案”、野崎修、他、臨床化学、18(2)49-54(1989)
7. “Automated Determination of Drugs in Serum By Liquid Chromatography with Column-Switching. Separation of Antiepileptic Drugs and Metabolites” K.Matsumoto, et al, Clin.chem.,34(1)141-144(1988)
8. “自動カラムスイッチング高速液体クロマトグラフィーによる血清中のアンピシリンの定量”、疋田興造、他、分析化学、37,566-569(1988)
9. Determination of Bromperidol in Serum by Automated Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography” K.Hikida, et al, J.Chromatography,495(1989)227-234
10. “Analytical Studies on β -Lactam Antibiotics. III. Automated High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of the Orally Active Antibiotic Cefitibuten in Human Plasma and Urine.” K.Matsuura, et al, J. Chromatography,494(1989)231-245
11. “Rapid Quantification of Paraquat and Diquat in Serum and Urine using High-Performance Liquid Chromatography with automated Sample Pre-treatment”, I.Nakagiri, et al, J.Chromatography, 481(1989)434-438
12. “生体試料の前処理法としての水系ゲル濾過カラムを接続したクロマトグラフィー”清水 剛文、他、薬学雑誌、103(1983)1174-1179
13. “Automated Determination of Drugs in Serum by Column-Switching. High-Performance Liquid Chromatography. Separation of Theophylline and Its Metabolites”, K.Matsumoto, et al, J. Chromatography,425(1988)323-330
14. “HPLCを用いる血中循環器用薬物の全自動分析”、高橋裕明、他、TDM研究、3(2)123-125(1986)