

ノ ー ト

セミマイクロカラムとカラムスイッチング法を用いる高速液体クロマトグラフィーによる血清中プロポフォールの定量

橋本 佳巳^{®*}, 千葉 良子^{**}, 小林 善美^{***}, 森山 弘之^{*},
松本 宜明^{**}, 田 中 彰^{**}, 松本 光雄^{**}

Determination of propofol in human serum by HPLC using a semi-micro bore column and a column-switching technique

Yoshimi HASHIMOTO^{*}, Ryoko CHIBA^{**}, Yoshimi KOBAYASHI^{***}, Hiroyuki MORIYAMA^{*},
Yoshiaki MATSUMOTO, Akira TANAKA and Mitsuo MATSUMOTO^{**}

^{*} Separation Center, Tosoh Co., 4560, Kaisei-cho, Shinnanyo-shi, Yamaguchi 746

^{**} Showa College of Pharmaceutical Sciences, 3-3165, Higashitamagawagakuen, Machida-shi, Tokyo 194

^{***} Scientific Instrument Division, Tosoh Co., 2743-1, Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa 252

(Received 25 November 1996, Accepted 16 January 1997)

An analytical method for the determination of propofol (2,6-diisopropylphenol) in human serum was investigated by high-performance liquid chromatography using a semi-micro bore column and a column-switching technique. The semi-micro bore column {TSKgel ODS-80Ts (2 mm i.d.×150 mm)} gave a higher peak height (ca. 3.5 folds) compared with that of a conventional column (4.6 mm i.d.). As the result of an examination of some pretreatment columns, higher recoveries of propofol on TSK precolumn BSA-ODS and TSK precolumn PW were obtained. TSK precolumn PW was adopted as a pretreatment column, because its less adsorptive ability was considered to be effective in eliminating the hydrophobic compounds in human serum. Under the optimized analytical conditions, the linearity of the calibration curve was obtained over the range of 5~300 ng/ml and the detection limit was 1.5 ng/ml ($S/N=3$). The relative standard deviation against a practical sample was 2.4% ($n=6$). As a consequence, this method was suggested to be utilized for a highly sensitive quantitative analysis of propofol in human serum of an anesthetized patient.

Keywords : HPLC; propofol; column switching; semi-micro bore column; human serum.

1 緒 言

静脈内麻酔薬であるプロポフォール (2,6-ジイソプロ

^{*} 東ソー(株)セパレーションセンター: 746 山口県新南陽市開成町 4560

^{**} 昭和薬科大学: 194 東京都町田市東玉川学園 3-3165

^{***} 東ソー(株)科学計測事業部: 252 神奈川県綾瀬市早川 2743-1

ピルフェノール) は、投与後の体内分布、代謝、排泄が速く、麻酔の導入が速やかで作用時間が極めて短い、反復投与でも体内蓄積が少ない、という優れた特徴を有している¹⁾。近年、プロポフォールが多用されるとともに、その血中濃度の簡便で再現性の良い分析法の確立が求められている。

血中プロポフォールの測定法としては高速液体クロマ

トグラフィー (HPLC) が広く用いられ、これまでに検出器として、蛍光検出器²⁾³⁾、電気化学検出器⁴⁾、紫外吸光検出器^{5)~7)}等を使用した例が報告されている。しかし、血中成分の HPLC 分析においては分析カラムの劣化を防ぐため、注入前に試料中のタンパク質等の高分子成分を除去する必要がある、前処理が煩雑であるという問題があった。一方、HPLC システムに前処理カラムと六方切り換えバルブを加え、オンラインで試料の除タンパクを行うカラムスイッチング法⁸⁾は、試料の前処理が不要な簡便性から血中薬物の測定方法として広く用いられている。

本報ではカラムスイッチング法の血中プロポフォール測定への適用を検討した。カラムスイッチング法による血中プロポフォールの測定については、これまでも報告がある²⁾が、ここでは、主に分析カラムのマイクロ化による感度の向上、及び前処理カラムの保持力(疎水性)の違いによる回収率への影響について調べ、分析条件の最適化を検討した。その結果、良好な分析条件を確立し、実試料測定への適用を行ったので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

HPLC のシステムは、2 系列の溶離液が送液可能なポンプ CCPM-II, オートサンプラ AS-8020 (試料注入量 10 μ l), バルブコントローラー VC-8020, カラム恒温槽 CO-8020 (温度 40°C), 蛍光検出器 FS-8020 (励起波長 276, 蛍光波長 310 nm), システム制御及びデータ処理装置 SC-8020 の各ユニット (すべて東ソー製) により構成した。装置の構成図を Fig. 1 に示す。

分析カラムには TSKgel ODS-80Ts (2 mm i.d.×150 mm, 及び 4.6 mm i.d.×150 mm), 前処理カラムには TSKprecolumn BSA-ODS, 同 PW, 同 SW (各 4.6 mm i.d.×35 mm) の 3 種類を使用して検討を行った。又、送液ポンプとオートサンプラの間に前処理用溶離液中の不純物を除去する目的で TSKguardcolumn Carbon-500 (4.6 mm i.d.×50 mm) をトラップカラムとして接続した。

分析用溶離液にはアセトニトリルと 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) の混合溶液 (65 : 35) を用いた。流量は分離カラムの内径が 4.6 mm の場合には 1 ml/min, 2 mm の場合には 0.2 ml/min とした。前処理用溶離液には 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を使用し、流量は 1.5 ml/min とした。

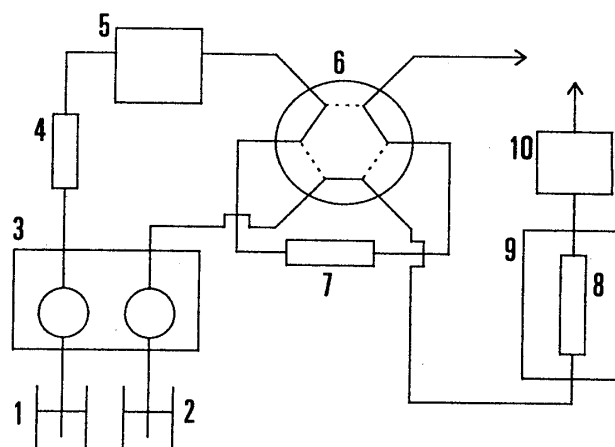


Fig. 1 Schematic diagram of HPLC

1: buffer for pretreatment; 2: eluent; 3: pump; 4: trap column; 5: auto sample injector; 6: six-port switching valve; 7: pretreatment column; 8: analytical column; 9: column oven; 10: fluorescence detector

2.2 試 薬

プロポフォール、及び内標準物質として使用した 2-*t*-ブチル-6-メチルフェノール (いずれも Aldrich 製) は共にアセトニトリルにて溶解し、あらかじめ 10 mg/ml に調製した後、水で希釈して任意の濃度の標準溶液を得た。プロポフォールを投与された患者血清は、水により 10 倍に希釈することにより調製したが、このとき、内標準試料溶液をその最終濃度が 200 ng/ml になるように添加した。アセトニトリルは和光純薬製の高速液体クロマトグラフィー用を、水は Milli-Q システムにて精製した純水を用いた。その他の試薬はすべて和光純薬製の特級品を用いた。

2.3 六方切り換えバルブの時間制御

六方切り換えバルブの時間制御は以下のように行った。まず、バルブを Fig. 1 の実線の位置にして前処理用溶離液により試料を前処理カラムへ導入する。このとき前処理カラムは試料中のタンパク質等の高分子成分を素通りさせ、疎水性の低分子成分のみを保持する。試料注入から所定の時間 (以下、この時間を前処理時間とする) 経過後、バルブを切り換え、溶出力の強い分析用溶離液により前処理カラムから目的成分を分析カラムへ導き、分離を行った。

3 結果及び考察

3・1 セミマイクロカラムの利用

通常の HPLC システムにおいて、カラムスイッチング法を利用せず、試料を分析カラムへ直接注入し検討を行った。分離カラムとして内径 4.6 mm の通常カラムと内径 2 mm のセミマイクロカラムを使用したところ、内径 2 mm のカラムのピーク高さは理論的には内径 4.6 mm のカラムと比較して約 5.3 倍（ピーク高さはカラム内径の 2 乗に反比例する）となるはずであるが、ここでは約 3.5 倍であった（Table 1）。内径 2 mm のカラムではピーク幅が広く、試料の過負荷やカラム外でのピークの広がりが推察された。

内径 2 mm のセミマイクロカラムではそのカラム性能が完全には発揮されていないことが考えられたが、本分析における目的ピークの分離には支障がなく、又ピーク高さも向上することから、以下セミマイクロカラムを使用して検討を行った。

3・2 前処理カラムの保持力（疎水性）の影響

前処理カラムとして使用した TSKprecolumn BSA-ODS、同 PW、同 SW はいずれも極性の高い溶離液では親水性の高分子物質（タンパク質）を素通りさせ、細孔内に低分子物質を疎水的に保持する特徴を有している。各カラムで保持力が異なり、TSKprecolumn BSA-ODS が一番強く、以下 同 PW、同 SW の順で、分析対象物質の疎水性の違いにより各カラムを選択することが可能となっている。各カラムの特性を Table 2 にまとめる。

本分析において、各前処理カラムを使用した場合の前処理時間と回収率の関係を Fig. 2 に示す。回収率は同じ濃度の試料を直接注入した場合のピーク面積を基準として計算した。回収率は、TSKprecolumn BSA-ODS、同 PW において前処理時間 10 分までほぼ 100% となった。しかし、TSKprecolumn SW では前処理時間の延長とともに大幅な低下が見られ、細孔内にプロポフォルをトラップする十分な保持力（疎水性）がないことが示唆された。一般に前処理カラムからのタンパク質分画の溶出には、約 3 分以上の前処理時間が必要とされている⁸⁾ため、TSKprecolumn SW はプロポフォル分析における前処理カラムとしては不適であると考えられた。一方、TSKprecolumn BSA-ODS、同 PW を比較した場合、目的成分の回収率に差はないものの PW のほうが保持力が弱く、それに応じて他の疎水性きょう雑物質の分析カラムへの導入を低減させる効果が期待された。このため本分析においては前処理カラムとして

Table 1 Comparison of peak heights and widths between 4.6 mm i.d. and 2 mm i.d. column

	Column inside diameter	
	4.6 mm	2 mm
Propofol		
peak height ^{a)}	131.7	454.9
peak width ^{b)}	6.2	11.8
2- <i>t</i> -Butyl-6-methylphenol		
peak height ^{a)}	85.5	302.4
peak width ^{b)}	6.8	11.5

a) integrator output (unit, mV), b) width at peak half height (unit, s)

Table 2 Characteristics of TSKprecolumn series

	BSA-ODS	PW	SW
Base material	silica gel	polymer gel	silica gel
Hydrophobic layer	ODS(C ₁₈)	-CH ₂ -	-CH ₂ -
Hydrophilic layer	BSA	diol	diol
Particle diameter	20 μm	12 μm	10 μm
pH range	2~7.5	2~12	2~7.5

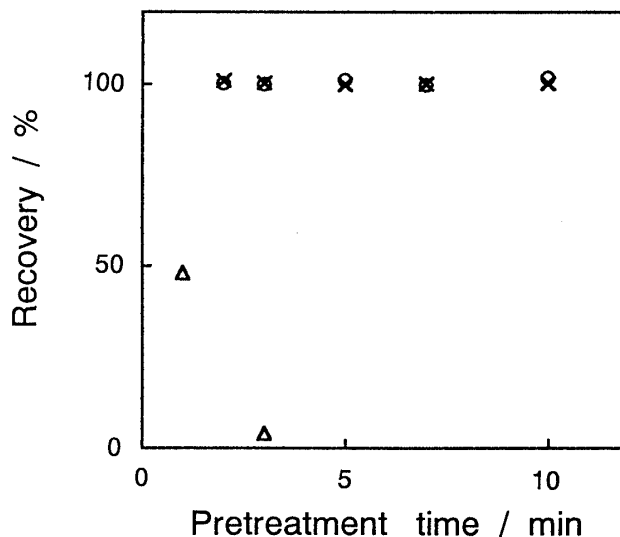


Fig. 2 Effect of pretreatment time on recovery of propofol

Analytical column: TSKgel ODS-80Ts, 2 mm i.d. × 150 mm; Eluent: CH₃CN-10 mM phosphate buffer (pH 6.8) (65 : 35); Flow rate: 0.2 ml/min; Column temperature: 40°C; Pretreatment column: ×, TSKprecolumn BSA-ODS; ○, TSKprecolumn PW; △, TSKprecolumn SW, 4.6 mm i.d. × 35 mm; Buffer for pretreatment: 50 mM phosphate buffer (pH 6.8); Buffer flow rate: 1.5 ml/min; Injection volume: 10 μl

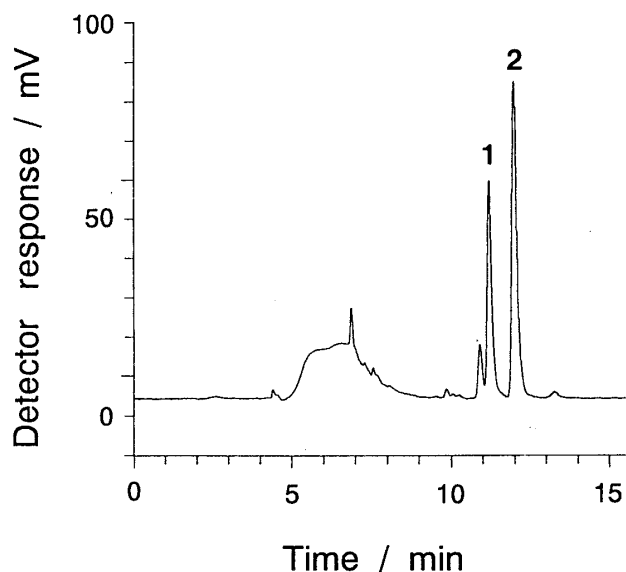


Fig. 3 Chromatogram of standard samples

Pretreatment column: TSKprecolumn PW, 4.6 mm i.d.×35 mm; Pretreatment time: 3 min; Peaks: 1, 2-*t*-buthyl-6-methylphenol; 2, propofol; Other conditions were same as Fig. 2.

TSKprecolumn PW を使用することとした。又、前処理時間は分析時間を考慮して3分とすることとした。以上により決定した条件において測定したクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

3・3 検量線

プロポフォールの標準試料について測定を行い、内標準物質 2-*t*-ブチル-6-メチルフェノール 200 ng/ml との面積比によって検量線を作成した。測定を行った 5～300 ng/ml の濃度範囲で、相関係数 0.999 のほぼ原点を通る良好な直線性が認められた。又、検出限界は $S/N=3$ で 1.5 ng/ml (絶対量で 15 pg) であった。

なお、検量線の濃度範囲の上限はインテグレーターのフルスケールにより制限されているため、蛍光検出器の光電子増倍管の印加電圧を下げることにより、濃度範囲を高濃度側へシフトさせることも可能であった。

3・4 実試料への適用

実際にプロポフォールを投与された患者血清を本法により測定したクロマトグラムを Fig. 4 に、又 6 回の繰り返し測定により定量を行った結果を Table 3 に示す。良好なクロマトグラムが得られ、相対標準偏差も 2.4% と再現性も良好であった。

プロポフォールの有効血中濃度は 500～1500 ng/ml

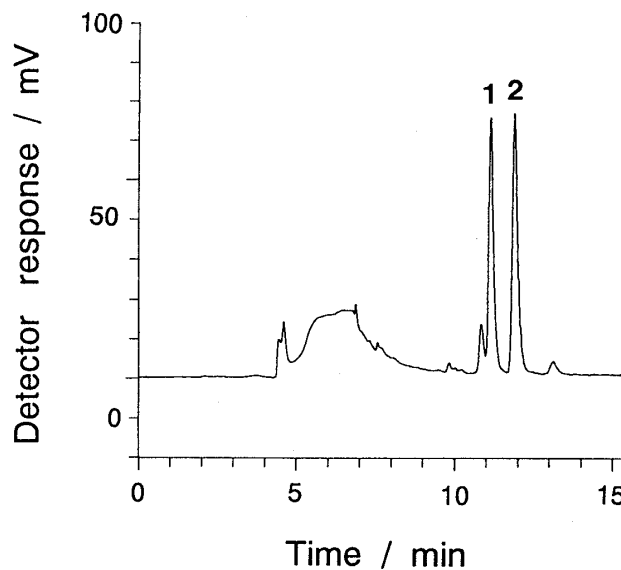


Fig. 4 Chromatogram of human serum of a patient anesthetized by propofol

Chromatographic conditions were same as Fig. 3.

Table 3 Repeatability test ($n=6$) of the present method

No.	Propofol/ng ml ⁻¹
1	2608
2	2605
3	2757
4	2605
5	2587
6	2640
Mean	2634
RSD(%)	2.4

Sample: human serum of a patient anesthetized by propofol

とされ、従来のサイズの分析カラムでの検出でも問題はないが、システムを高感度化することにより、試料を希釈して注入することが可能となる。このため、前処理カラムの化学的耐久性の向上が期待される。

プロポフォールは 1995 年 12 月に発売後、臨床の場で広く用いられてきたが、日本人の体内動態解析の報告は比較的少ない。前処理の簡便化による測定の迅速化を実現し、かつ高感度化を可能とした本法は、今後、日本人の体内動態解析の蓄積を行う上で極めて有用であると考えられる。

本研究を進めるにあたり、血清試料を提供していただ

た国立熱海病院麻酔科 山根 健, 牛久愛和総合病院麻酔科 鈴木康生両先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) 沼田克雄: 現代医療, **26**, 2501 (1994).
- 2) P. Altmayer, U. Buch, H. P. Buch, R. Larsen: *J. Chromatogr.*, **612**, 326 (1993).
- 3) G. F. Plummer: *J. Chromatogr.*, **421**, 171 (1987).
- 4) G. Mazzi, M. Schinella: *J. Chromatogr.*, **528**, 537 (1990).
- 5) I. Pavan, E. Buglione, M. Massiccio, C. Gregoretti, L. Burbi, M. Berardino: *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 164 (1992).
- 6) R. H. Pullen, C. M. Kennedy, M. A. Curtis: *J. Chromatogr.*, **434**, 271 (1988).
- 7) T. B. Vree, A. M. Baars, P. M. R. M de Grood: *J. Chromatogr.*, **417**, 458 (1987).
- 8) 高橋裕明, 森山弘之, 松原健一, 深町 充, 海野益 郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **35**, T22 (1986).