

Mass chromatograms and mass spectra of acetaminophen (APAP) extracted from sample serum

フロムワレリル尿素の分析

<前処理>

1. 試料 0.2ml に水 1ml、内部標準 (2-bromoisobutyrylurea 1.0mg/ml) 溶液 10 μ l を加える。
2. 混合溶液を Extrelut カラム (充填量 2g) に注ぎ込み、20 分間室温で放置する。
3. 薬物を酢酸エチルで溶出し、窒素気流下で溶媒を留去する。
4. 残渣を移動相 0.1ml に溶解し、その 10 μ l を HPLC で分析した。

<分析条件>

島津製作所 LC-10Vp system

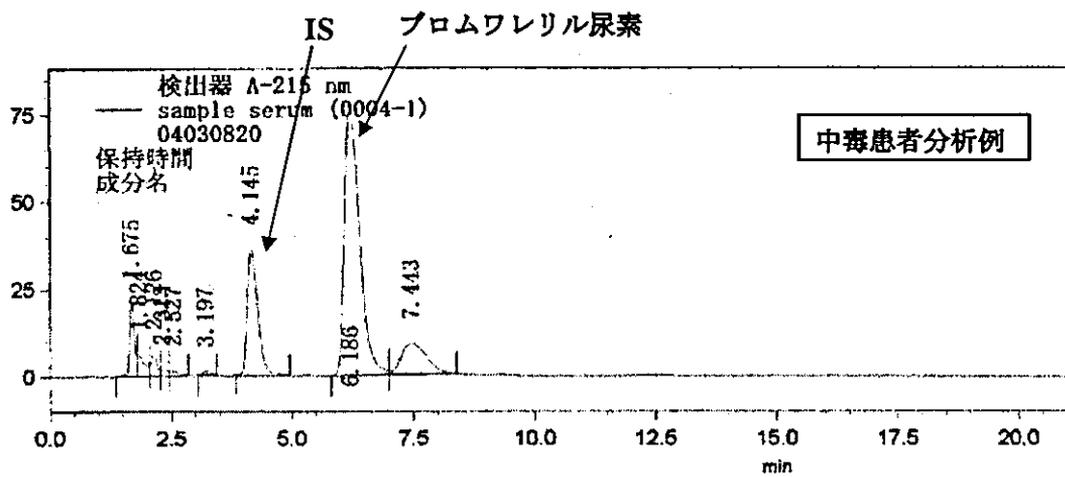
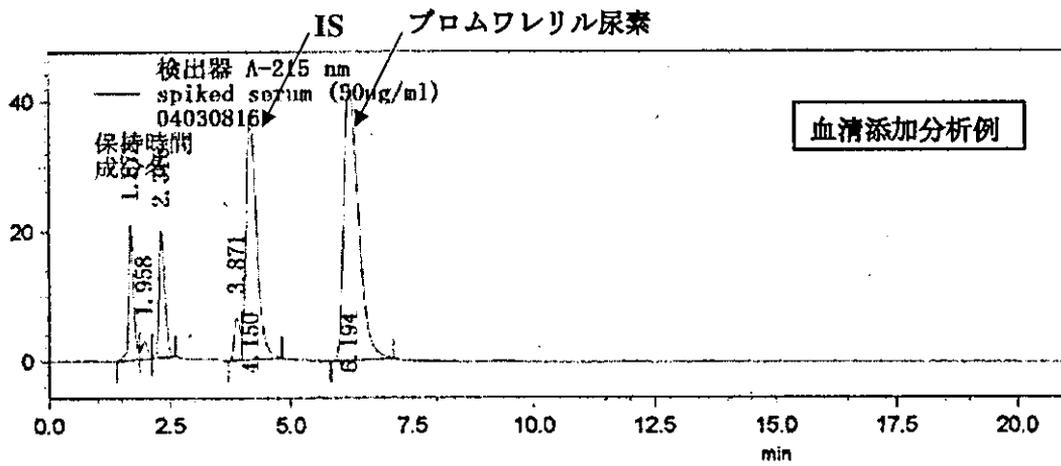
column ; Asahipak ODP-50 (4.6 mm ID \times 150mm)

eluent; CH₃CN-phosphate buffer (10mM, pH5.7) [25:75, v/v]

flow rate; 1.0ml/min

oven temp. ; 40 $^{\circ}$ C

detection; UV (215nm)



イブプロフェンの分析

<前処理>

- ・ 血漿及び胃内容物に関しては、除蛋白のために以下の処理を行った。なお、尿に関しては、サンプルに内部標準物質を添加し、直接 HPLC システムに注入した。
1. エッペンドルフチューブ内のサンプル 50 μ l に内部標準物質(diclofenac, 100 μ g/ml)を 10 μ l 添加する。なお、検量線はブランクのヒト血漿 50 μ l に ibuprofen (1-1000 μ g/ml)を添加したものをサンプルとし、以下同様の処理を行う。
 2. 1N HCl を 10 μ l、抽出溶媒である hexan/2-propanol (99:1 ; v/v)を 1 ml 添加し、10 分間振盪し除蛋白を行う。
 3. 振盪後、12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、hexan/2-propanol 層 900 μ l を試験管へ移す。この抽出溶媒を窒素ガスにより濃縮、乾固させ、得られた残渣に移動相を 250 μ l 加えて再溶解し、HPLC による測定に使用する。

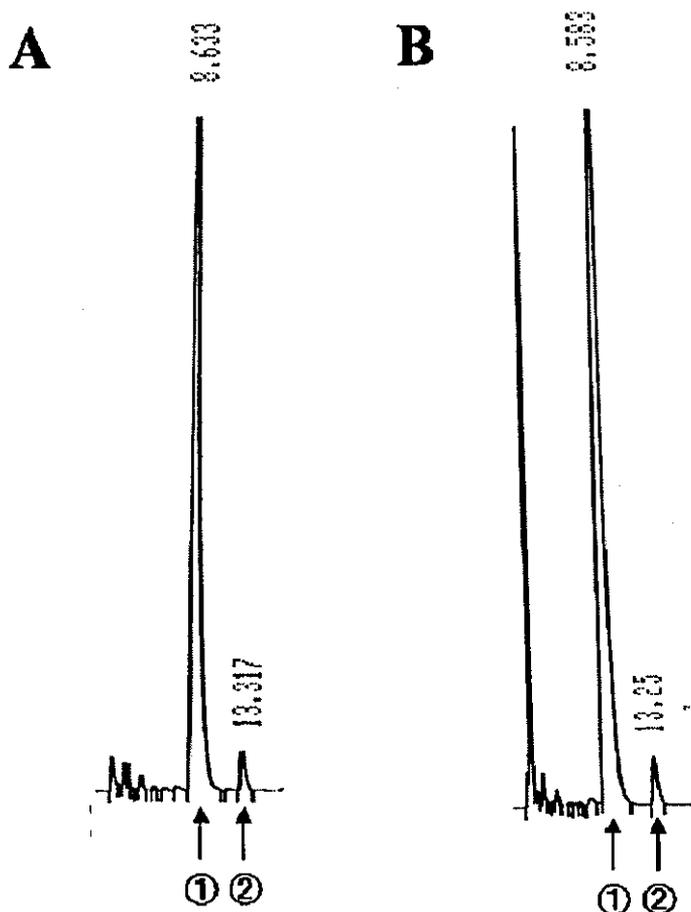
<分析条件>

HPLC システム

- ・ システムコントローラ SCL-6A
- ・ 送液ユニット LC-6A
- ・ オートインジェクタ SIL-6A
- ・ カラムオープン CTO-6A
- ・ 紫外線可視分光光度計検出器 UV-10AV
- ・ データ処理装置 C-R6A 【島津製作所】
- ・ カラム COSMOSIL (4.6 Φ x150 mm) 【Nacalai tesque】

- ・ 移動相 0.1M phosphate buffer : Acetonitrile 3 : 2 (v/v) pH 5.0
- ・ flow rate 1.2 ml/min
- ・ 温度 40 $^{\circ}$ C
- ・ 検出光度 279 nm

【クロマトグラム】



A : 血漿検量線 (100 μ g/ml)

B : 症例番号 0025 血漿サンプル

① : diclofenac (内部標準物質)

② : ibuprofen

参考文献 :

- Fukuda M., Kitaichi K., Abe F., Takagi K., Takagi K., Morishima T., Hasegawa T. Altered brain penetration of diclofenac, mefenamic acid and acetaminophen in Shiga-like toxin II-treated mice. *J. Pharmacol. Sci.*, in press.
- Hirai T., Matsumoto S., Kishi I. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;692:375-388.
- Mikami E., Goto T., Ohno T., Matsumoto H., Inagaki K., Ishihara H., Nishida M. Simultaneous analysis of anthranilic acid derivatives in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with isocratic elution. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;744:81-89.

ゾルピデムの分析

<前処理>

1. サンプル 100 μ l に内部標準物質 (trazodone, 100 μ g/ml in methanol) を 10 μ l 加える。
2. ヘキサンを 1ml と 1N NaOH を 0.5ml を加え、15 分間振盪を行う。
3. 振盪後、遠心 (12000rpm, 5min) を行う。
4. 遠心後、その上清 0.9ml をガラスチューブに移し、 N_2 ガスにより完全に蒸発乾固させる。
5. 乾固されたサンプルを移動相 200 μ l に溶解後、50 μ l を HPLC システムに注入し、測定を行う。

<分析条件>

HPLC システム (島津製作所)

- | | |
|-------------|---------------|
| ・システムコントローラ | CLASS-VP |
| ・送液ユニット | LC-10ADvp |
| ・オートインジェクタ | SIL-10ADvp |
| ・カラム | COSMOSIL 5C18 |
| ・カラムオープン | CTO-10ACvp |
| ・蛍光検出器 | RF-10Acvp |
-
- | | |
|------------|--|
| ・移動相 | 0.05NaH ₂ PO ₄ : methanol 55 : 45 (v/v) pH 6.0 |
| ・flow rate | 0.8ml/min |
| ・温度 | 40℃ |
| ・検出条件 | Ex. 254nm, Em. 390nm |

<参考>

・検量線の作成

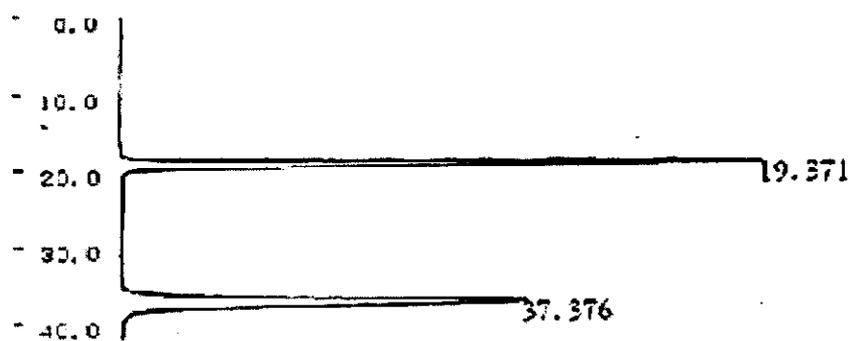
サンプル血清の検量線は正常ヒト血清を用い、Zolpidem 濃度を 0.3125, 0.156, 0.078, 0.039, 0.0195 μ g/ml に調整して作製し、使用した。尿サンプル、胃内容物の検量線は MilliQ 水を用いて同濃度の系列を作製して使用した。以下、抽出操作はサンプルに準じて行った。

いずれのサンプルも Zolpidem 濃度が高値であったため、以下のような希釈を行った。

- * 血清サンプルはコントロール血清にて 1/8 に希釈して測定を行った。
- * 尿サンプルは MilliQ にて 1/10 に希釈して測定を行った。
- * 胃内容物はサンプルを均一に混和した後、約 3ml を取り出した。その胃内容物は遠心 (4500rpm, 10min) し、大きな不純物を沈殿させ、上清をフィルター (DISMIC-25, 0.50 μ m) した溶液をサンプルとした。測定では、サンプルはさらに MilliQ にて 1/1000 に希釈して測定を行った。

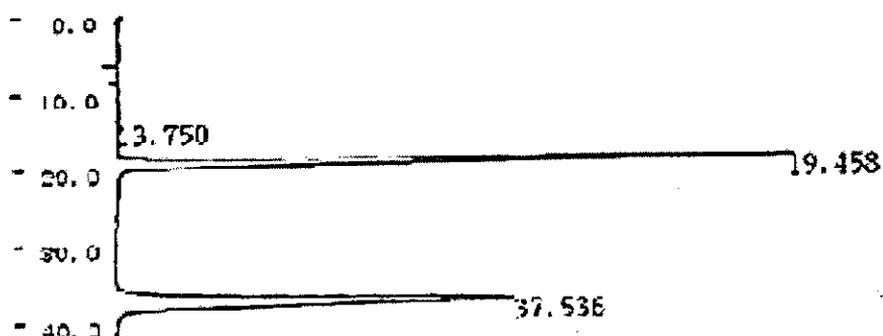
【クロマトグラム】

検量線 Zolpidem 0.156 μ g/ml in MilliQ



Zolpidem: 19.3 min trazodone: 37.3 min

症例 42 胃内容物サンプル(1/1000)



【参考文献】

- Pharmacokinetic properties of zolpidem in elderly and young adults: possible modulation by testosterone in men. *Br J Clin Pharmacol.* 2003 Sep;56(3):297-304.
- Validation of a method for the determination of zolpidem in human plasma using LC with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2000 Apr;22(3):495-504.
- Determination of zolpidem in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Nov 12;734(2):299-305.

スルピリドの分析

<前処理>

1. サンプル 200 μ l に内部標準物質 (metoclopramide, 20 μ g/ml in methanol) を 20 μ l 加える。
2. 酢酸エチルを 2ml と 0.05 N NaOH を 1ml を加え、15 分間振盪を行う。
3. 振盪後、遠心 (4500rpm, 10min) を行う。
4. 遠心後、その上清 1.5ml をガラスチューブに移し、N₂ ガスにより完全に蒸発乾固させる。
5. 乾固されたサンプルを移動相 200 μ l に溶解後、溶液を遠心 (16000rpm, 10min) する。
6. 遠心後、上清の 50 μ l を HPLC システムに注入し、測定を行う。

<分析条件>

HPLC システム (島津製作所)

- | | |
|-------------|---------------|
| ・システムコントローラ | CLASS-VP |
| ・送液ユニット | LC-10ADvp |
| ・オートインジェクタ | SIL-10ADvp |
| ・カラム | COSMOSIL 5C18 |
| ・カラムオープン | CTO-10ACvp |
| ・蛍光検出器 | RF-10Acvp |
-
- | | |
|------------|---|
| ・移動相 | 0.1M NaH ₂ PO ₄ : Acetonitrile 90 : 10 (v/v) pH 4.7 |
| ・flow rate | 0.7ml/min |
| ・温度 | 40℃ |
| ・検出条件 | Ex. 300nm, Em. 365nm |

<参考>

・検量線の作成

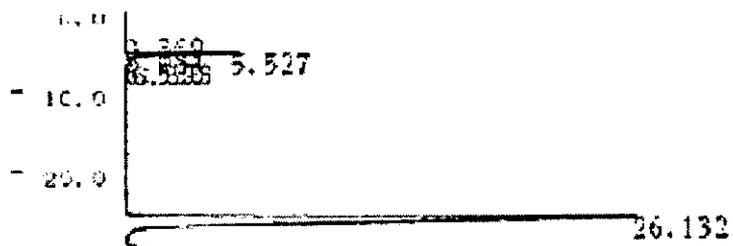
サンプル血清の検量線は正常ヒト血清を用い、sulpiride 濃度を 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 μ g/ml に調整して作製し、使用した。尿サンプル、胃内容物の検量線は MilliQ 水を用いて同濃度の系列を作製して使用した。以下、抽出操作はサンプルに準じて行った。

いずれのサンプルも Sulpiride 濃度が高値であったため、以下のような希釈を行った。

- * 血清サンプルはコントロール血清にて 1/4 に希釈して測定を行った。
- * 尿サンプルは MilliQ にて 1/100 に希釈して測定を行った。
- * 胃内容物はサンプルを均一に混和した後、約 3ml を取り出した。その胃内容物は遠心 (4500rpm, 10min) し、大きな不純物を沈殿させ、上清をフィルター (DISMIC-25, 0.50 μ m) した溶液をサンプルとした。測定では、サンプルはさらに MilliQ にて 1/1000 に希釈して測定を行った。

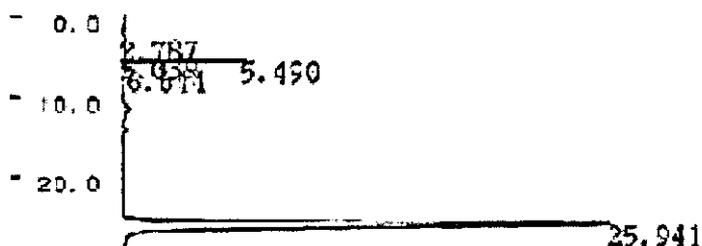
【クロマトグラム】

検量線 1.25 μ g/ml in MilliQ



Sulpiride:5.5 min metoclopramide:26.1 min

症例 94 尿サンプル(1/100)



【参考文献】

- Novel methylcellulose-immobilized cation-exchange precolumn for on-line enrichment of cationic drugs in plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 Aug 5;807(2):327-34.
- Studies on intestinal absorption of sulpiride (3): intestinal absorption of sulpiride in rats. Biol Pharm Bull. 2004 Jan;27(1):77-81.
- Development of a high-performance liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sulpiride. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001 Nov 5;763(1-2):157-63.

サリチル酸の分析

<前処理>

1. 血清1mlに内部標準物質 (1000 μ g/mlの N-Acetyl-o-aminophenol (O-APAP) メタノール溶液) を10 μ l加える。
2. 次にアセトンを1ml加え、ミキサーで混合後に遠心分離 (3,000rpm, 2min)して除蛋白する。
3. 遠心分離で得られた上清を分取し、0.2N酒石酸 (pH1.0) 1mlを加える。
4. 次に酢酸エチル3mlを加えた後によく振騰し、酸性薬物を酢酸エチルで抽出する。
5. 酢酸エチル層を分取し、減圧下40 $^{\circ}$ Cで乾固させる。
6. 残渣を移動相に溶解し、その10 μ lをHPLCに導入する。

<分析条件>

装置: LC-10ADVP ポンプ、CTO-10ACVP カラムオープン、SPD-M10AVP ダイオードアレイ検出器、SIL-10ADVP オートサンプラー、CLASS-VP 解析ソフト (島津製作所)

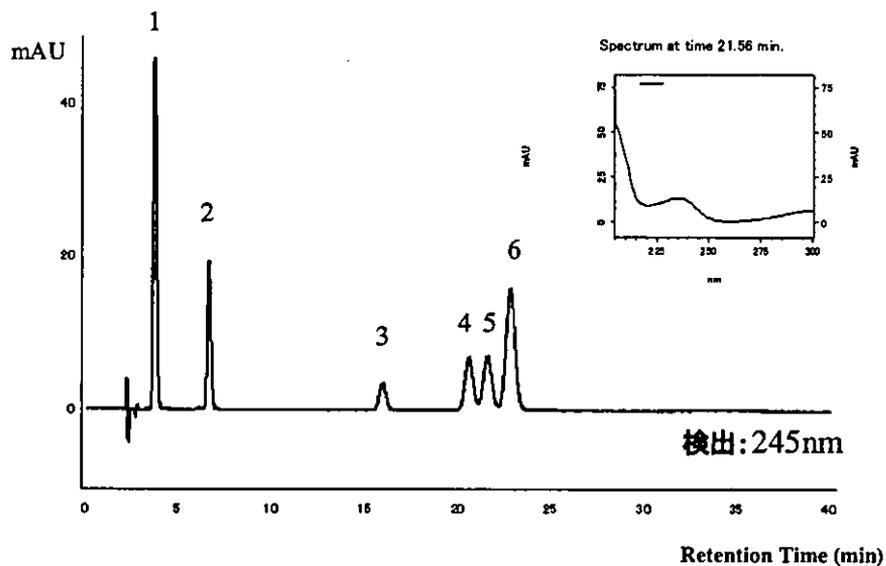
カラム: Inertsil ODS-2 (内径4.6mm、長さ150mm、粒径5 μ m、GLサイエンス製カラム)

移動相: 100mM 過塩素酸ナトリウム (pH 2.5) /メタノール/アセトニトリル (149/42/9: v/v/v)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相流速: 0.8 ml/min

定量波長: 245nm



標準溶液のクロマトグラムとサリチル酸のUVスペクトル
ピーク: 1 = Acetaminophen (100ng), 2 = o-APAP (IS; 100ng), 3 = Aspirin (100ng), 4 = Ethenzamide(100ng), 5 = Salicylic acid (100ng), 6 = Phenacetine (100ng).

*分析精度

検量線は 1ng - 1000ng (試料中濃度 $0.1\mu\text{g/ml}$ - $100\mu\text{g/ml}$ に相当) の範囲で良好な直線性を示し、 $S/N=5$ としたときの検出限界は 500pg (試料濃度 $0.05\mu\text{g/ml}$ に相当)。標準血清に $1.0\mu\text{g/ml}$ となるよう添加したサリチル酸の平均回収率は $97.6\pm 1.2\%$ ($n=5$)。この HPLC 条件は図 1 に示すようにアセトアミノフェン、アスピリン、サリチル酸、フェナセチン、エテンザミドを一斉分離できる。

*文献

中毒研究. 16,93-98, 2003.

ニフェジピンの分析

<前処理>

1. 試料 200 μ l にホウ酸緩衝液 (pH10.2) 0.5ml、内部標準溶液 (prazepam, 0.1mg/ml) 溶液 2 μ l とヘキサン 200 μ l を加えて攪拌する。
2. 遠心分離 (13,400rpm, 5min) 後、上清をとる。
3. その 1 μ l を GC/MS で分析する。

<分析条件>

Agilent 6890GC/5973MSD

Column ; HP-5MS (0.25mm, 30m, 0.25 μ m)

Oven temp. ; 100 $^{\circ}$ C (1min) -20 $^{\circ}$ C/min-280 $^{\circ}$ C (3min)

Injection temp. ; 250 $^{\circ}$ C

Interface temp. ; 230 $^{\circ}$ C

Injection mode ; pulsed splittless

Mass range ; m/z 284, 329 (10-12min : nifedipine)

m/z 295, 324 (12-13min : prazepam)

バルピツール酸の分析

<前処理>

1. 試料 0.2ml に塩酸 (0.01N) 1ml、内部標準 (セコバルピタール 0.1mg/ml) 溶液 30 μ l を加える。
2. 混合溶液を Extrelut カラム (充填量 2g) に注ぎ込み、20 分間室温で放置する。
3. 薬物を酢酸エチルで溶出し、窒素気流下で溶媒を留去する。
4. 残渣を酢酸エチル 0.2ml に溶解し、その 1 μ l を GC/MS で分析する。

<分析条件>

Agilent 6890GC/5973MSD

column; HP-5MS (0.25 mm ID \times 30m, film thickness 0.25 μ m)

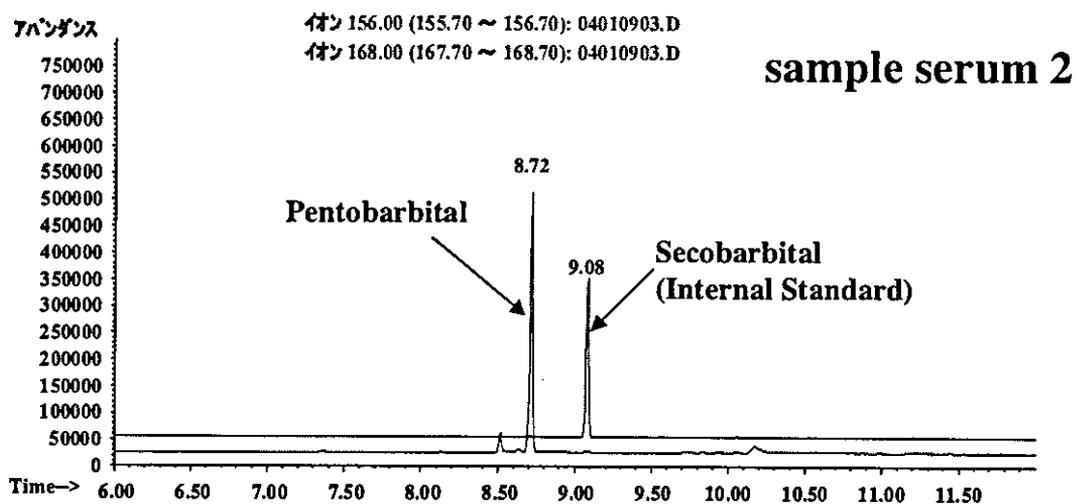
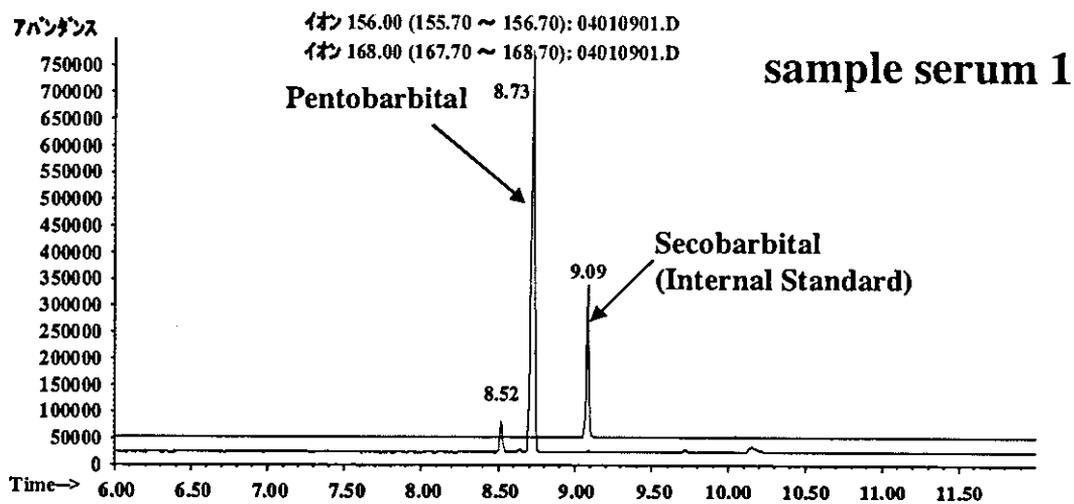
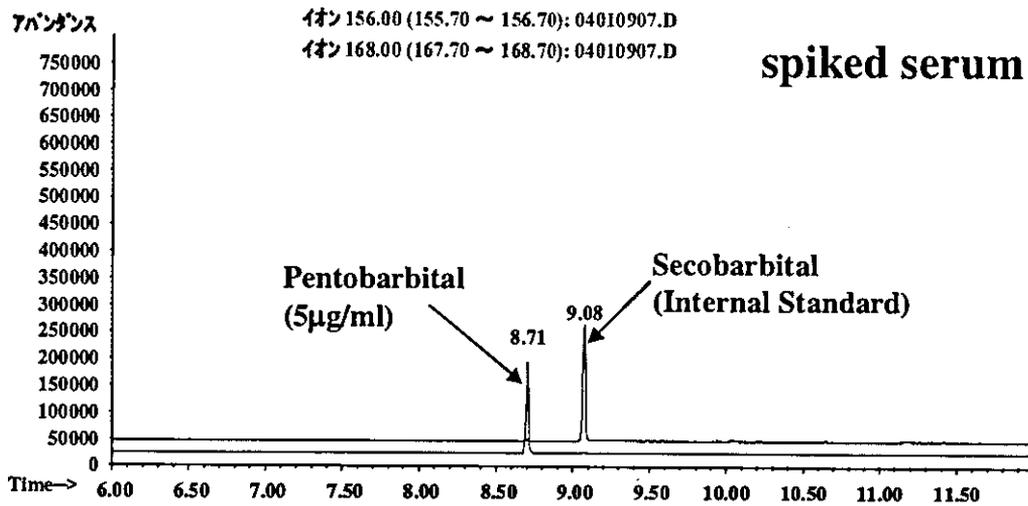
oven temp.; 100 $^{\circ}$ C (1min) - 20 $^{\circ}$ C/min - 280 $^{\circ}$ C (3min)

injector temp.; 250 $^{\circ}$ C

detector temp.; 230 $^{\circ}$ C

carrier; He (1.0ml/min)

mass range; m/z 50-550



カルバマゼピンの分析

<前処理>

1. 血清 100 μ l に内部標準物質 (IS) としてプロメタジン 0.5 μ g (100 μ g/ml 溶液の 5 μ l) を添加した後、ボルテックスミキサーで十分攪拌する。
2. ジエチルエーテル 1ml を添加しボルテックスミキサーで1分間攪拌する。
3. 遠心後、上清を窒素気流下で蒸発乾固する。
4. メタノール 50 μ l で再溶解する。
5. 1 μ l を GC-MS 試料とする。

<分析条件>

ガスクロマトグラフィー質量分析計

Hewlett Packard 5890 Series II/5971 mass selective detector

Column: HP-5, 30m x 0.25mm id. x 0.25 μ m thickness

Injector Temp. : 250 $^{\circ}$ C

Oven Temp. : 200 $^{\circ}$ C (3min) - 20 $^{\circ}$ C/min - 300 $^{\circ}$ C (3min)

Target Ions: Promethazine; m/z 72, 248

Carbamazepine; m/z 193, 236, 165

ミルナシプランの分析

<前処理>

1. 血清 1ml に内部標準物質(IS)としてノルトリプチリン $1\mu\text{g}$ ($100\mu\text{g/ml}$ 溶液の $10\mu\text{l}$) を添加した後、ボルテックスミキサーで十分攪拌する。
2. 抽出用カラム(Oasis HLB 1cc/30mg)をメタノール 1 ml、純水 1ml でコンディショニングする。
3. 1. の試料を Oasis HLB カラムに適応する。
4. 5%メタノール水 1ml で Oasis HLB カラムを洗浄する。
5. メタノール水 1ml で溶出する。
6. 窒素気流下で蒸発乾固する。
7. 酢酸エチル $70\mu\text{l}$ と TFAA $70\mu\text{l}$ を添加する。
8. 誘導體化 (70°C 、20 分)する。
9. 冷却後、窒素気流下で蒸発乾固する。
10. 酢酸エチル $50\mu\text{l}$ で再溶解する。
11. $1\mu\text{l}$ を GC-MS の試料とする。

<分析条件>

ガスクロマトグラフィー質量分析計

Hewlett Packard 5890 Series II/5971 mass selective detector

Column: HP-5, 30m x 0.25mm id. x 0.25 μm thickness

Injector Temp.: 250°C

Oven Temp.: 100°C (3min) - $20^\circ\text{C}/\text{min}$ - 30°C (3min)

Target Ions: Milnaciprane; m/z 342, 216, 129

Nortriptyline; m/z 232, 219, 204

パラコートとジクワットの分析

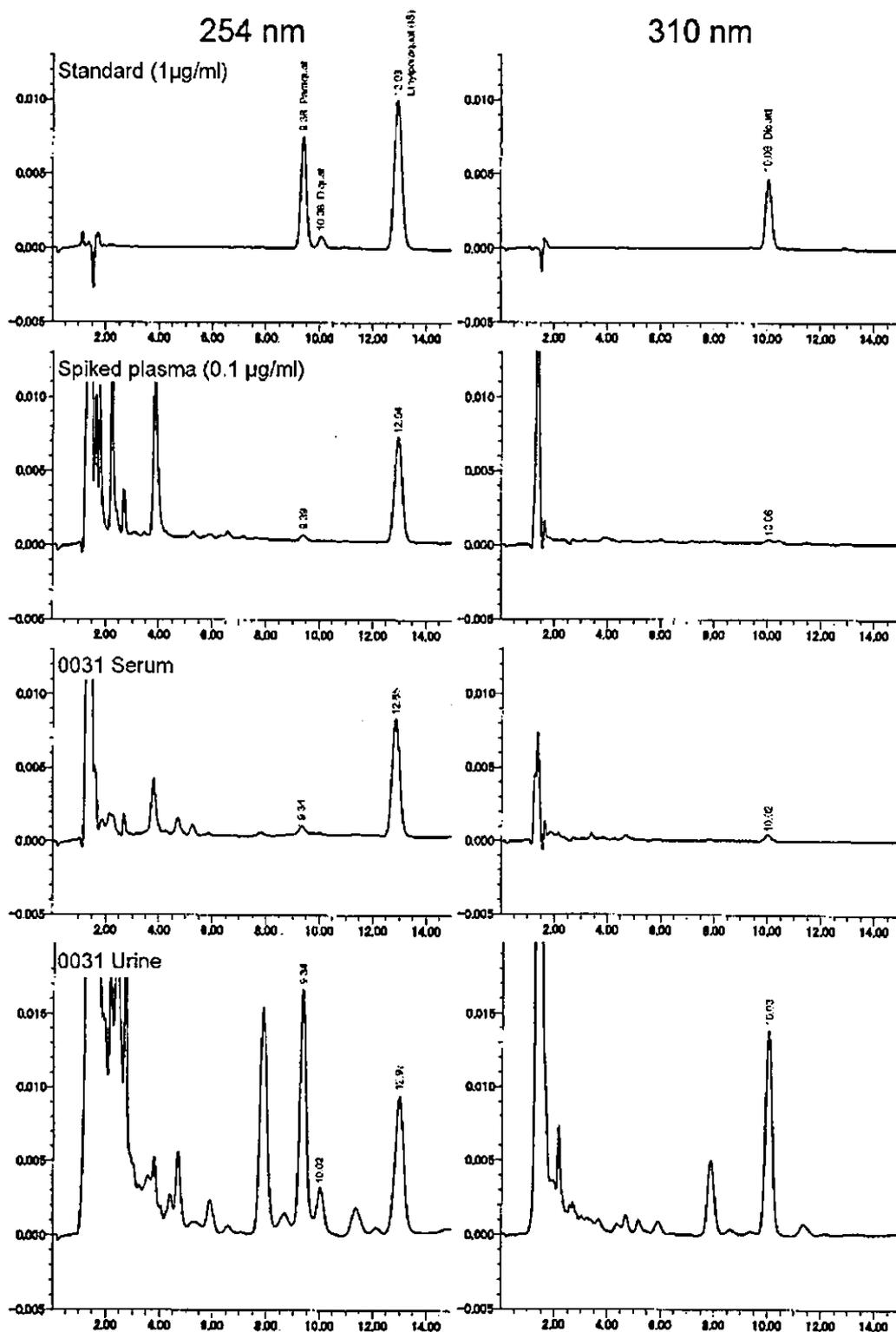
<前処理>

1. 試料 100 μ l に 100 μ g/ml エチルパラコート溶液 5 μ l を加える.
2. アセトニトリル 500 μ l を加え, ボルテックスミキサーで攪拌する.
3. (3) 12000-g で 5 分間遠心分離する.
4. 上清をマイクロチューブに取り, 遠心エバポレータで乾固する.
5. 残渣に水 100 μ l を加え攪拌後, 12000-g で 5 分間遠心分離する.
6. 上清 5 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する.

<分析条件>

装置 : Waters Alliance2690 セパレーションモジュール 流 速 : 0.3ml/min
検出器 : Waters 2487 デュアル UV/VIS 検出器 検出波長 : 254nm&310nm
カラム : XTerra MS C18 (2.1 x 150mm, 3.5 μ m, Waters) 温 度 : 60 $^{\circ}$ C
移動相 : アセトニトリル : 10mM オクタンスルホン酸ナトリウム, 10mM トリエチルアミン (pH
3.0 リン酸で調整) = 15 : 85

	Rt (min)
パラコート	9.38
ジクワット	10.06
エチルパラコート (IS)	12.93



パラコートとジクワットの定量分析のクロマトグラム

メソミルの分析

<前処理>

1. 試料 100 μ l に 10mg/ml ジメトエート-アセトニトリル溶液 10 μ l を加える.
2. アセトニトリル 100 μ l を加え, ボルテックスミキサーで攪拌する.
3. (3) 12000-g で 5 分間遠心分離する.
4. 上清 100 μ l に水 400 μ l を加え攪拌後, 12000-g で 5 分間遠心分離する.
5. 上清 20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する.

<分析条件>

ポンプ : Shimadzu LC-10A

流 速 : 1.0ml/min

検出器 : Shimadzu SPD-10A

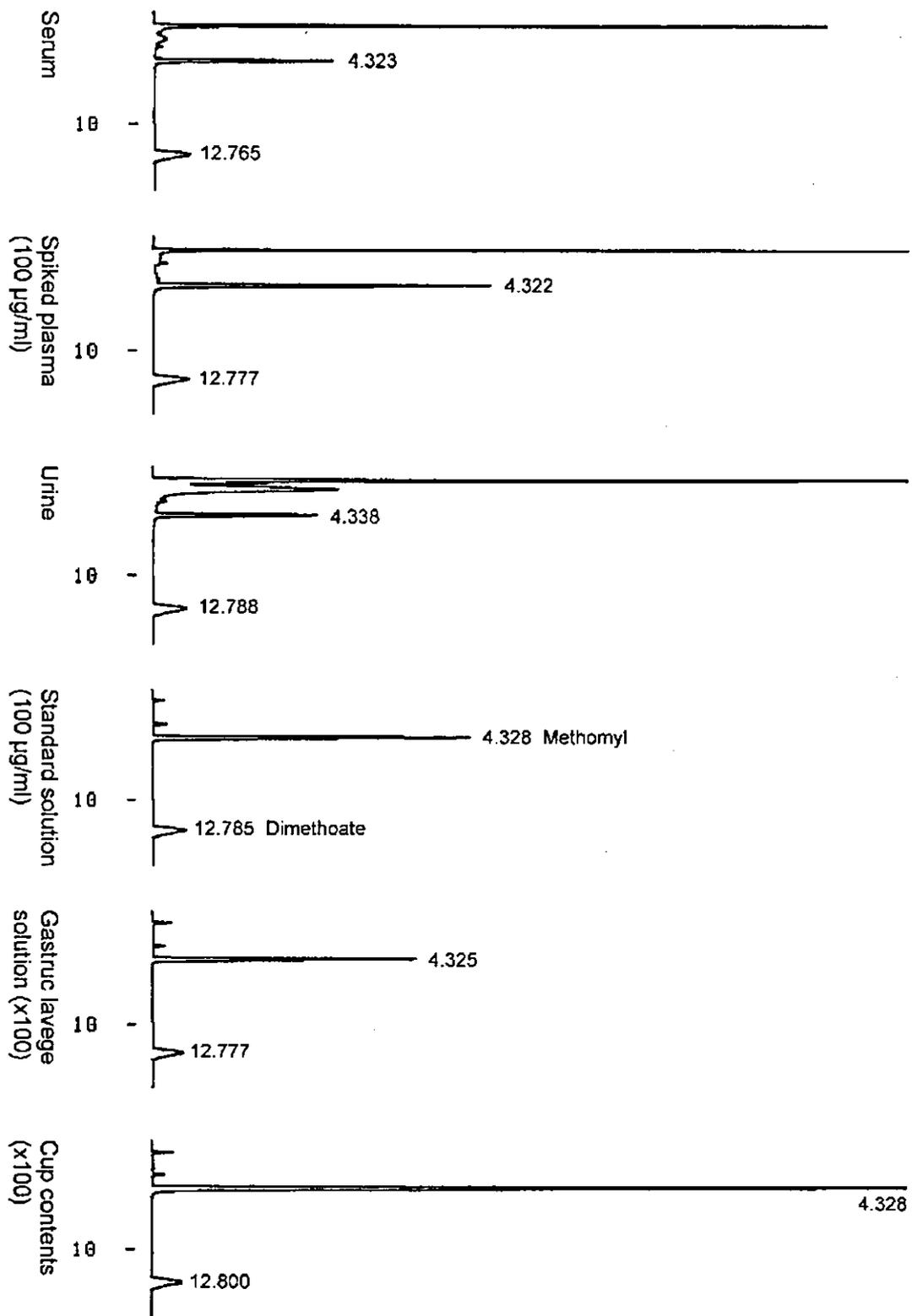
検出波長 : 235nm

カラム : Nova-Pak C18 (3.9 x 150mm, 4 μ m, Waters)

温 度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : アセトニトリル : 水 = 1 : 9

	Rt (min)
メソミル	4.33
ジメトエート (IS)	12.79



メソミルの定量分析のクロマトグラム