

第2回法医中毒研究会セミナー・資料

1. タイトル：「薬物抽出法の基本を学ぶ！」
2. 日時：平成25年10月4日（金曜日）午後1時から午後6時
3. 場所：島津製作所 京都三条本社 研修センター33号

〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

講師：除タンパク法 吉田 学 先生（関西医科大学 法医学講座）

液液抽出法 坪井 健人 先生（大阪医科大学 予防社会医学講座 法医学教室）

QuEChERS法 臼井 聖尊 先生（東北大学大学院医学系研究科 法医学分野）

固相抽出法 工藤 恵子 先生（九州大学大学院医学研究院 法医学分野）

スピнкаラム法 奈女良 昭 先生（広島大学大学院医歯薬保健学研究院法医学）

除タンパク法（アセトニトリルによる除タンパク法）

1.5 ml 容の PP チューブ^aに試料（尿、血漿など）0.5 ml を用意

↓

アセトニトリルを 0.5 ml 加えて^b、Vortex した後、10 分間遠心分離（12,000 g at 4℃）^cを行う

↓

上清^dを別のチューブに分取^eする

↓

HPLC で分析

① LC 用試料の調整

前記の上清を直接 LC に注入することも可能であるが、フィルター濾過^fした後、分析を行う。

②GC あるいは GC/MS 用試料の調整

蒸発乾固して適量の MeOH で溶解させて分析を行うことも可能であるが、薦められない。乾固に時間がかかる。

Tips

- 容器に指定はないが、遠心処理で破損しない強度のチューブを選択。
- 試料と等量のアセトニトリルを添加する（試料の量でアセトニトリルを適宜変更する）。
- 現有の遠心器で十分である。但し、タンパクが沈殿して透明な上清が得られることを確認する。
- 上清が透明でない場合、1) 遠心処理では落とせない固形物がある（LC 分析ではフィルター濾過が必要）。2) 除蛋白が十分でない可能性がある（適量のアセトニトリルを追加して遠心）。
- 固形物が混ざり混まないように注意する（変性したタンパクは沈殿するが、水面に浮遊物がある場合があるので注意）。
- 処理した徐蛋白試料を保存した場合は測定前に再度、遠心処理する。カラムの劣化防止に有効。

分析に関する注意点

- ・タンパク質をアセトニトリルで凝固させて取り除くが、大きな塊となった場合は薬物が塊中に取り込まれ、薬物の回収率が低下することが予想される。塊を作らないようにすばやく混合（混合後、速やかに Vortex した後、振とう器で 5 分間程度振とうするのが最良）。
- ・夾雑物が混入している可能性が高いのでカラムでの分離が十分でない場合がある。対象薬物のピークの形状（ショルダーの有無など）に注意して夾雑物の混入に留意する。再度、分析条件を変えて分析するのが最良。

考えられる長所と短所

長所

操作が簡単である。

特別な装置を必要としない

試料ロスが少ない

抽出の前処理として有用

短所

タンパク質を変性させて取除く処理であるので、夾雑物が多い。

質量分析計の場合、イオン源が汚れる

LC カラムの目詰まりが起こりやすい（プレフィルター、プレカラムの取付けを推奨）

薬物濃度が 1/2 になる

処理後の試料に水分が多いので GC や GC/MS に移行しにくい（乾固や濃縮が困難）

LC-MS を除いて質量分析計の試料としての汎用性が低いので未知試料には不適當

追加処理法（塩析による親水性有機溶媒の二相分離と抽出）

3 ml 容の PP チューブ（マルエム、PP-12）^a に試料（血液、血漿、尿、など）1.0 ml を用意

↓

アセトニトリルを 1.0 ml 加えて、Vortex した後^b、振とう器で 5 分間振とう

↓

5 分間遠心分離（12,000 g at 4°C）^c を行う

↓

上清を別のチューブに分取^dする →（追加処理：コレステロール除去法^k 補足処理参照）

↓

↓

0.4 g の NaCl^e を加えて振とう器で 5 分間振とう

↓

10 分間遠心分離（12,000 g at 4°C）を行う

↓

二相に分離^f

↓

上相（アセトニトリル相）を 2 本のマイクロチューブに分取する

↓

400 μl（GC、GC/MS 用）

↓

乾固（遠心濃縮機など）^g

↓

8 μl の MeOH で溶解^h

↓

GC、GC/MS 分析

残り（約 400 μl、HPLC 用）

↓

HPLC 分析^j

↓ (PDA-HPLC による同定が必要な場合に応じて実施)

HPLC 分析 (GC/MS 分析終了した残りを転用)ⁱ

↓

10 µl の MeOH を加えた後、10 µl の超純水を加える (脂肪などが析出するのでフィルター濾過)

① LC 用試料の調整

アセトニトリル相を直接 LC に注入することも可能であるが、フィルター濾過した後、分析を行う。分離能が悪い場合は純水などで 2 倍希釈する。

② GC あるいは GC/MS 用試料の調整

アセトニトリル相を 400 µl 分取して乾固。残渣に 8 µl MeOH を加えて溶解する。コレステロールや脂質類が含まれるのでエチゾラムやトリアゾラムなどは補足処理を推奨。

Tips

- 容器に指定はないが、遠心処理で破損しない強度のチューブを選択。
- 塊ができにくいように素早くする。
- 遠心器は g が得られる機種を推奨。g が得られる機種は迅速化につながる。
- 分取しないで NaCl を加えることも可能。但し、二相分離後に凝固塊が回収量などの妨げなることがある。
- 添加量を正確に秤量する必要はない。NaCl が溶け残るように過剰に加える。
- ベンゾジアゼピン系、三環系抗うつ剤、バルビツール酸系はアセトニトリル層 (上相) に移行する。下相 (水相) に残存する薬物もあるので保存して、適宜、分析に使用する。
- 胃内容など高濃度含有している場合は濃縮しないで分析が可能。乾固は窒素気流下などの方法でも良い。
- 溶媒によってピークの理論段数が悪くなる。改善法としてアセトンを使用。
- より正確な同定をする場合に PDA-HPLC などの機器分析用試料として使用 (希釈率が不正確であるので、定量には向いていない)。
- 試料注入量は移動相のアセトニトリル濃度が 35% 程度の場合、経験的に試料注入量が 5-10 µl でも問題ない。しかし現実的には分離能が低下するので適宜、超純水などで希釈する (基本は 2 倍希釈。超純水希釈によって白濁する場合は適宜、遠心処理などで除去)。保存は水分が混入していると分解する可能性があるため機器分析に必要量のみを希釈。保存試料はアセトニトリル溶媒で保存。
- モノスピンに薬物も吸着されるため、再現性が低下する。しかしコレステロールの保持時間付近に出る薬毒物の検出・同定に効果がある。また、抽出試料中の脂質などが低下するので標準品との保持時間のズレが改善される (実施法は下記の補足処理を参照)。

補足処理：コレステロール除去⁷⁾

GC-MS を用いたエチゾラム、トリアゾラムなどの定性に有効。但し、定量成分も除去されるので定量精度が低下する。

追加操作：アセトニトリルで徐蛋白した上清をモノスピン C18 (GL サイエンス) にアップライして得た濾液を試料としてプロトコールの 0.4 g の NaCl を添加する処理に進む。

モノスピンのコンディショニング条件：MeOH 0.2 ml と超純水 0.1 ml で順次、実施。遠心処理条件は 5,000 g × 2 分間に統一。

分析に関する注意点

- ・ 二相に分離させるためには NaCl を過剰に添加する必要がある。添加した NaCl が全部溶けた場合は適宜、追加する必要がある。
- ・ 対象薬物が判明している場合や成分が判明した場合は予備試験を実施する（標準品を用いてアセトニトリル相への移行を調べ、分析試料として上相と下相のいずれが適切かを調べる）。
- ・ NaCl とアセトニトリルを用いた NaCl-アセトニトリル抽出法は一例。塩と親水性有機溶媒の種類、組み合わせを考慮する必要がある。例）覚醒剤は NaCl と 2-PrOH が最適⁶⁾。
- ・ 全血でも抽出が可能である。しかし有機溶媒を加えることによってタンパク質の凝集が起り、その中に薬物が残存することが予想されるので注意が必要である。有機溶媒の回収量が減少する。

考えられる長所と短所

長所

操作が簡単である。

特別な装置を必要としない

GC や GC-MS の試料調整が容易（溶媒を除去して乾固が容易）

夾雑物の除去が可能（但し、完全ではない）

MonoSpin でコレステロールなどの夾雑物を除去することによって、GC-MS では分析が困難であるエチゾラムやトリアゾラムなどの分析が容易となった。また、保持時間のずれが改善される⁷⁾。

短所

HPLC の分析試料として抽出液の有機溶媒相を用いた場合、注入量は 5 μ l（上限 10 μ l）が限界である。必要に応じて抽出液を超純水液で希釈する必要がある。

その他のコメント

- 1) M. Yoshida et al. Subzero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 71, 1918-1921 (1999).
- 2) M. Yoshida et al. Extraction of thiamylal in serum using hydrophilic acetonitrile with subzero-temperature and salting-out methods. *Analytical Chemistry*, 75, 4672-4675 (2004).
- 3) 吉田 学, 他. メタンフェタミン GC/MS 分析における 2-プロパノール-NaCl（二相分離）抽出法の応用. *鑑識科学*, 8 別冊号, 78 (2003)
- 4) 吉田 学, 他. 新液-液抽出法の開発とその意義. *法中毒*, 19, 154-155 (2001)
- 5) 吉田 学, 他. アセトニトリル-NaCl 抽出法を用いたスミチオンの分析. *法中毒*, 20, 154-155 (2002)
- 6) 吉田 学, 他. 親水性有機溶媒と水相との二相分離条件の検討. *日本法科学技術学会*, 16 別冊号, 47 (2011)
- 7) 吉田 学, 他. モノスピンをを用いた夾雑物の除去の検討. *日本法科学技術学会*, 19 別冊号, 58 (2014)

QuEChERS 法による薬毒物の抽出(体液編)

試料 (血清, 血漿, 全血, 尿など) 0.5 ml

- i) 水 1.0 ml を加えて試料を希釈する.
- ii) 硫酸マグネシウム 0.4 g, 酢酸ナトリウム 0.1 g¹⁾, ステンレスビーズ²⁾ (5 mm ID) 1 個及び内標準 (Diazepam-d5³⁾ 50 ng/ml アセトニトリル溶液) 1ml を含んだプラスチックチューブ⁴⁾に, 希釈した試料を加える.
- iii) 30 秒間, 手で激しく振った後⁵⁾, 直ちに遠心分離⁶⁾する (3000g, 1 分間).

上清

- i) 上清 0.6 ml を下記の分散固相抽出 (dSPE)⁷⁾に添加する.
塩基性薬物: PSA 25 mg, C₁₈EC 25 mg, MgSO₄ 150 mg を含む dSPE 用いる.
酸性薬物: C₁₈EC 25 mg, MgSO₄ 150 mg を含む dSPE 用いる.
- ii) ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後, 遠心分離 (3300g, 1 分間).

上清

- i) 5-10 µl を LC-MS/MS に注入する⁸⁾.

LC-MS/MS

- 1) 各メーカーから調製されたものがバルクで市販されています. あらかじめ小分けしておきましょう.
- 2) タイテック社から購入可能です. SUS 304 300 個入り (型番: 0068220-000)
- 3) Cerilliant 社から購入可能です (100 µg/ml Methanol Cat No. D-902-1ML).
- 4) Thermo Scientific Nunc クライオチューブ 4.5 ml (型番: 337516) を使用しています. この製品にはパッキンはありませんので, 適切にキャップしないと試料が飛び散り悲劇です. 十分に気をつけましょう.
- 5) 意外と体力を消耗します. 体力に自信のない方あるいは多検体を処理したい方は, ビーズ破砕機があるととても便利. 当研究室では, タイテック社製 μ T-12 価格 ¥398,000 (容器ホルダー別売) を使用しています.
- 6) 遠心分離はスイング式のものがお勧めです. アンクル型でやってもよいのですが, 血液試料の場合, 中間層が斜めに形成されます (特に問題はありませんが... 気分的なものです).
- 7) 各メーカーから調製されたものが市販されています. 酸性薬物は PSA にトラップされるので, 酸性薬物を分析する場合, PSA を含まないものを選びましょう.
- 8) 精製後の溶媒はアセトニトリルです. LC での分離において, 極性の高い化合物 (代謝物など) はピーク形状が崩れる or スプリットする場合があります. この場合, 精製水で 2 倍程希釈するとピーク形状が回復することが多いです.

QuEChERS 法による薬毒物の抽出(肝臓編)

臓器 (肝臓) 0.5 g

- i) プラスチックチューブ (5 ml 容)¹⁾ に試料 0.5 g 入れる.
- ii) ステンレスビーズ (5 mm ID) 5 個及び水 1.0 ml を加えた後, 内標準 (Diazepam-d5 50 ng/ml アセトニトリル溶液) 1 ml を加えた後, QuEChERS 試薬 (硫酸マグネシウム 0.4 g, 酢酸ナトリウム 0.1 g) を加える.
- iii) ビーズ破砕機²⁾ で振とう後 (2500 rpm, 30 秒間), 直ちに遠心分離する (3000 g, 1 分間).

止 清

この後の操作は, 「QuEChERS 法による薬毒物の抽出 (体液編)」と同じです.

- 1) タイテック社から購入可能です. ワトソン社製 5 ml 容チューブ 2332-105
- 2) 手で振るのは無理です. ビーズ破砕機を購入してもらいましょう.

QuEChERS 法の長所と短所

長所: その名のとおり迅速, 簡単, 安価だと思います.

体液試料だけでなく臓器試料にも応用可能です.

全て使い捨てなので, コンタミの心配がありません.

短所: 高極性化合物のクリーンアップは難しいか?

抽出に失敗した場合, 目的化合物の回収が難しい.

あらかじめ Step1 の試薬を小分けするのが面倒です.

参考文献

1. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Leg Med* (Tokyo). 2012 Nov;14 (6):286-96.
2. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. *Forensic toxicology* in press

多機能型ポリマー固相による抽出法

1) 15 mL 容量の遠心管に試料（血液・尿等）1 mL を入れる

↓

2) 蒸留水 2 mL と 1M の酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）300 μL^{a} を添加後 Vortex mixer で攪拌、5 min 超音波にかけ 3,000 回転で 15 分間遠心する

↓

3) 上清をメタノール 1 mL、水 1 mL でコンディショニング^bを行った Focus カラム（3 mL, 20 mg）に導入

↓

4) 水 1 mL、10 %アセトニトリル溶液 1 mL でカラムを洗浄^c

↓

5) 0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）アセトニトリル溶液 0.75 mL と 0.2%濃アンモニアアセトニトリル溶液各 0.75 mL^d で薬物を溶出

↓

6) 溶出液は窒素気流下 60°Cで蒸発乾固^eする

① GC あるいは GC/MS 用試料の調製

前記の手順で得られた残さに酢酸エチルを 100 μL 加えて溶解し、1-2 μL を GC/MS に導入する。アセチル化を行うときは残さに無水酢酸、ピリジン^f各 50 μL を加え、60 °C30 分間加温、反応液は室温^gで蒸発乾固し、酢酸エチル 100 μL で溶解し 1-2 μL を GC/MS に導入する。

TMS 化は残査に MSTFA^h 50 μL を加えて 60°C30 分加温。反応液は室温に戻した後、n-ヘプタンⁱ50 μL を加えて 1 μL を GC/MS に導入する。

② LC あるいは LC/MS/MS 用試料の調製

前期の手順で得られた残さにメタノールを 200 μL 加えて溶解する。10,000 回転で 5 分遠心後、5 μL を LC/MS/MS に導入する。

Tips

- a. 酸性薬物を回収する目的で添加した。ただし酸性薬物の回収率は約 10%程度と低い。
 - b. コンディショニングの途中でカラムを乾燥させないように注意。自然落下でも良い。
 - c. ここで減圧を強くして完全に溶媒を流出
 - d. TFA 溶液とアンモニア溶液の両方で塩基性から酸性薬物まで溶出、アンモニア溶液は揮発しないよう完全密封で保管のこと。
 - e. 塩の形で覚せい剤を溶出するため、60℃で溶媒を留去しても大丈夫
 - f. シリル化グレード(和光純薬カタログ 531-06161)が良い。
 - g. 覚せい剤が揮発するため。加温する場合は溶媒留去後速やかに蒸発乾固を止めること。
 - h. N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) シグマアルドリッチ製 (394866 10 × 1ML) pH が 4 程度でカラムの劣化が BSTFA-1%TMCS より少ない。
 - i. MSTFA の粘調性が高くピーク割れを起こすため、n-ヘプタンで希釈。
-

分析試料に関する注意点

液体試料（全血、血清、血漿、胸腔内液、尿など）については、同様に処理できる。加水分解尿は尿 1mL に 1M の酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）を 100 μ L と β -グルクロニダーゼ（Helix pomatia Type HP-2 (SIGMA) 104,200 units/ml）を 50 μ L 加えたのち、37℃、2 時間加温、反応後蒸留水 1 mL を添加して攪拌、遠心分離する。固体組織（肝、筋など）0.5-1 g は、血液と同様、蒸留水 2 mL と 1M の酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）300 μ L を添加後ホモジナイザーでホモジナイズ、5 min 超音波にかけ遠心分離する。塊が入っている血液も同様に処理する。それぞれの上清を Focus カラムに付す。

考えられる長所と短所

長所

疎水性化合物から高極性化合物まで幅広い薬毒物の抽出が可能。酸性・塩基性薬物の抽出が可能だが、酸性薬物の回収率は 10%程度と低い。比較的綺麗な抽出液が得られる。

短所

固まった血液や、固体組織ではカラムが目詰まりすることがある。
薬物によって回収率に大きな差があり、農薬では一般に回収率が低い。

その他のコメント

本抽出法に関する参考文献: K. Kudo et al. Forensic Toxicol. 27: 21-31 (2009), Legal Med 14: 93-100 (2012), K. Nagamatsu et al. Forensic Toxicol 30: 11-18 (2012)

QuEChERS 抽出と脂質除去フィルター精製による簡易前処理法

1) 15 mL 容量の遠心管に試料（血液・尿等）0.5 mL を入れる

↓

2) 蒸留水 1 mL を添加^a、Vortex mixer で 5 秒攪拌する

↓

3) ステンレスビーズ 4 mm を 2 個、アセトニトリル 1.5 mL を添加 Vortex mixer で 10 秒攪拌^b

↓

4) QuEChERS AOAC パウダー 0.5 g^c 添加後、手で激しく数回振ったのち、Vortex mixer で 10 秒攪拌

↓

5) 3000 回転で 10 分遠心する

↓

6) 上層 1 mL を予め 1 mL のアセトニトリルで洗浄^dした Captiva ND Lipids (3 mL) カラムに通す^e

↓

7) 溶出液に 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) アセトニトリル溶液を 100 μ L 添加^f

↓

8) 窒素気流下 60°C で蒸発乾固する

① GC あるいは GC/MS 用試料の調製

前記の手順で得られた残さに 1-クロロブタン/イソプロパノール=3:1 を 100 μ L 加えて溶解し、1-2 μ L を GC/MS に導入する。アセチル化を行うときは残渣に無水酢酸、ピリジン^g 各 50 μ L を加え、60°C 30 分間加温、反応液は室温^hで蒸発乾固し、1-クロロブタン/イソプロパノール=3:1 100 μ L で溶解し、1-2 μ L を GC/MS に導入する。

TMS 化は残渣に MSTFAⁱ 50 μ L を加えて 60°C 30 分加温。反応液は室温に戻した後、n-ヘプタン^j 50 μ L を加えて 1 μ L を GC/MS に導入する。

② LC あるいは LC/MS/MS 用試料の調製

高感度の LC/MS/MS では Captiva カラムの溶出液をそのまま分析可能である。前期の手順で得られた残さにメタノールを 200 μ L 加えて溶解する。10,000 回転で 5 分遠心後、上清 5 μ L を LC/MS/MS に導入する。

Tips

- a. 法医学の試料は粘稠性が高いので希釈することで回収率が向上する。
 - b. アセトニトリルで先に除タンパクを行うことが重要。ただし、ここで遠心分離をせずに次のステップへ（遠心分離をすると回収率が低下）。
 - c. 硫酸マグネシウム、酢酸ナトリウム 4:1（アジレント 5982-5755）0.5 g を量り取る。
 - d. 妨害ピークを除去するため。Captiva ND Lipids カラム（アジレント A5300635）を 15 ml の遠沈管に乗せ、アセトニトリル 1 ml を加えて、1500 回転 5 分遠心分離することで洗浄
 - e. 洗浄液を廃棄して再び Captiva ND Lipids カラムを遠沈管に乗せ、上層 1 mL を Captiva ND Lipid に導入、1500 回転 5 分遠心分離する。
 - f. 覚せい剤およびニコチンの揮発を防止するため。
 - g. シリル化グレード（和光純薬カタログ 531-06161）が良い。
 - h. 覚せい剤が揮発するため。加温する場合は溶媒留去後速やかに蒸発乾固を止める。Z 型試験管立て、（アズワン 6-309-01,02,03）を用いると、溶媒留去の状態が確認しやすい。
 - i. N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) シグマアルドリッチ製（394866 10×1ML）pH が 4 程度でカラムの劣化が BSTFA-1%TMCS より少ない。
 - j. MSTFA の粘調性が高くピーク割れを起こすため、n-ヘプタンで希釈。
-

分析試料に関する注意点

液体試料（全血、血清、血漿、胸腔内液、尿など）については、同様に処理できる。加水分解尿は尿 0.5 mL に 1M の酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）を 50 μ L と β -グルクロニダーゼ（Helix pomatia Type HP-2 (SIGMA) 104,200 units/ml）を 25 μ L 加えたのち、37°C、2 時間加温したものを試料とし第 2 ステップへ。固体組織（肝、筋など）0.2 g は、2 ml 容量の自立型遠心管に入れ、蒸留水 1 mL、ステンレスビーズ 4 mm 2 個を加え、タイテック・ビーズクラッシャー μ T-01 で 4600 r/min で 1 分間振とう後 15 mL の遠沈管に移す。0.5 mL の蒸留水でチューブを洗浄して遠心管に移し、第 3 ステップへ。

考えられる長所と短所

長所

酸性から塩基性薬物まで幅広い薬毒物を 1 回の操作で抽出可能。操作は簡便である。抽出効率もいずれの薬物も 60-80% とほぼ同じであるため、スクリーニング時に回収率の補正なしに濃度の推定が可能である。

短所

LC/MS/MS では多くの試料で測定可能だが、GC/MS では腐敗した試料において微量の薬物の検出が難しい。精製度は固相カラムより劣る。

その他のコメント

本抽出法に関する参考文献: K. Kudo et al. Forensic Toxicol. 32:97-104 (2014).

QuEChERS 法による抽出部分は臼井らの報告 (Usui et al. Legal Med. 14: 286-296 (2012)) をもとに若干変更を加えた。

MonoSpin（固相カラム）による抽出法^a

1.5 mL 容のエッペンドルフチューブに試料（尿・血漿等）200 μL ^b を入れる。

↓

クエン酸緩衝液（0.1M, pH3）^c 400 μL を入れ、攪拌する。

↓

予め洗浄^d した MonoSpin C18-CX カラム（廃液用チューブ装着）にアプライし、2 分間遠心分離（5000 rpm）^e する。

↓

廃液用チューブに溜まった通過液を捨てる。

↓

カラム（廃液用チューブ装着）にクエン酸緩衝液（0.1M, pH3）300 μL を入れ、1 分間遠心分離（5000 rpm）する^f。

↓

カラムを回収用チューブに付け替えた後、酢酸エチル（2%アンモニア水含有）100 μL を入れて 2 分間遠心分離（5000 rpm）し、カラムに吸着した薬物を溶出^g する。

↓

回収用チューブに溜まった溶出液をバイアルビンに移し、機器分析に供する。

① GC あるいは GC/MS 用試料の調製

前記の手順で得られた溶液を濃縮することなく分析を行う。必要であれば、窒素気流下で濃縮乾固後に誘導体化を実施し、分析することも可能である。

② LC あるいは LC/MS/MS 用試料の調製

薬物溶出時には、酢酸エチルの代わりにメタノールやアセトニトリルを用いる。グラジエント条件での分析の場合、ピーク割れやテーリングするために適量の初期移動相で希釈し、分析を行う。

Tips

- a. 抽出原理や基本操作は、固相抽出法と同じである。粒子状充填剤とは構造が異なり、少ない容量で広い表面積が稼げることから、少量溶媒での溶出が可能となる。
 - b. 使用する分析機器の検出感度や要求される検出下限、定量下限を考慮して加減できる。
 - c. 分析対象薬物によっては至適 pH が異なることがあるため、最適条件を求めたい場合には詳細に pH を検討した方がよい。ただし、対象薬物全ての回収率を 100%にすることは困難であることが多いため、再現性のある条件での抽出で十分である。
 - d. カラムに廃液用チューブを付けた後、メタノールおよびクエン酸緩衝液 (0.1M, pH3) 500 μ L ずつで 30 秒間遠心分離 (5000 rpm) する。製造時に混入した汚れを除去するとともに吸着に必要な有効表面積を広げることができる。
 - e. 実際には数十秒間の遠心で試料は通過していると考えられる。
 - f. モノリスシリカは、粒子状シリカに比べて吸着が弱い傾向にあるため、洗浄時にロスしないように洗浄溶媒中の有機溶剤含量に注意する。
 - g. 最初に酢酸エチル、次に 2%アンモニア水含有酢酸エチルで溶出することで、酸性・中性薬物と塩基性薬物を分離して溶出させることも可能である。
 - h. カラム上でのアミン化合物のアルコキシカルボニル誘導体化や溶出後のシリル誘導体化も可能であり、目的に応じた方法を選択できる。
-

分析試料に関する注意点

- 尿と同様の操作で、血清・血漿も処理可能である。
- 懸濁および酵素加水分解した試料では、抽出する前に遠心分離やフィルター処理することが望ましい。
- 市販品を用いて血液試料を処理することは困難である (目詰まりすることが多い)。

考えられる長所と短所

長所

- 溶出液の濃縮が不要であるため、操作に必要な時間は短い。
- 特殊な技能や知識は不要で、個々人の操作誤差が少ない。
- 一度に多数の検体が処理できる。

短所

- 比較的新しい製品であるため、アプリケーションが少ない。
- 試料によっては通過しにくい、あるいは目詰まりすることがある。
- アプライできる容量に制限がある (市販品では 1mL)。

その他のコメント

0.1M クエン酸緩衝液：クエン酸水和物 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、分子量：210.14) 1.75g とクエン酸ナトリウム (クエン酸三ナトリウム・二水和物、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、分子量：294.10)

0.48g を水に溶解し、全量を 100mL とする。

2%アンモニア水含有酢酸エチル：酢酸エチル 9.8mL にアンモニア水 0.2mL を加え、攪拌する。