

高速液体クロマトグラフィーによる 血清中抗テンカン薬の定量

宇田川美佐子 前田隆子* 古徳 迪**

Misako UDAGAWA, Takako MAEDA and Susumu KOTOKU

Simultaneous Measurement of Four Anticonvulsant Drugs in Serum by High-Performance Liquid Chromatography

血中薬物濃度の簡便、迅速な測定は、臨床側の強い要望と分析機器の急速な発達とが相まって近年その報告は多い。特に抗テンカン薬については種々の方法が検討されている。gas chromatography (GC) による方法^{1~5)}は比較的早くから報告されているが、この場合は目的物の揮発性を高めるために種々の化学修飾が前処理として必要である点が煩雑である。次いで酵素 immunoassay が開発^{6~8)}されたが、一般に高価につき、また他剤の影響が問題となることもあり、未だ一般化は遠いように思われる。これらに比して high performance liquid chromatography (HPLC) は各薬剤に対する化学修飾も不要であるし、試料量も GC に比して多量の注入が可能であり、最近急速に広まった方法である。われわれは HPLC による種々の方法^{9~14)}について抽出、検出、定量などの面から検討し、さらにカラムの消耗度、方法の難易度も考慮してわれわれの装置に最も適していると思われる測定法を考案し、またこれを実際の薬物服用患者の血清にも応用し得たのでその成績もあわせて報告する。

実験方法

分析機器・条件・方法は次の通りである。
装置：日立高速液体クロマトグラフ 635 型
カラム：4 mm×150mm
充てん剤：日立 3053 (5 μ)、逆相系

検出器：日立 683—41 波長可変式 UV モニター
記録計：日立 056 レコーダー
測定条件：溶離液は種々検討したが後記のようにアセトニトリル：水=25：75の混液を超音波洗浄器で脱気したものを使用し、流量は 1.0 ml/min, 検出器の波長は 210nm, 感度は 0.16~0.64 AUFS, カラムの温度は室温, チャートスピードは 5 mm/min とした。
抗テンカン薬：定量用としてはフェノバルビタール、プリミドン、フェニトイン、カルバマゼピンの4種を用い、定性用としてはこれらの他にニトラゼパムとエトサクシミドを使用した。
薬物の抽出：10ml の共栓付試験管に血清 0.5 ml を採取し、これに生理食塩水 0.5ml と濃塩酸 0.02ml を加え混和した後、ヘキサバルビタール (内部標準) のクロロホルム溶液 (3.5 mg/l) 3.0 ml を加え振盪器で5分間振盪する。これを 3,000 rpm, 5分間遠心分離した後、上清を吸引除去し、クロロホルム層 2.0 ml を先端の尖った試験管に移し、ドライブロック (100°C) で蒸発乾固する。残渣をメタノール 50 μ l に完全に溶解し、その 10 μ l を HPLC に注入する。
内部標準：前記のようにヘキサバルビタールを用いたがこれはメチルヘキサバルビタールナトリウム (ヘキサバルビタールナトリウム) を塩酸酸性からクロロホルムで抽出、蒸発乾固したものを用いた。定量は内部標準に対する各薬物の peak 高比によって行った。

実験成績

1. 溶離液：逆相系カラムを使用する場合の溶離液にはアセトニトリルと水またはリン酸緩衝液が多用されているところから^{10,12,13)} われわれはまずアセトニトリルと水との混合比と分離能について検討した。結果は図1に示すようにアセトニトリル：水=25：75 (V：V) の場合が最も良好な分離を示すことがわかった。なお、同じ抗テンカン薬であるニトラゼパム、エトサクシミドについては、ニトラゼパムはカルバマゼピンよりも保持時間が長く、エトサクシミドはプリミドンよりも早く流出し、プリミドンと一部重複するが、有効血中濃度範囲内ではそれぞれの薬物に全く影響が認められなかった。

2. 流量：0.7ml/min, 1.0ml/min, 1.5ml/min, 2.0ml/min の各々について流量とクロマトグラムとの関係を調べたが、いずれも良好な分離を示した。そこで圧力が 100kg/cm² 以下と比較的低く、しかもピークがシャープである 1.0ml/min を用いることにした。

3. 検量線：プリミドン、フェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピンの各薬物の検量線を作製するため、あらかじめ薬物を含まないことを確認した正常血清に各薬物を 5 μg, 10 μg, 15 μg, 20 μg, 30 μg/ml の濃度に添加し、前述の操作方法に従って分析を

行った。その結果図2に示すように良好な直線性が得られた。この場合感度を 0.32 と 0.64 AUFS の両方で測定したが、その検量線は全く一致した。

4. 回収率：正常血清に各薬物を 10 μg/ml の割合に添加し、その回収率を二重試験で検討した結果、血清ではプリミドン 58.1%, フェノバルビタール 87.0%, フェニトイン 91.7%, カルバマゼピン 95.3% であった。

5. 再現性：正常血清に各薬物を 1 μg/ml, 15 μg/ml の割合で添加し、それぞれ 10 回の同時再現性を検討した結果、表1に示すように各濃度における変動係数 (CV) は 3.28~5.86% であった。

6. 臨床への応用：鳥取大学医学部附属病院の脳神経内科、産科などで、抗テンカン薬の投与を受けている患者7例につき、血清中の抗テンカン薬を服用後3~5時間で採血したものについて測定した。表2に対象患者の年齢、体重と服用薬物を示した。図3、図4はこれら患者血清3例のクロマトグラムを示す。図3の (A) は No. 2 の患者の場合で、服用量はプリミドン 750 mg/day, フェノバルビタール 90 mg/day, カルバマゼピン 600 mg/day である。(B) は No. 4 の患者のものでフェノバルビタール 120 mg/day, フェニトイン 200 mg/day を服用している。図4の (A) は No. 5 の患者のクロマトグラムである。この場合フェノバ

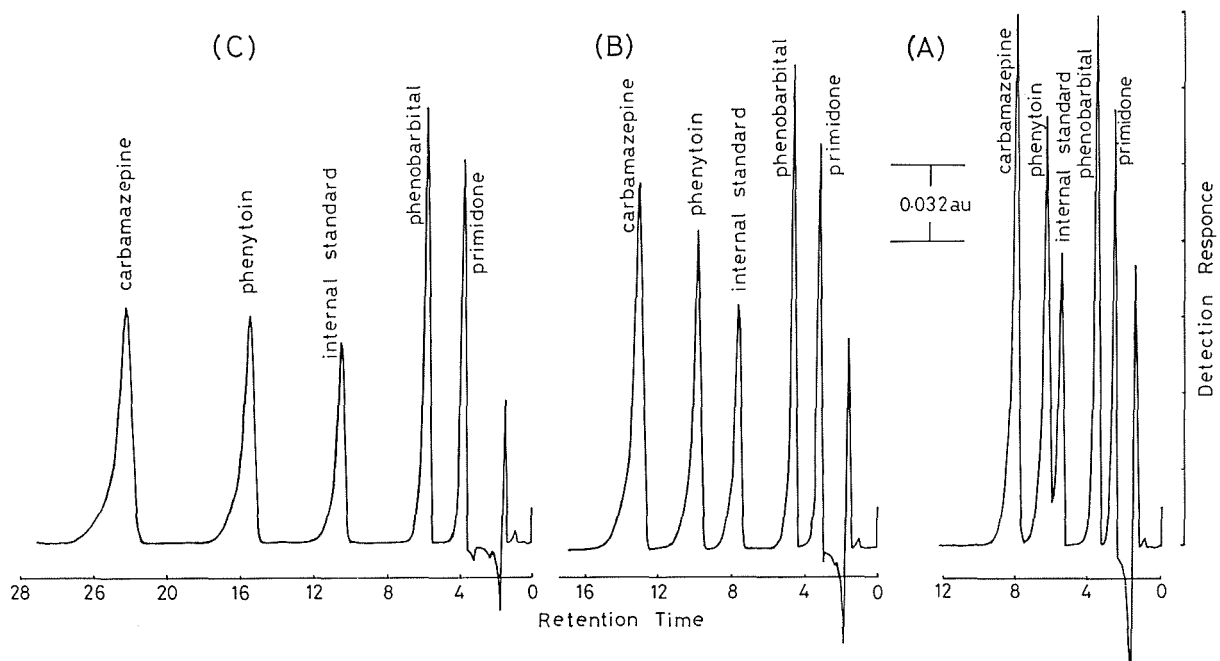


図1 抗テンカン薬の分離パターンへ及ぼすアセトニトリル濃度の影響。
アセトニトリル：水=(A) 20：80, (B) 25：75, (C) 30：70, 各薬物濃度は 0.2mg/ml である。

STANDARD CURVES IN SERUM

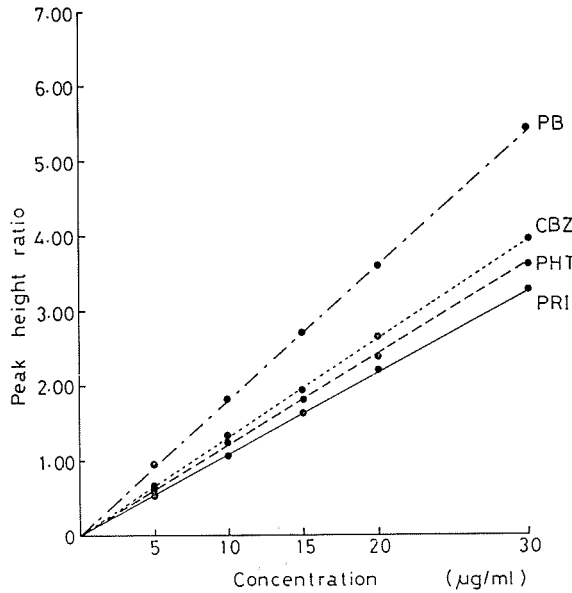


図2 血清中の抗テンカン薬の検量線
PB：フェノバルビタール，CBZ：カルバマゼピン，PHT：フェニトイン，PRI：プリミドン

表1 人血清に薬物を混合した場合の再現性 (CV%)

試料	薬物	PRI	PB	DHT	CBZ
血清 (15µg/ml)		4.65	3.78	3.28	3.92
血清 (1µg/ml)		5.86	4.17	3.55	3.98

(n=10)

表2 各患者の服用薬物および量 (mg/day)

No.	年齢	体重	服用薬物・量
1	(才) 36	(kg) 70	PB (90), CBZ(600)
2	30	55	PRI (750), PB (90), CBZ (600)
3	25	50	PRI (750)
4	31	55	PB (120), PHT (200)
5	24	58	PRI (500), PHT (200)
6	30	75.5	PB (80)
7	34	58	PB (90), PHT (200)

表3 患者血清中の各薬物濃度 (µg/ml)

薬物 No.	PRI	PB	PHT	CBZ
1		16.8		4.0
2	5.0	27.0		2.0
3	11.5	20.8		
4		15.5	2.3	
5	2.5	11.5	1.5	
6		7.4		
7		11.7	3.5	

ルビタールは全く服用していないが、プリミドン 500 mg/day を服用しているためその代謝物であるフェノバルビタールが検出されたと考えられる例である。このような現象はNo. 3の患者にも見られる。(B)は基礎的実験に用いた血清のクロマトグラムであり、内部標準のヘキサバルビタールのみのピークが見られる。表3に対象患者の測定結果を示す。

考 察

血中薬物を定量する場合なるべく簡便、迅速であることが要求され、分析者もこの線に沿ってそれぞれの方法を考案している。薬物定量の場合、普通最も時間が必要なところは抽出の段階である。そこで Soldin ら¹³⁾のように血清にアセトニトリルを加えて振盪、遠沈してその上清を注入する方法などなるべく簡単な方法も取られている。しかしこのような方法では目的物以外の物質の影響を受けやすい。また前記 Soldin ら¹³⁾はその方法で1,200回以上の分析に耐えると述べているが、どうしてもカラムの寿命を短くすることは否定できない。また Adams ら¹²⁾は活性炭に目的物を吸着させる方法を取り、Kitazawa ら¹⁴⁾は被抽出液のpH を変える二段階抽出法を報告しているがこれらは簡便さにおいて問題が残る。

そこでわれわれは血清を食塩水で希釈した上で塩酸性下で、内部標準を含むクロロホルムで抽出するという比較的簡便な方法を取った。内部標準にはフェナセチンを使用する報告もあるが、この場合pH が中性付近では2峯性をなることがあり、またこの薬物が解熱剤として繁用されることから、われわれはこれを見てヘキサバルビタールを使用した。

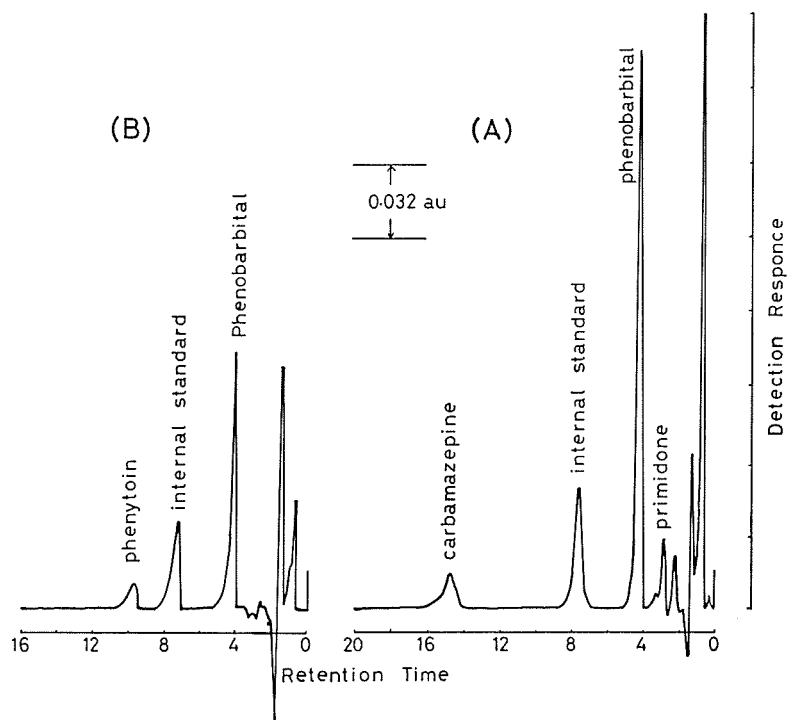


図3 患者血清より抽出した抗テンカン薬のクロマトグラム。
(A) 患者 (No. 2) (B) 患者 (No. 4)

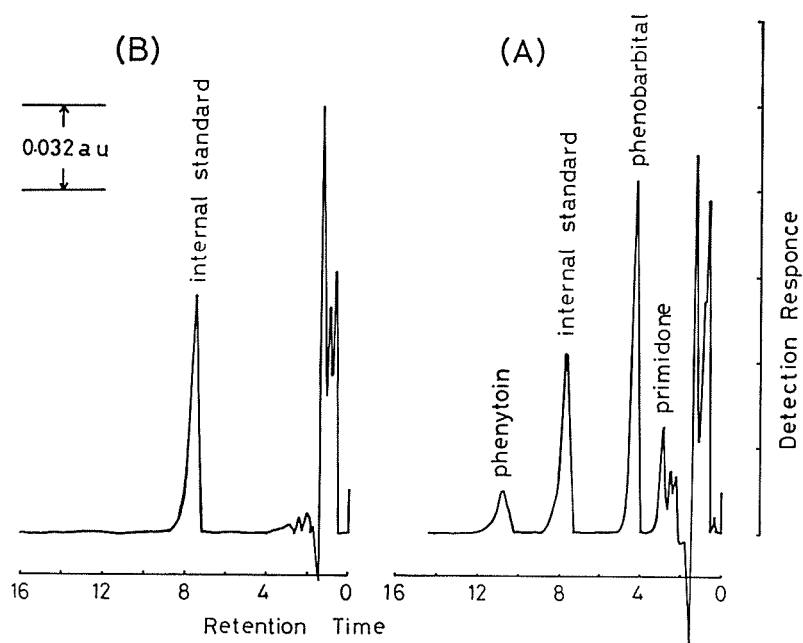


図4 患者血清と健康人血清中の抗テンカン薬のクロマトグラム
(A) 患者 (No. 5) (B) 血清ブランク

Kabra¹⁰も述べているように、溶離液のアセトニトリル濃度が濃くなるに従って各薬物の保持時間は短く、またピークはシャープとなるので(図1)、最も適当な分離度を示す混合比を検討して前記のようにアセトニトリル：水=25：75 (V：V) の比を得た。

またカラムを加温する報告もあるが^{10,12}われわれの場合は分離には特に問題を認めなかったのでカラムの加温は行わなかった。

以上のわれわれの方法に従って正常血清に各薬物を一定量添加したものを分析したところ、検量線、再現性など一応満足すべき結果を得た。また検出限界は各薬物により多少異なるが、ほぼ数 ng であった。回収率はプリミドンを除いた他の3種についてはかなり高い値を得た。プリミドンのみは58.1%とかなり低い値であったが、再現性においては特に問題はなかったのでこの方法で充分であろうと思われる。

この方法を実際に抗テンカン薬を服用している患者の血清に応用したところ表3に示すような成績を得た。

前にも述べたようにフェノバルビタールを服用していないのにプリミドンを服用しているためこれが体内で代謝されてフェノバルビタールを生じたと考えられる例が全7例中2例認められた。

われわれが用いたカラムは自家充填したものであり、カラム間の再現性は必ずしも良好とはいえなかった。従って新たに充填する度に検量線を作製しなければならないという煩雑さはあった。

なおこの方法では一つの検討について費す時間は前処理に約17分、液体クロマトグラフに対して約16分であった。

結 語

日立高速液体クロマトグラフィーによる血清中の抗テンカン薬の測定法の一つを考察して実際の患者の臨床例について応用した。その結果、本法は日常検査法として十分に使用できるほどの簡便、迅速性、正確性を有するものであると考える。

本研究に際し鳥取大学医学部附属病院脳神経内科並びに産科の御協力を得た。ここに記して深く感謝する。

なお本論文の要旨は第29回日本臨床病理学会総会において発表した。

文 献

- 1) Pippenger, C.E. and Gillen, H.W. : Gas chromatographic analysis for anticonvulsant drugs in biologic fluids. *Clin. Chem.* **15**, 582—590, 1969.
- 2) Solow, E.B., Metaxas, J.M. and Summers, T.R. : Antiepileptic drugs : A current assessment of simultaneous determination of multiple drug therapy by gas liquid chromatography—on column methylation. *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 256—260, 1974.
- 3) Nishina, T., Okoshi, K. and Kitamura, M. : Improved method for measurement of serum levels of phenobarbital, carbamazepine, primidon and diphenylhydantoin by gas-liquid chromatography. *Clin. Chem. Acta.* **73**, 463—468, 1976.
- 4) Least, C.J. Jr, Johnson, G.F. and Solomon, H. M. : Micro-scale anticonvulsant assay with use of nitrogen/phosphorous detector and on-column methylation compared with a macro-scale procedure involving flame-ionization detection. *Clin. Chem.* **23**, 593—595, 1977.
- 5) Godolphin, W. and Thoma, J. : Quantitation of anticonvulsant drugs in serum by gas chromatography on the stationary phase SP-2510. *Clin. Chem.* **24**, 483—485, 1978.
- 6) Turri, J.J. : Enzyme immunoassay of phenobarbital, phenytoin and primidone with the ABA 100 biochromatic analyzer. *Clin. Chem.* **23**, 1510—1512, 1977.
- 7) Legaz, M. and Raisys, V. A. : Correlation of the EMIT antiepileptic drug assay with a gas liquid chromatographic method. *Clin. Biochem.* **9**, 35—38, 1976.
- 8) Sun L. and Szafir, L. : Comparison of enzyme-immunoassay and gas chromatography for determination of carbamazepine and ethosuximide in human serum. *Clin. Chem.* **23**, 1753—1756, 1977.
- 9) Kabra, P. M., Gottelli, G., Stanfill, R. and Marton, L.J. : Simultaneous measurement of phenobarbital, diphenylhydantoin

- and primidone in blood by high-pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.* **22**, 824—827, 1976.
- 10) Kabra, P.M., Stafford, B.E. and Marton, L.J. : Simultaneous measurement of phenobarbital, phenytoin, primidone, ethosuximide and carbamazepine in serum by high-pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.* **23**, 1284—1288, 1977.
- 11) Adams, R.F. : The determination of anticonvulsants in biological samples by use of high-pressure liquid chromatography. *Adv. Chromatogr.* **15**, 131—168, 1977.
- 12) Adams, R.F., and Vandemark, F.L., : Simultaneous high-pressure liquid chromatographic determination of some anticonvulsants in serum. *Clin. Chem.* **22**, 25—31, 1976.
- 13) Soldin, S.J. and Hill, J.G. : Rapid micro-method for measuring anticonvulsant drugs in serum by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* **22**, 856—859, 1976.
- 14) Kitazawa, S. and Komuro, T. : High-speed liquid chromatographic determination of antiepileptic drugs in human Plasma. *Clin. Chem. Acta*, **73**, 31—38, 1976.

SUMMARY

A new procedure for simultaneous determination of four anticonvulsants (primidone, phenobarbital, phenytoin and carbamazepine) in serum by high-performance liquid chromatography was presented.

The serum proteins were precipitated with a conc hydrochloric acid solution and chloroform containing hexobarbital as an internal standard. The drugs were eluted from a reversed phase column with a mobile phase consisting of an acetonitrile/water (25/75) at flow rate 1.0 ml/min, and the eluted drugs were detected by their absorption at 210nm, and quantitated by measuring peak heights. Analytical recoveries for the three drugs (phenobarbital, phenytoin and carbamazepine) varied from 87% to 95.3% but primidone showed 58.1%. The coefficients of variation were between 3.28% to 4.65% and 3.55% to 5.86% for 15 μ g/ml of serum and 1 μ g/ml of serum.

This procedure was applied to the determination of drug levels in serum of seven patients. The administered drugs and the dose are shown in Tab. 2 and each drug level in serum presented in Tab. 3.

(受付 1982. 12. 16)