

高速液体クロマトグラフィーによる

抗てんかん薬の血中濃度測定方法の検討

石井 庄子¹⁾・小関 成子¹⁾・中村 博¹⁾
飯吉 稔²⁾・奈良井 澄雄¹⁾・緒方 秀夫¹⁾

はじめに

抗てんかん薬のフェニトイン (DPH) やフェノバルビタール (PB) は、血中の治療有効濃度の範囲が狭いこと、有効濃度が中毒量に接近していること、更に、患者個々の薬物体内動態に大きな個体差が認められることなどから、ドラッグモニタリングの重要性が確認されている。現在、短時間で簡単に血中濃度を測定する方法として、酵素免疫法を利用したEMIT法、MARKIT法が普及しているが、いずれも単一薬剤のみの測定であり、抗てんかん薬のように、多剤併用の患者が多い場合には、一つ一つの薬剤について測定を行なう必要があり、試薬の費用が高くなる。また、活性代謝物の定量が現時点では不可能なことなどから、汎用性があり、前処理もガスクロに比べ簡単な高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が注目されている。

HPLCは、ガスクロに比べて複雑な試料の誘導体化の必要がなく、酵素免疫法に比べて成分を分離し定量することから、同時に数種類の薬物や代謝産物の測定まで可能となる利点がある。

今回我々は、HPLCを用いて、抗てんかん薬のうち当院でよく処方されているPB, DPH, カルバマゼピン (CBZ) について、その血清中濃度を、短時間に簡単に精度よく同時定量する為の測定方法について検討した。

実験方法

1. 試薬

¹⁾長岡中央総合病院薬剤科 ²⁾三条総合病院薬剤科

フェノバルビタール (三共製薬), フェニトイン (大日本製薬), カルバマゼピン (チバガイギー), フェナセチン (日興製薬) は、それぞれメーカーより供与された物をそのまま使用した。

アセトニトリル, メタノールは、高速液体クロマトグラフィー用の試薬 (和光純薬) を使用した。その他の試薬は、全て特級品を使用した。

てんかん患者には、薬剤としてアレビアチン散 (大日本製薬), フェノバル 10 倍散 (三共製薬), テグレート (チバガイギー) を投与した。

コントロール血清には、EMIT用のコントロール血清を使用した。

2. 血清試料の前処理

血清中に含まれるタンパクなどを除去し、抗てんかん薬を抽出する為、図1に示すような前処

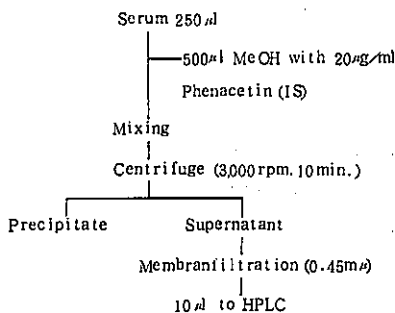


図1 Deproteinization

理を行なった。除タンパク、抽出の為に加えるメタノールには、内部標準物質 (IS) として、フェナセチンを $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた。遠心分離後、上清を $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾

過し、その10 μ lをHPLCに注入した。

3. 検量線の作成

PB, DPH, CBZを各々2.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g/ml含有した標準物混合物のメタノール溶液を調整し、これらの標準液を用いて検量線を作成した。これらのメタノール溶液は、4 $^{\circ}$ Cで数ヶ月は安定である。

4. HPLC条件

装置には、日本分光BIP-Iに日本分光UV IDEC-100 可変波長検出器を接続し、記録計には、Chromatocorder 11を使用した。

測定条件は、カラムには Finepak SILC 18を用い、溶離液には、アセトニトリル/0.005Mリン酸第一カリウム水溶液 (pH 3.8) (30/70) を使用した。流量は1 ml/min, 波長 215 nm, カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 試料注入量は10 μ lとした (図2)。

Column : 4.6 mmID X 150mm column packed with Finepak SIL C ₁₈
Mobile phase : CH ₃ CN : 0.005M phosphate buffer (pH3.8~pH4.0) (3 : 7 V/V)
Flow rate : 1 ml/min.
Detector : UV
Wave length : 215nm
Column temperature : 40 $^{\circ}$ C
Sample size : 10 μ l

図2 Operating condition of HPLC

なお、0.005 Mリン酸第一カリウム水溶液は、メンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過した後、100 $^{\circ}$ C, 1時間で滅菌し、長期保存に耐えるようにした。滅菌後、pHは約0.1上昇するので、滅菌前のpHは3.7に調整している。

5. 臨床分析

PB, DPH, CBZを服用しているてんかん患者の血液から、常法通り血清を分離し、前述の方法に従って検量線から、薬剤の血中濃度を測定した。

結果と考察

1. HPLC測定条件

血清成分のピークが、抗てんかん薬やフェナセチンのピークを妨害しない溶解液の、pH条件を検討した。pH3.7~pH4.0の範囲では、ピークが重ならず、分離は良好であった (図3)。

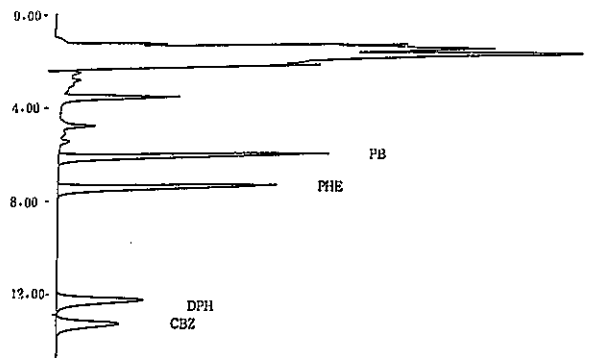


図 3

2. 検量線

標準試料を、各々2.5 μ g/ml~30 μ g/ml含有するメタノール溶液について、試料濃度に対するピーク面積から、絶対検量線法により検量線を求めた。図4に示すようにいずれも原点を通る良好な直線が得られた。

3. 定量精度

PB (30 μ g/ml), DPH (15 μ g/ml), CBZ (6 μ g/ml) を含むEMIT用コントロール血清を用いて、HPLCによる測定値の再現性、並びに回収率を検討した。

日内変動, 日差変動の変動係数は、それぞれ1.4%, 2.4%以下の良好な再現性を示した (表1)。また保持時間, ピーク面積の変動係数も、それぞれ0.2%以下, 1.4%以下と良好であった (表2)。同血清に対する前記の前処理による回収率は、98~102%であり、変動係数も1.8%以下であり、抗てんかん薬の定量に対して満足する値を得た (表3)。

4. 臨床分析

Peak area
μV-sec. X 10⁴

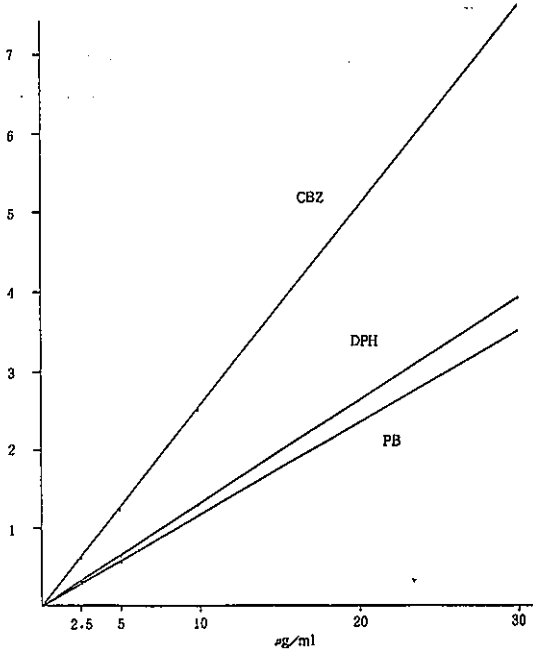


図4 Absolute calibration curves of anticonvulsant drugs

drug	concn. μg/ml	recovery % ± SD	CV, %
PB	30	98.5 ± 1.32	1.34
DPH	15	99.5 ± 0.89	0.89
CBZ	6	101.1 ± 1.74	1.72

表2 Recovery of anticonvulsants added to serum (n=5)

drug	retention time (min.)	peak area μV		CV, %	
	SD	CV, %	±SD	±SD	
PB	5.86 ± 0.01	0.13	333039.8	4525.28	1.36
DPH	11.32 ± 0.02	0.18	190634.1	1733.92	0.91
CBZ	12.24 ± 0.02	0.17	150554.1	1896.39	1.26

表3 Precision of assays for retention time and peak area

	drug	range, μg/ml (±SD)	CV, %	n
with in day	PB	29.54 ± 0.40	1.35	5
	DPH	14.93 ± 0.14	0.91	5
	CBZ	6.04 ± 0.08	1.32	5
day to day	PB	29.13 ± 0.69	2.37	5
	DPH	14.97 ± 0.24	1.61	5
	CBZ	6.00 ± 0.07	1.19	5

(PB: 30 μg/ml DPH: 15 μg/ml CBZ: 6 μg/ml)

表1 Precision of assays for anticonvulsants in serum (n=5)

検量線が原点を通る直線であること、コントロール血清からの抗てんかん薬の回収率がほぼ100%であることから、日常行なうてんかん患者の血中濃度測定には、測定の度、抗てんかん薬を各々20 μg/ml 含有する標準試料のメタノール溶液を用いた一点検量線法で測定している。図5は、アレピアチン散とフェノパール10倍散を服用している

患者のクロマトグラムで、分離終了後得られたクロマトグラムより、自動的に必要なピークの保持時間、ピーク面積を求め、濃度が算出されて出てくる。

図6は、アレピアチン散とフェノパール10倍

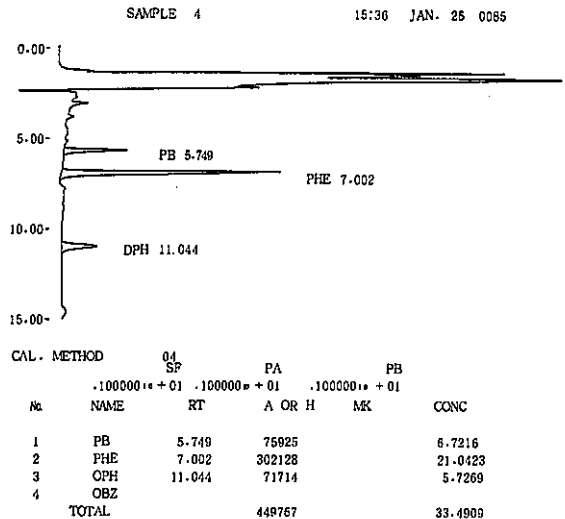


図5 HPLC of a patient with epilepsy

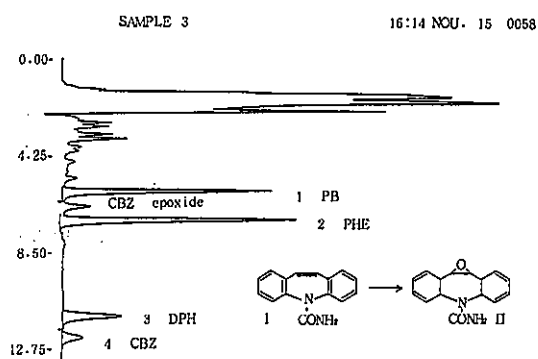


図6 HPLC of a patient with epilepsy

散，そしてテグレトールを服用している患者のクロマトグラムである。HPLCは代謝物も測定することが可能で，それによって患者個々の薬物体内動態の情報を得ることができる。CBZについては，代謝物の10, 11-エポキシドも薬理活性を持つことから，その濃度測定は重要と思われる。

参 考 文 献

- 1) 田村善蔵：薬物血中濃度測定の実際，薬業時報社.
- 2) 投与薬物の生体液中濃度測定へのHPLCの応用，日本分光.