

研究

高速液体クロマトグラフィーによる

テオフィリンの血中濃度測定方法の検討

中村 博<sup>1)</sup> 藤宮弘美<sup>1)</sup> 飯高真沙子<sup>1)</sup>  
飯吉 稔<sup>2)</sup> 緒方秀夫<sup>1)</sup>

はじめに

テオフィリン (TP) は、急性慢性の気管支喘息などの治療に広く用いられている、キサンチン系薬剤である。しかし、有効血中濃度の範囲が10~20 μg/mlと狭く、中毒量20 μg/ml以上と接近していることから、有効で安全な治療を行うには、血中濃度を測定し投与量の調節を行うことが大切である。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法などが普及しているが、これらは測定が単一薬剤に限られること、又、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、前処理の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。

我々は前回、EMIT法により血中濃度測定を行い、その血中動態を本誌<sup>1)</sup>に発表した。今回、HPLCを用いて、TPの血中濃度を短時間に簡単に精度よく定量する為の測定方法を検討し、又、その方法を利用して、TPの血中動態、及び、キサンチン系薬剤を含む飲食物との関係について検討したので、その結果を報告する。

実験方法<sup>2),3)</sup>

1. 試薬及び試液

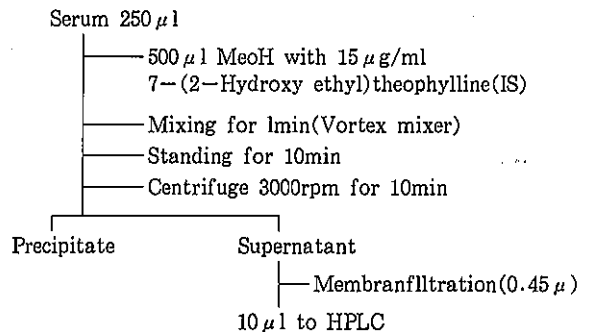
テオフィリン (局方品)、7-(2-ヒドロキシエチル)テオフィリンは日本分光工業より、テオドール (日研化学)、コーヒー (市販品) を使用した。アセトニトリル、メタノールは、HPLC用の試薬 (和光

純薬)、リン酸第一カリウムは特級品を使用した。コントロール血清、検量線作成用血清はEMIT-aadキット (Syva社-第一化学薬品) の血清を使用した。TPの血中動態の検討には健康成人女子の血清を使用した。

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TPを抽出する為に、図1に示すような前処理を行った。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7-(2-ヒドロキシエチル) テオフィリンを15 μg/mlの濃度で加え、遠心分離後、上清を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過しその10 μlをHPLCに注入した。

図1 Deproteinization



3. 検量線の作成

TPを各々、3、5、10、15、30、μg/ml含有したメタノール標準溶液、及び血清中TPを2.5、5、10、20、40 μg/ml含有する、EMIT用キャリブレーターを用い検量線を作成した。

4. HPLCの条件

装置には、日本分光BIP-1に日本分光UVIDEC-

1) 中央総合病院 薬剤科

2) 三条総合病院 薬剤科

100可変波長検出機を接続し、記録計には、ChromatocorderIIを使用した。

測定条件は、カラムにはFinepak SILC<sub>18</sub>を用い、移動相には0.1Mリン酸第一カリウム水溶液 (pH4.5) / アセトニトリル (90:10) を使用した。流量は1 ml/min、波長273nm、カラム温度40℃、試量注入量は10 μlとした (図2)。なお、0.1M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 μm) で口過した後、100℃で1時間滅菌し、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4.4に調整した。

図2 Operating condition of HPLC

Column: 4.6mmID×150mm column packed with Finepak SIL C18
Mobile phase: 0.1M phosphate buffer (PH4.5) -acetonitrilu(90:10 v/v)
Flow rate: 1.0ml/min
Detector: UV
Wave length: 273nm
Column temperature: 40℃
Sample size: 10 μl

5. 血中動態

健康成人女子に、テオフィリン徐放錠テオドール (TP400mg含有) を経口投与し、投与前30分、投与後2、4、6、8、24時間後について、血液より常法通り血清を分離し、前述の方法に従って検量線より血中濃度を測定した。ただし、被検者には40時間前より、コーヒー、茶、コーラ等のキサンチン薬剤を含む飲食物を禁止した。

6. キサンチン薬剤との関係

テオドールの血中動態を検討した同一被検者にコーヒー (カフェイン量として150mg~210mg) を5日間飲用させ、血清から前述の方法に従って検量線より血中濃度を測定した。

結果及び考察

1. HPLCの測定条件の検討

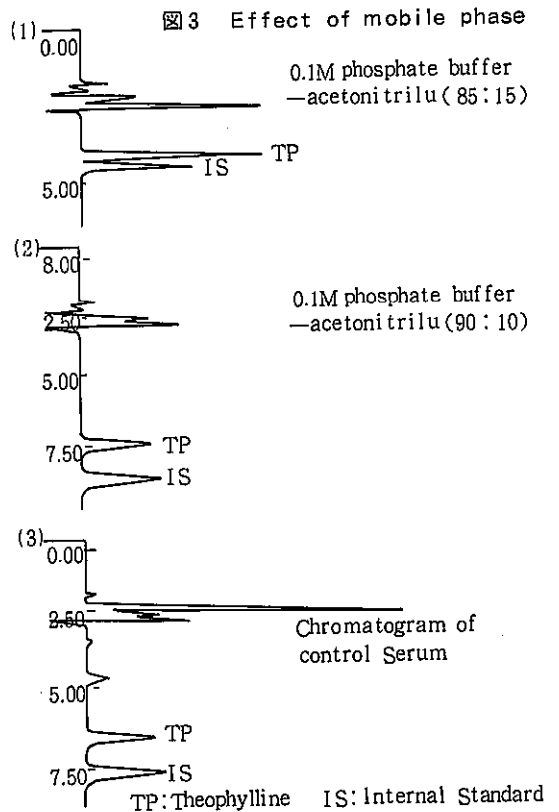
移動相の混合比、カラム温度の変化により試料の分離、Retention time等に影響がある為、それらの条件について検討した。

A. 移動相の検討

0.1Mリン酸第一カリウム水溶液 (pH4.5) とアセ

トニトリルを移動相とし、各々の混合比を85:15、90:10とし、TPのメタノール溶液及び、TPのEMIT用コントロール血清で分離、Retention timeについて検討した。

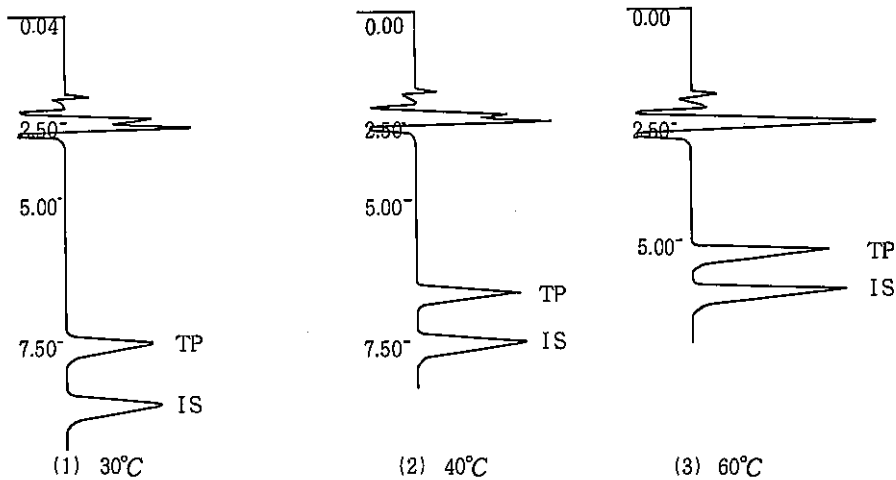
TPメタノール溶液において85:15の混合比では、TPとISの分離があまりうまくいかず、Retention timeも短く (図3-1)、90:10では (図3-2) 良好に分離できた。EMIT用コントロール血清においても、90:10では血清成分と思われるピークとも重ならず良好に分離できた (図3-3)。そこで、混合比を0.1Mリン酸第一カリウム (pH4.5) : アセトニトリル、90:10と決定した。



B. カラム温度の検討

カラム温度を、30、40、60℃として各々、TPメタノール溶液で検討した、その結果、30℃ではRetention timeが長く (図4-1)。40℃では (図4-2) 良好に分離できた。60℃では、TPとISのピークがわずかだが近くなり (図4-3)、又、カラム温度を60℃に保つことが難しい為、カラム温度を40℃に決定した。

図4 Effect of column temperature on retention time



2. 検量線の検討

TP 3~30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するメタノール標準溶液、及び、血清中TP 2.5~40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するEMIT用キャリブレーターを用い、試料濃度に対するピーク面積より、絶対検量線法により検量線を求めた。図5に示すように、どちらも原点を通る良好な直線が得られた。

500  $\mu\text{l}$ に増して抽出したところ良好に除タンパクできたので、試料：メタノールを1：2にして抽出することにした。

回収率は、EMIT用コントロール血清 (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を用いた。その結果、表1に示すように回収率102%、変動係数 (CV) 1.2%と良好な結果を得た。

図5 Absolute calibration curves of Theophylline

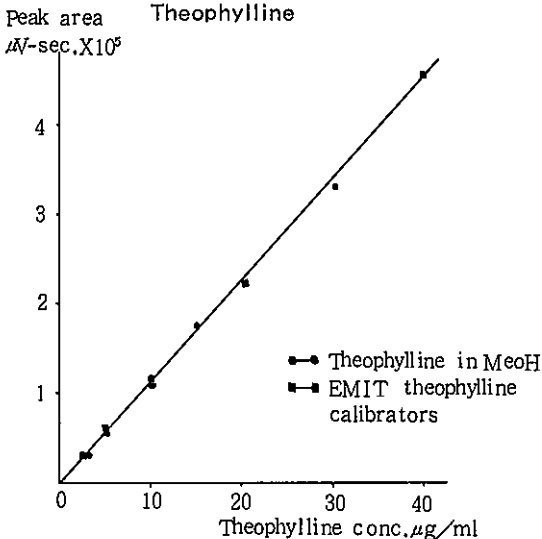


表1 Recovery of Theophylline added to Serum (n = 5)

Drug	Conc. $\mu\text{g}/\text{ml}$	Recovery % $\pm$ SD	CV %
TP	15	102.1 $\pm$ 1.23	1.20

以上のように、検量線が原点を通る直線であること、EMIT用コントロール血清からのTPの回収率がほぼ100%であることから血中濃度測定には、TPを15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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することにした。

3. 除タンパク<sup>4)</sup>及び回収率の検討

血清試料の前処理は、メタノール抽出法を用いた。その結果、試料250  $\mu\text{l}$ に対しメタノール250  $\mu\text{l}$ を加え抽出した場合うまく除タンパクできず、メタノールを

4. 定量精度の検討

TP 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するEMIT用コントロール血清を用いて、HPLCの測定値の再現性を検討した。日内変動、日差変動のCVは、各々、1.21%、1.89%と良好な再現性を示した (表2)。又、Retention timeのCVも0.05%と良好であった。(表3)

5. TPの血中動態の検討

被検者にTP徐放剤テオドール (TP400mg)を投与し、投与前30分から24時間後までの血中濃度の変化を

測定した。その結果、図6のようになり約8時間で最高血中濃度に達し、半減期は約13時間であった。この事から最近、提唱されているRTC (Rund The Chock) 療法にも、使用できる薬剤と考えられる。又、今回、TP投与前の時点でTPと同じRetention timeにピークが現れた、これは被検者が普段よりかなり多くのコーヒー、茶等のキサンチン類を飲用していた為に、その代謝物と思われる物が完全に排泄されず現れたものと思われる。

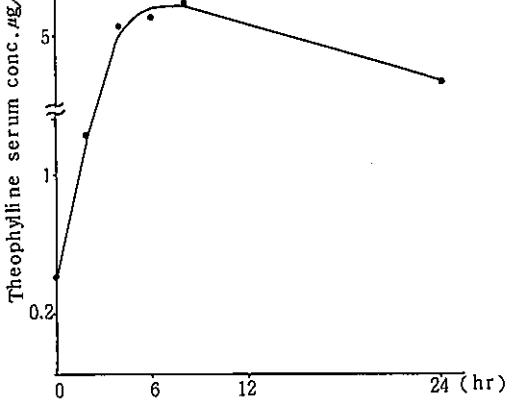
表2 Precision of Assays for Theophylline in Serum (n=5)

	Conc. $\mu\text{g/ml}$	Range $\mu\text{g/ml}$ ( $\pm\text{SD}$ )	CV %	n
With in Day	15	15.23 $\pm$ 0.18	1.21	5
Day to Day	15	15.26 $\pm$ 0.29	1.89	5

表3 Precision of Assays for Retention Time (n=5)

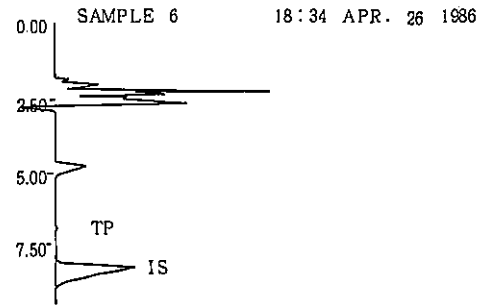
Drug	Retention time	SD	CV %
TP	6.52	$\pm$ 0.0034	0.05

図6 Serum Theophylline (TP) concentration in normal volunteer after a single oral administration of 400mg of TP (THEODOR 100)



6. TPとキサンチン薬剤を含む飲用物との関係の検討  
被検者に、コーヒー1日3杯(カフェイン量として150mg~210mg)を5日間飲用させ血中濃度を測定した。その結果、TPと同じRetention timeにピークが現れ濃度は0.58  $\mu\text{g}/\text{mg}$ であった(図7)。これはカフェインの代謝系を検討した結果、TPとはほぼ同じRetention timeをもつ代謝物が影響していると思われる。

図7 Chromatogram of serum after drinking coffee



CAL.METHOD -0.4

	3 F	PA	PB		
	.100000 $\times$ 10 <sup>+0.1</sup>	.100000 $\times$ 10 <sup>+0.1</sup>	.100000 $\times$ 10 <sup>+0.1</sup>		
No	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TP	6.636	6863		0.5808
2	IS	8.018	243509		15.5347
	TOTAL		250372		16.1155

以上、5、6の結果よりTPの血中濃度にキサンチン薬剤がなんらかのかたちで影響するものと考えられ、これらの飲用にも注意する必要があると思われる。

おわりに

TPのHPLCによる測定方法については、すでに、色々な方法が報告されている。しかし、薬剤科の設備、費用、時間など各々問題があり、なかなか統一された測定方法で行うことは難しいようである。そこで、より短時間に簡単に精度よく定量できるように、測定方法の検討をしておくことが大切である。

今回、前述の通り測定方法が確立できたので今後、臨床の場で多に活用していきたいと思う。

本論文の要旨は、第22回新潟県厚生連勤務薬剤師研修会(1986.5.25)にて発表した。

参考文献

- 1) テオフィリンの血中濃度測定、厚生連医誌第1巻2号、19-22(1984)
- 2) 投与医薬品の体液中濃度測定へのHPLCの応用、日本分光
- 3) 高速液体クロマトグラフ法による体液中のテオフィリンの定量、薬学雑誌101(10)955-959(1981)
- 4) 医薬品血中濃度モニタリングの手引き、生体試料の扱い(下)、月刊薬事Vol. 26 No 4(1984)
- 5) 田村善蔵、薬物血中濃度測定の実際、薬業時報社(1980)