ノ ー ト

カラムスイッチング高速液体クロマトグラフィーによる 血清中のテオフィリン及び抗てんかん薬の迅速定量

千葉 良子^{®*}, 山崎 浩行^{**}, 海野 益郎^{**}, 浦山 功^{***}, 田中 彰^{*}

Rapid determination of theophylline and antiepileptic drugs in serum by column-switching HPLC

Ryoko CHIBA^{*}, Hiroyuki YAMAZAKI, Masuo UMINO^{**}, Isao URAYAMA^{***} and Akira TANAKA^{*}

^{*}Showa of Pharmaceutical University, 3-3165, Higashitamagawagakuen, machida-shi, Tokyo 194-8543

^{**}Scientific Instrument Division, Tosoh Co., 2743-1, Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa 252-1123

^{***}Toho University School of Medicine, 6-11-1, Omorinishi, Ota-ku, Tokyo 143-8541

(Received 10 November 1999, Accepted 6 January 2000)

The rapid determination of theophylline and antiepileptic drugs (phenobarbital, carbamazepine, phenytoin and valproic acid) in human serum using a combination of a short pre-treatment column (TSKprecolumn BSA-ODS/S) and a short analytical column (TSKgel Super-ODS) was investigated. Under the optimized analytical conditions, theophylline and four antiepileptic drugs were eluted within 14 min. The relationship between the sample amount and the peak areas of five drugs indicated good linearity over the range from 1.0 to 500 mg/l (valproic acid) and 0.2 to 110 mg/l (other drugs), respectively. Five drugs from spiked serum were recovered quantitatively. The repeatability and reproducibility of the peak areas of standard and spiked serum were less than 1.6%. The drug concentrations in human serum determined by a enzyme immunoassay method and a column-switching method showed good agreement. Therefore, this column-switching method is very suitable for therapeutic drug monitoring (TDM) in biological fluids.

Keywords : column-switching HPLC; theophylline; antiepileptic drugs; rapid determination; human serum.

1 緒 言

抗てんかん薬などの薬物投与による治療効果は、投与量よりも血液中の薬物濃度に相関しているが、複数の薬物の併用により血中薬物濃度の変化や薬効、毒性が変化することがある。また、薬物モニタリング療法 (TDM) を行う上でも血中薬物濃度の迅速で正確な測定方法が望まれている^{1)~3)}。一般に、生体試料中の薬物の測定では、除タンパ

ク等の煩雑な前処理が必要であるが、カラムスイッチング高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、煩雑な前処理を行うことなく、簡便に生体試料中の薬物の測定を行うことが可能である^{4)~8)}。現在まで、カラムスイッチング HPLC 法によるテオフィリン及びその関連化合物や抗てんかん薬の分析法については既に二つの論文が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。しかし、これらの方法では臨床に投与されている共存薬物を同条件で分析することはできない。また、分析カラムとして、いずれもはん用型の逆相カラム (粒子径 5 μm 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm) を使用していることから、これらの薬物の測定には約 30 分の分析時間を必要としている。このような事実は、実用上複数の薬物を一定条件下で同時分析するには、迅速性及び簡便性を欠いていると考え

^{*} 昭和薬科大学薬品分析学研究室: 194-8543 東京都町田市東玉川学園 3-3165

^{**} 東ソー株式会社科学計測事業部: 252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1

^{***} 東邦大学医学部臨床検査医学研究室: 143-8541 東京都大田区大森西 5-21-16

Fig. 1 Flow diagram of column switching HPLC

1: pump-1; 2: pump-2; 3: auto sample injector; 4: switching valve; 5: column oven; 6: UV detector; 7: system controller; 8: line filter (1 μ m); 9: precolumn; 10: analytical column; 11: drain; 12: pretreatment eluent; 13: washing solution; 14: eluent-1; 15: eluent-2

られる。

そこで著者らは、超高速高性能カラム (TSKgel Super-ODS) とセミマイクロ対応前処理カラム (TSKprecolumn BSA-ODS/S) を組み合わせて、カラムスイッチング HPLC 法による血中のテオフィリン、及び抗てんかん薬であるフェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトン、バルプロ酸の同時分析条件の最適化を検討し、その結果、迅速で簡便な分析法を開発したので報告する。

2 実験

2.1 装置

カラムスイッチング HPLC システムは、送液ポンプ DP-8020, オートサンプラー AS-8020, バルブコントローラー VC-8020, カラムオーブン CO-8020 (冷却機構付き), 紫外可視検出器 UV-8020, システム制御及びデータ処理装置 LC-8020 (いずれも東ソー製) を使用した。また、オートサンプラーと前処理バルブの間には、ラインフィルター (1 μ m 焼結フィルター) を装着した。検出器のセルは、マイクロフローセル (セル容量 2 μ l) を用いた。HPLC システムの構成図を Fig. 1 に示す。

分析カラムは、TSKgel Super-ODS (10 cm $\times$ 4.6 mm i.d., 東ソー製), 前処理カラムには、TSKprecolumn BSA-ODS/S (1.0 cm $\times$ 4.6 mm i.d., 東ソー製) を使用した。分析用溶離液は、A 液: 50 mmol/l リン酸二水素ナトリウムとアセトニトリルの混合溶液 (92/8), B 液: 50 mmol/l リン酸緩衝液 (pH 5.8) とアセトニトリルの混合溶液 (72/28) を用い、流量は 1.0 ml/min, カラム温度は 25 $^{\circ}$ C とした。各薬物は、A 液 4 分, B 液 7 分のステップグラジエント溶出法により分離し検出波長 210 nm で検出した。

Fig. 2 Effect of CH₃CN concentration in eluent on retention time

Column: TSKgel Super-ODS (4.6 mm i.d. $\times$ 10 cm); Flow rate: 1.0 ml/min; Eluent: CH₃CN/50 mmol/l NaH₂PO₄(x/y); Injection volume: 5 μ l; Temperature: 40 $^{\circ}$ C; Detect: UV(210 nm); Sample: ○, theophylline; △, phenobarbital; □, carbamazepine; ◇, phenytoin; ×, valproic acid

前処理用溶離液には、50 mmol/l リン酸二水素ナトリウム溶液を使用し、流量は 1.5 ml/min とした。前処理カラムによる前処理時間は、血清中のタンパク質等の高分子成分が十分に除去される 3 分とし、前処理カラムと分析カラムの接続時間は、各薬物の回収率がほぼ 100% を示した 2.5 分とした。疎水性の強い薬物の血清タンパク質との結合による回収率の低下を防ぐために、試料はすべて 200 mmol/l 過塩素酸ナトリウム溶液で 1/2 に希釈した後 50 μ l 注入した。また、分析カラム及び前処理カラムは、50

mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8) とアセトニトリルの混合溶液 (60/40) を用いて試料注入ごとに洗浄を行った。更に分析法の比較評価を行う装置として、蛍光偏光免疫法 (fluorescence polarization immunoassay, FPIA) を利用した TDX™ システム (ダイナボット製) を用いた。

2.2 試薬及び試料

標準薬物として用いたテオフィリン、フェニトイン (和光純薬製特級)、カルバマゼピン (和光純薬製生化学用)、バルプロ酸ナトリウム (和光純薬製一級)、フェノバルビタールナトリウム (東京化成製特級) は、ひょう量後メタノール (和光純薬製 HPLC 用) に溶解し、脱イオン交換水で希釈して任意の濃度の標準溶液を調製した。血清は、健常者血清及び患者血清を用い、標準添加血清は、タンパク質の変性が生じないように、メタノールに溶解した薬物を健常者血清に少量ずつ添加して調製した。その他の試薬は、和光純薬製の特級品を用い、アセトニトリルはナカライテスク製の HPLC 用製品を使用した。脱イオン交換水は、Milli-Q システムにより精製した水を用いた。

Fig. 3 Effect of pH in eluent on retention time
Column: TSKgel Super-ODS(4.6 mm i.d. × 10 cm);
Eluent: 50 mmol/l phosphate buffer(pHx)/CH₃CN (72/28). Other conditions as in Fig. 2.

3 結果及び考察

3.1 分離条件の検討

5 種類の薬物について、溶離液の有機溶媒濃度、pH 及びカラム温度の影響について、分析カラムに直接試料を注入して検討を行った。その結果、Fig. 2 に示すように溶離液のアセトニトリル濃度の増加とともに薬物の保持時間の減少が見られた。抗てんかん薬 4 種類が迅速に分離分析可能なアセトニトリル濃度では、テオフィリンがほとんど保持されない。また、キサンチン含有飲食物に含まれるテオブロミン、カフェインとテオフィリンを十分に分離する必要があることから、溶離液には 50 mmol/l リン酸二水素ナトリウムとアセトニトリルの混合溶液 (92/8) を用いてテオフィリンを測定した後に、抗てんかん薬 4 種類が迅速に分離分析可能なアセトニトリル濃度 {50 mmol/l リン酸二水素ナトリウムとアセトニトリルの混合溶液 (72/28)} に変更するステップグラジエント溶出法を用い

Fig. 4 Effect of column oven temperature on retention time
Column: TSKgel Super-ODS(4.6 mm i.d. × 10 cm);
Eluent: 50 mmol/l NaH₂PO₄/CH₃CN(92/8) (for theophylline), 50 mmol/l NaH₂PO₄(pH 5.8)/CH₃CN (72/28) (for other drugs). Other conditions as in Fig. 2.

Table 1 Recovery, repeatability and reproducibility of standard and drugs spiked in serum by the column-switching HPLC method

Drugs	Spiked volume	Repeatability (RSD; %, n = 6) [Recovery](%, n = 3)		Reproducibility (RSD; %, n = 3)	
		Standard	Spiked serum	Standard	Spiked serum
Theophylline	(11.20 mg/l)	0.51 [100]	0.78 [114]	0.38	0.18
Phenobarbital	(13.01 mg/l)	0.52 [100]	0.69 [103]	0.19	0.45
Valproic acid	(51.9 mg/l)	0.97 [101]	0.14 [115]	1.41	1.59
Carbamazepine	(10.78 mg/l)	0.79 [100]	0.71 [103]	0.50	0.33
Phenyton	(11.9 mg/l)	0.68 [96]	0.81 [104]	1.30	0.36

Fig. 5 Chromatograms of standard and sample spiked in human serum by column-switching HPLC system

Conditions: analytical column, TSKgel Super-ODS; pretreatment column, TSK precolumn BSA-ODS/S; flow rate, 1.0 ml/min (analysis), 1.5 ml/min (pretreatment); eluent, 50 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN}$ (92/8) (for theophylline), 50 mmol/l phosphate buffer (pH 5.8)/ CH_3CN (72/28) (for other drugs), washing solvent, 50 mmol/l phosphate buffer (pH 6.8)/ CH_3CN (60/40); pretreatment solvent; 50 mmol/l NaH_2PO_4 ; sample volume, 50 μl (2-fold dilution); sample, standard sample (A), spiked in human serum (B). Other conditions as described in Section 2·1.

ることとした。次に、溶離液の pH の保持時間への影響について検討を行った結果を Fig. 3 に示す。他の薬物の保持時間が溶離液の pH の影響をほとんど受けないのに対して、バルプロ酸のカルボン酸の解離が溶離液の pH により変化するため、 pK_a 4.95 を境に溶離液の pH が低くなるにしたがって保持時間が増加し、逆に溶離液の pH が高くなると減少した。測定時間の短縮及び血清由来の不純物ピークによる干渉を避けるために、B 液の pH をバルプロ酸がフェノバルビタールとカルバマゼピンの間に溶出する pH 5.8 とした。カラム温度については、温度の上昇により各薬物の保持時間が若干早くなる傾向が見られた。また、25℃ においてカルバマゼピンとフェニトインの分離が最も良好となることから、カラム温度は 25℃ とした。Fig. 4 に保持時間のカラム温度の影響について示す。分析条件の最適化を行った結果、前処理時間を含み 14 分以内の短時間で 5 種類の薬物を同時測定することが可能となった。

3·2 検量線

標準溶液を用いて薬物濃度と各ピーク面積の関係について調べた結果、各薬物の回帰式及び相関係数はテオフィリ

Table 2 Comparison of concentrations in human of administered patients with the FPIA method and column-switching HPLC method

	Concentration/ mg l^{-1}									
	Patient A		Patient B		Patient C		Patient D		Patient E	
	Method 1	Method 2	Method 1	Method 2	Method 1	Method 2	Method 1	Method 2	Method 1	Method 2
Theophylline	N.D.	N.D.	13.0	10.0	10.8	9.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Phenobarbital	15.3	12.2	55.6	46.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	20.5	14.8
Valproic acid	31.5	38.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	104.0	74.0
Carbamazepine	7.9	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.5	7.6	N.D.	N.D.
Phenytoin	N.D.	N.D.	26.1	25.5	20.8	19.1	N.D.	N.D.	7.6	5.2

Method 1: Column-switching HPLC method, Method 2: Fluorescence polarization immunoassay (FPIA), N.D.: Not detected

ン $y = 54.84x + 6.99$, $r^2 = 1.0000$ (0.22~112.0 mg/l), フェノバルビタール $y = 33.58x + 5.49$, $r^2 = 0.9997$ (0.26~130.1 mg/l), バルプロ酸 $y = 0.48x + 0.30$, $r^2 = 0.9999$ (1.04~519.0 mg/l), カルバマゼピン $y = 70.79x + 1.89$, $r^2 = 1.0000$ (0.22~107.8 mg/l), フェニトイン $y = 37.18x + 1.16$, $r^2 = 1.0000$ (0.24~119.0 mg/l) となり, 各々ほぼ原点を通る良好な直線関係が認められた. また, 定量限界 ($S/N=10$) 及び検出限界 ($S/N=3$) については以下のような値が得られた. テオフィリン (0.22 mg/l 及び 6 μ g/l), フェノバルビタール (0.26 mg/l 及び 4 μ g/l), バルプロ酸 (1.04 mg/l 及び 280 μ g/l), カルバマゼピン (0.22 mg/l 及び 6 μ g/l), フェニトイン (0.24 mg/l 及び 3 μ g/l).

3.3 回収率及び再現性

標準溶液及び標準添加血清での各薬物の回収率及び日内, 日差再現性について調べた結果を Table 1 に示す. 標準溶液での薬物の回収率は, カラムスイッチング法で得られた薬物のピーク面積を, 分析カラムに直接注入したときに得られた薬物のピーク面積で除して算出し, 標準添加血清では, カラムスイッチング法で得られた添加薬物のピーク面積を, カラムスイッチング法で得られた標準薬物のピーク面積で除して算出した. 回収率は $n=3$ の平均値を示す. 標準溶液及び標準添加血清とも 96~115% と良好な回収率が得られた. また, 日内再現性は, 標準溶液, 標準添加血清とも相対標準偏差 (RSD) が 1% 以下, 日差再現性についても標準溶液及び標準添加血清の RSD が, それぞれ 1.5% 以下, 1.6% 以下となり, FPIA 法 (TDXTM システム) の添付文書に記載されている 5~7% 未満に比べ, より満足する再現性が得られた. Fig. 5 に標準溶液及び標準添加血清測定時のクロマトグラムを示す. クロマトグラム上に血中の妨害ピークは認められず, 以後の測定に支障はないものと考えられた.

3.4 ヒト血液試料への適用

本研究で確立した分析法及び臨床上, 標準的に使用されている FPIA 法を用いて, 実際にテオフィリン及び抗てんかん薬を投与された患者血清について定量を行った. その結果, FPIA 法に比べカラムスイッチング HPLC 法が若干高い値ではあるが, 各々の薬物濃度について両方法はほぼ一致した値を示した (Table 2). また, Fig. 6 に示したクロマトグラム例からも, テオフィリンと抗てんかん薬は完全に分離されており, 本法が実用的にも十分役立つであろうことが示唆された.

Fig. 6 Chromatograms of drugs administering patient's serum by column-switching HPLC system

Conditions: sample, drugs administering patient's serum (theophylline, phenobarbital, phenytoin) (A); drugs administering patient's serum (phenobarbital, phenytoin, valproic acid) (B). Other conditions as in Fig. 5.

以上, 超高速高性能カラム (TSKgel Super-ODS) とセミマイクロ対応前処理カラム (TSKprecolumn BSA-ODS/S) を組み合わせたカラムスイッチング HPLC 法を用いることにより, 一定の分析条件下で短時間に再現性良く, 血中テオフィリン及び抗てんかん薬 (4 種類) の同時分析を行うことができた. 今後本法は, これら併用される薬物の TDM を行う上からも極めて有用な一手法と考えられた.

文 献

- 1) 渡辺 淳: “薬物治療適性のための薬物血中濃度測定の実際”, p. 3 (1981), (薬業時報社).
- 2) 国立病院・療養所薬剤科長協議会: 月刊薬事, **28**, 1025 (1986).
- 3) 五味田裕, 古野勝志, 荒木泰典: 臨床検査, **32**, 1453 (1988).
- 4) H. Yosida, I. Morita, T. Masujima, H. Imai: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3827 (1982).
- 5) I. Morita, T. Masujima, H. Yosida, H. Imai: *Bunseki Kagaku*, **33**, E235 (1984).
- 6) I. Morita, T. Masujima, H. Yosida, H. Imai: *Anal. Biochem.*, **151**, 358 (1985).
- 7) G. Tamai, I. Morita, T. Masujima, H. Yosida, H. Imai: *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1825 (1984).
- 8) K. Kondo, M. Nakamura, R. Nishioka, S. Kawai: *Anal. Sci.*, **1**, 385 (1985).
- 9) K. Matsumoto, H. Kikuchi, H. Iri, H. Takahashi, M. Umino: *J. Chromatogr.*, **425**, 323 (1988).
- 10) J. Haginaka, J. Wakai, H. Yasuda, Y. Kimura: *J. Chromatogr.*, **529**, 455 (1990).