蛍光ラベル化剤を用いた HPLC による 小児血漿中トピラマート濃度測定法の開発

高橋良平^{*1}, 今井浩一^{1,2}, 吉田栄充³, 田中 学⁴, 浜野晋一郎⁴, 新井康俊¹

埼玉県立小児医療センター薬剤部¹, 埼玉県立小児医療センター臨床研究室²

埼玉県衛生研究所³, 埼玉県立小児医療センター神経科⁴

Determination of Topiramate in Infant Plasma by High-performance Liquid Chromatography Using Fluorescence Derivatizing Agent

Ryohei Takahashi^{*1}, Koichi Imai^{1,2}, Terumitsu Yoshida³, Manabu Tanaka⁴,
Shin-ichiro Hamano⁴ and Yasutoshi Arai¹

Department of Pharmacy, Saitama Children's Medical Center¹

Division of Clinical Research, Saitama Children's Medical Center²

Saitama Prefectural Institute of Public Health³

Division of Neurology, Saitama Children's Medical Center⁴

[Received December 22, 2009]
[Accepted May 2, 2010]

In this study, we developed a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a fluorescence derivatizing agent for the determination of topiramate (TPM) in infant plasma. The method used 100 μ L plasma samples, and the HPLC separation was carried out on a Discovery HS-C 18 column (3 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) with phosphate buffer (pH 2.5; 25 mM)-methanol-acetonitrile (50 : 40 : 10 (v/v/v)) as the mobile phase at a 1.0 mL/min flow rate. TPM was detected using a fluorescence detector (ex/em : 470/537 nm). The quantification limit was 0.1 μ g/mL, and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 0.8–7.1% and 1.3–9.3%, respectively. A specificity and selectivity study showed that there were no interfering peaks. Furthermore, correlation analysis of TPM concentrations measured by HPLC and LC/MS produced a correlation coefficient (r) of 0.9825.

Key words topiramate, TDM, high-performance liquid chromatography, infant plasma, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan, NBD-Cl,

緒 言

2007 年 7 月にわが国で承認された抗てんかん薬のトピラマート¹⁾(以下, TPM と略す, Fig. 1)は, 海外では他剤との併用療法のほか単剤療法での使用や小児での適応もあることから広く使用されている²⁾が, わが国においては小児に対する用法・用量は定められていない。埼玉県立小児医療センター(以下, 当院と略す)では, その有効性と安全性を検討しながら小児難治性てんかんにおける部分発作と全般発作において治療に使用している³⁾。TPM は, 小児でのクリアランスが成人に比べて高いこと^{4–6)}, 酵素誘導型薬剤の併用により血中濃度が低下すること^{7–9)}, 他の抗てんかん薬の血中濃度へ影響すること¹⁰⁾, 少量緩徐な漸増法が望まれていること^{11, 12)}などの理由から薬物血中濃度モニタリングの必要性が考えられ

る。しかしながら, 現在までのところ, 受託臨床検査において TPM の血中濃度測定を行っている機関はない。海外では, 蛍光偏光免疫測定法¹³⁾の測定キットが使用されているが, わが国では販売されていないため, その血中濃度を測定する場合, 各医療機関において独自に行わなければならない。TPM は, UV 吸収や特異的な蛍光発光もないため, その測定には高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(以下, LC/MS と略す)を用いて測定するのが一般的であるが, 汎用分析機器ではないため, 医療現場での測定が困難な状況が生じている。これまでの研究において, 各医療機関においても比較的容易に測定可能である蛍光ラベル化剤を用いた高速液体クロマトグラフィー(以下, HPLC と略す)による血中 TPM 濃度測定法の報告¹⁴⁾もすでにされている。しかしながら, これまでの報告では, 試料量が多く必要なことから採血量の少ない小児患者試料に適用するには難しい状況である。

* 埼玉県さいたま市岩槻区馬込 2100 ; 2100, Magome, Iwatsuki-ku, Saitama-shi, Saitama, 339 8551 Japan

Fig. 1. Chemical structures of TPM, 4-ethylbenzenesulfonamide as an internal standard and NBD-Cl.

さらに、これまでの報告では小児患者試料への適用が未検討であるため、併用薬や、その代謝物を含んだ生体内物質による影響については明らかにされていない。また、他施設と比較し評価することによる測定法の有効性や分析精度に関しても未検討である。したがって、本研究では、試料量の少ない小児の薬物血中濃度モニタリングへ応用可能な精度ある TPM 濃度測定法の開発を目的として、蛍光ラベル化剤を用いた HPLC による血中 TPM 濃度の測定法を開発した。さらに、LC/MS との測定値の相関性についても比較し、その有用性について検討した。

方 法

1. 試薬

TPM は SIGMA-ALDRICH 社より購入した。4-ethylbenzenesulfonamide (Fig. 1) および 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (以下、NBD-Cl と略す、Fig. 1) は東京化成工業株式会社より入手した。60% 過塩素酸は関東化学株式会社製を用い、アセトニトリル、メタノールおよび精製水はすべて HPLC 用を用いた。新鮮凍結血漿は日本赤十字社より入手した。

2. 標準溶液および試薬の調製

TPM 標準溶液は TPM 50 mg をメタノールにて 50 mL に溶解したものとした。同様に、内部標準物質(以下、I.S. と略す)とした 4-ethylbenzenesulfonamide および蛍光ラベル化剤とした NBD-Cl についても、それぞれ 50 mg をメタノールにて 50 mL に溶解した。TPM、4-ethylbenzenesulfonamide および NBD-Cl はメタノールに溶解後、それぞれ 4℃ で保管し 2 カ月間安定であった。

3. 検量線用スタンダードおよび I.S. の調製

検量線用スタンダードは 10 μL の TPM 標準溶液に対して、90 μL の新鮮凍結血漿を添加し攪拌後、さらに、0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 および 16.0 μg/mL の濃度になるように新鮮凍結血漿で希釈し調製した。また、

I.S. は、4-ethylbenzenesulfonamide を、250 μg/mL の濃度になるようにメタノールで希釈したものを使用した。

4. 測定機器および測定条件

HPLC 分析装置には、バイナリポンプ SL、デガッサ、オートサンプラー、カラムコンパートメント(恒温槽)、および蛍光検出器から構成された Agilent 1200 series の HPLC システム(Agilent Technologies)を用いた。分析カラムには、Discovery HS-C 18 column(3 μm, 4.6 mm × 150 mm, SIGMA-ALDRICH)を用い、測定時 50℃ に保ち、ガードカラムとして Inertsil ODS-80 A(5 μm, 10 × 4.0 mm, GL Sciences)を使用した。移動相は 25 mM リン酸緩衝液(pH 2.5)/メタノール/アセトニトリル(50:40:10, v/v/v)を 1.0 mL/min で送液して分析を行った。HPLC 注入量は 20 μL であり、TPM の検出には蛍光検出器(ex/em: 470/537 nm)を使用した。また、検量線用スタンダードおよび血漿試料は試料調製後、各測定開始時間まで 4℃ に保った。

5. 試料調製

1.5 mL の遠心用チューブに、各濃度に調製した検量線用スタンダードまたは血漿試料 100 μL を分取し、10 μL の I.S. を添加後、除タンパク処理および pH 調整として 100 μL の 6% 過塩素酸を加えて攪拌後、15 分間放置した。さらに、ジクロロメタン 1 mL を加え、10 分間混和した後、20℃, 17,400 × g で 15 分間遠心分離し、水相を除去した後、窒素気流下でジクロロメタン層を留去した。残渣に精製水 100 μL, NBD-Cl 溶液 100 μL, および 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 25 μL を加え、55℃ にて 120 分間反応させた。次に、室温にもどした後、HPLC 用バイアルに移し、定量を試みた。

6. 精度および真度

日内再現性は、0.1, 0.2, 0.5, 2.0 および 8.0 μg/mL になるように調製した TPM の血漿試料について、各濃度につき 5 回繰り返し定量することによって評価した。

また、同様の濃度で5日間に渡り定量することで日間再現性を評価した。

7. 特異性試験

特異性試験として健常人より得られたブランク血漿、ブランク血清、および12種類の抗てんかん薬を含む38種類の薬剤を添加したコントロール血清について行った (Table 1)。検討を行った薬剤は、エトスクシミド、カルバマゼピン、カルバマゼピン 10, 11 エポキシド、バルプロ酸、フェニトイン、フェノバルビタール、プリミドン、ガバペンチン、ラモトリギン、ゾニサミド (以下、ZNS と略す)、クロナゼパム、ジアゼパム、アミトリプチリン、イミプラミン、デシプラミン、ノルトリプチリン、ハロペリドール、アミカシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、アセトアミノフェン、サリチル酸、フレカイニド、プロカインアミド、N アセチルプロカインアミド、プロプラノロール、リドカイン、キニジン、ジソピラミド、ジゴキシン、カフェイン、テオフィリン、シクロスポリン、メトトレキサート、リチウム、およびメチクランであり、薬剤の濃度は一般臨床濃度とした。

8. 対象患者試料の測定

当院において2008年10月から2009年9月までの小

児難治性てんかん患者の血漿試料 (n = 46) を対象とした。採取した血漿試料は定量まで - 25℃ で保存した。なお、本研究は、当院の倫理委員会より、臨床研究として承認済みであり、被験者および代諾者に対して同意の下に実施した。

9. 相関性

当院 HPLC にて測定した同一の血漿試料 (n = 46) を LC/MS にて再測定し、相関性を比較、有用性について検討した。なお、LC/MS による測定は協和発酵キリン株式会社にて行った。

結 果

1. クロマトグラム

健常人におけるブランク血漿、TPM を添加した健常人における血漿、TPM 内服患者における血漿および特異性試験における薬物添加コントロール血清のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。TPM のピークが約 13.5 分、I.S. のピークが約 18.8 分に検出され、健常人におけるブランク血漿より得られたクロマトグラムにおいて、内因性物質における妨害ピークは検出されなかった。また、薬物添加コントロール血清において ZNS のピークが約 8.2 分に検出されたが、TPM および I.S. とともに分離は良好で

Table 1. List of drugs checked for TPM method interference

Antiepileptic drugs

ethosuximide, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, valproic acid, phenytoin, phenobarbital, primidone, gabapentin, lamotrigine, zonisamide, clonazepam, diazepam

Antidepressant

amitriptyline, imipramine, desipramine, nortriptyline

Antipsychotic

haloperidol

Antibiotic

amikacin, gentamicin, tobramycin, vancomycin, chloramphenicol

Anti-inflammatory drugs

acetaminophen, salicylic acid

Antiarrhythmic drugs

flecainide, procainamide, N-acetylprocainamide, propranolol, lidocaine, quinidine, disopyramide

Other drugs

digoxin, caffeine, theophylline, cyclosporin, methotrexate, lithium, meticrane

Fig 2 . Typical chromatograms of (A) blank plasma from human volunteer ; (B) a human blank plasma spiked with TPM (8.0 μ g/mL) ; (C) a plasma sample collected from an epileptic patient with TPM co-medicated (5.36 μ g/mL) ; and (D) a human blank plasma spiked with ZNS (10 μ g/mL) and TPM (8.0 μ g/mL).

定量に影響はみられなかった．ZNS 以外の薬剤に関しては TPM の定量に影響を与えるピークは検出されなかった．2008 年 10 月から 2009 年 9 月における繰り返し測定に関してカラムの劣化による分離不良は認められなかった．

2. 直線性

検量線は TPM の添加血漿濃度に対する，I.S. のピーク面積と TPM のピーク面積比より求めた．検量線は TPM 濃度として 0.1–16 μ g/mL において直線性を保ち，回帰直線は， $y = 0.188091x + 0.0109$ であり，ほぼ原点を通る直線となった(Fig. 3)．相関係数は $r = 0.9997$ であり，この範囲で定量が可能であることが確認された．

3. 精度および真度

日内および日間再現性について評価した．結果を Table 2 に示す．精度は変動係数(以下，C.V.と略す)として

日内再現性では 0.75–7.11%，日間再現性では 1.33–9.25%であった．真度は(定量値/理論値)×100% として評価し，日内再現性では 99.9–104.7%，日間再現性では 99.2–107.0% であった．

4. 定量下限値

TPM の定量下限値は 0.1 μ g/mL($S/N > 10$)とし，この濃度における日内再現性および日間再現性における C.V. は 9.25% 以下であり，真度は 104.7–107.0% であった (Table 2).

5. 相関性

Fig. 4 に示したように，HPLC 測定値と LC/MS 測定値との関係を調べたところ，相関係数は $r = 0.9825$ ，回帰直線は $y = 1.0122x - 0.0947$ であり，高い相関関係が認められた．

Fig 3 . Calibration curve and Linearity.

Table 2 . Intra- and inter-assay precision and accuracy results for plasma samples with TPM

Drugs	Added (µg/mL)	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=5)		
		Found(mean±S.D.)	Precision C.V.	Accuracy	Found(mean±S.D.)	Precision C.V.	Accuracy
		(µg/mL)	(%)	(%)	(µg/mL)	(%)	(%)
TPM	0.1	0.10 ± 0.01	3.25	104.7	0.11 ± 0.01	9.25	107.0
	0.2	0.21 ± 0.01	7.11	104.3	0.21 ± 0.01	3.78	103.0
	0.5	0.50 ± 0.01	2.55	99.9	0.50 ± 0.04	7.56	99.2
	2.0	2.07 ± 0.08	3.72	103.6	2.02 ± 0.04	1.76	100.8
	8.0	8.09 ± 0.06	0.75	101.1	8.14 ± 0.12	1.33	101.8

考 察

本研究では、TPM 濃度測定法を確立するにあたり、小児患者を対象とすることから、より少量の血漿試料で測定できること、かつ、臨床現場で薬物血中濃度モニタリングへ応用可能な精度であることを考慮し、検討を行った。

最初に、HPLC による定量で重要なラベル化剤の選択を検討した。本研究では、アミノ基のラベル化剤として benzoyl chloride, o-phthalaldehyde, 9-fluorenylmethyl chloroformate(以下、FMOC-Cl と略す)、NBD-Cl、および 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole の反応性について検討した結果、反応性が高く夾雑物ピークが少なかったことから、NBD-Cl を用いた誘導体化法を選択した。

次に、I.S.の選定を行った。これまでの報告でも第一アミノ基、または第二アミノ基を有するアムロジピン¹⁴⁾

またはアマンタジン^{15,16)}を用いる方法が報告されているが、本研究では TPM と同様、スルホンアミドを有する 4-ethylbenzenesulfonamide を I.S.として用いた。

本研究では、TPM の pKa が 8.7 であり pH が低くなるにつれて解離型の比率が減少することから、酸性条件下で抽出を行った。pH 調整剤として 6% 過塩素酸、リン酸、塩酸、酢酸について検討を行ったが、共沈がみられず除タンパク処理も可能であるため、6% 過塩素酸による酸性条件下で抽出を行った。また、抽出においては、各医療機関でも適用可能な液 液抽出にて検討することにした。抽出溶媒としてジクロロメタン、ジエチルエーテル、ヘキサン、酢酸エチル、トルエン、ジクロロメタン：アセトニトリル混液(4:1 v/v)およびジクロロメタン：2-プロパノール混液(3:1 v/v)について検討を行ったが、抽出率および迅速性ともにジクロロメタンによる抽出が再現性良く TPM を抽出することができ、十分適用できるものと考えられた。

Fig 4 . Relationship of plasma TPM concentrations determined by HPLC (fluorescence detection) and LC/MS.

NBD-Cl は、弱アルカリで誘導化反応が進むことが知られている¹⁷⁾。本研究では、アルカリ化剤として炭酸水素ナトリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、ホウ酸緩衝液およびトリエチルアミンについて検討した結果、TPM に対する反応性が高く、夾雑物ピークの少ない 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液を緩衝液として加える方法を選択した。NBD-Cl による誘導体化反応は、約 120 分で完全に終了した。反応時間による TPM や I.S. の反応物の分解は認められなかった。

種々のカラムについて検討の結果、Discovery HS-C 18 column(3µm, 4.6 mm × 150 mm, SIGMA-ALDRICH)にて分離を試みたところ対称性のある良好な分離となったため、本カラムを選択することとした。

移動相は 25 mM リン酸緩衝液(pH 4.6)/メタノール/アセトニトリル(65 : 20 : 15, v/v/v)にて検討を行い、リン酸緩衝液の pH を 2.5 に変更し分離を試みたが、夾雑物ピークが TPM の保持時間に出現した。そのため、移動相の各比率を変更し検討した結果、25 mM リン酸緩衝液(pH 2.5)/メタノール/アセトニトリル(50 : 40 : 10, v/v/v)とすることで、夾雑物ピークと TPM の分離が可能であった。

ラベル化剤を用いた HPLC による TPM の測定法については、NBD-Cl を用いる方法¹⁴⁾や、FMOC-Cl を用いる方法^{15, 16)}などがすでに報告されている。しかしながら、いずれの測定法も血漿量として 1 mL 以上の多量の試料が必要であり、採血量の少ない小児における一般臨床では使用が困難であると考えられる。本研究において、血漿試料 0.1 mL と極めて少量の試料より TPM 濃度測定が可能であった。この結果は、同じ蛍光ラベル化剤である

NBD-Cl を使用した Bahrami らの報告¹⁴⁾の 1/10 量の血漿試料であった。また、TPM 測定法の定量下限値は Bahrami らの報告¹⁴⁾では 0.01µg/mL であるのに対して、本研究では 0.1µg/mL であった。しかしながら、Bahrami らの報告¹⁴⁾では C.V.が 18.2% 以内であったのに対し、本研究ではすべての測定値において C.V.が 9.25% 以内でありバラツキが少なかった。本研究において、バラツキが少なかった要因として、Bahrami らの報告¹⁴⁾では血漿試料に対して除タンパクと pH 調整を行っていないが、本研究では除タンパク処理と pH 調整に 6% 過塩素酸を用いることにより、タンパク結合率 15~41% である TPM の血漿タンパクとの結合による影響を減らせたこと、また、採血後 pH 変動がocこりうる血漿試料に対し、pKa が 8.7 の TPM の抽出を酸性領域で安定させたこと、NBD-Cl による誘導体化反応を移動相の組成と近い水性溶媒のみで行うことにより溶媒の蒸発を防ぎ、直接 HPLC に注入する方法でテーリングを防いだこと、Bahrami らの報告¹⁴⁾ではスルホンアミドを有する TPM に対して、第一アミノ基と第二アミノ基を有するアムロジピンを I.S.に選定したのに対して、本研究では TPM と同様、スルホンアミドを有する I.S.を選定し、NBD-Cl に対する反応性を可能な限り TPM と同一に行ったことが影響していると考えられる。さらに、LC/MS 測定値との比較を行い同等の真度が得られた点、および、本研究で得られた TPM 内服患者の血漿 TPM 濃度が 0.39~10.1µg/mL の範囲内であることを考慮すると本測定法で十分モニタリング可能であると考えられる。

特異性試験において、TPM と同様に、スルホンアミ

ドを有する ZNS のピークが約 8.2 分に検出されたが、他の薬剤に関しては、測定開始 60 分後においてもピークの検出が認められず、TPM の定量に影響を与えなかった。この結果については、ZNS 以外の薬剤が酸性条件下ジクロロメタンにおいて抽出されなかったため、または NBD-Cl のラベル化において反応しなかったためであると推察される。利尿薬の多くは、スルホンアミドを有しているため本測定法による TPM の定量に影響を与える可能性が示唆される。本研究においてメチクランにて特異性試験を行ったところ、クロマトグラム上では影響は認められなかった。メチクラン以外の利尿薬については隣接基にハロゲンが置換されており、反応性が低下することが予想される。また、小児は電解質のバランスが崩れやすいことから利尿薬の投与が慎重投与で避けられているため、小児てんかん患者における TPM と利尿薬が併用される可能性は低いと考えられる。本研究においても、測定した 46 検体での利尿薬の併用は 1 例もなかった。しかしながら、NBD-Cl の反応性からアミノ基を有する薬剤、または、その代謝物への影響については否定できないことから、その測定にあたり併用薬については注意が必要であると考えられる。

以上のことから、本研究における蛍光ラベル化剤 NBD-Cl を用いた HPLC による血漿中 TPM 濃度測定は、微量の患者血漿試料で測定が可能であり、かつ、薬物血中濃度モニタリングへ応用可能な精度であると考えられる。TPM は、海外では小児での有用性が示されていることから、日本でも小児において、その重要性が増すと考えられる。小児での使用については、クリアランスが高い乳幼児における用法用量の決定が今後の重要な課題の一つであると考えられる。本研究で得られた成果は、今後の TPM の薬物血中濃度モニタリングに有用な知見を与えるものと期待される。

謝辞 本研究は、平成 21 年度院内臨床研究(A 9)の援助によるものである。

引用文献

- 1) トピナ®錠添付文書，協和発酵キリン株式会社，2010 年 2 月改訂。
- 2) K. A. Lyseng-Williamson, L. P. Yang, Topiramate: a review of its use in the treatment of epilepsy, *Drugs*, **67**, 2231 2256 (2007).
- 3) S. Hamano, T. Oritsu, M. Minamitani, M. Tanaka, S. Yoshinari, K. Kikuchi, R. Matsuura, Usefulness of topiramate for childhood intractable epilepsy: comparing by seizure type, *J. Jpn. Epil. Soc.*, **27**, 3 11 (2009).
- 4) A. R. Ferari, R. Guerrini, G. Gatti, M. G. Alessandri, P. Bonanni, E. Perucca, Influence of dosage, age, and co-medication on plasma topiramate concentrations in children and adults with severe epilepsy and preliminary observations on correlations with clinical response, *Ther. Drug Monit.*, **25**, 700 708 (2003).
- 5) D. Battino, D. Croci, A. Rossini, S. Messina, D. Mamoli, E. Perucca, Topiramate pharmacokinetics in children and adults with epilepsy: a case-matched comparison based on therapeutic drug monitoring data, *Clin. Pharmacokinet.*, **44**, 407 416 (2005).
- 6) S. I. Johannessen, T. Tomson, Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed?, *Clin. Pharmacokinet.*, **45**, 1061 1075 (2006).
- 7) M. G. Dahlin, I. K. Ohman, Age and antiepileptic drugs influence topiramate plasma levels in children, *Pediatr. Neurol.*, **4**, 248 253 (2004).
- 8) J. Adin, M. C. Gomez, Y. Blanco, J. L. Herranz, J. A. Armijo, Topiramate serum concentration-to-dose ratio: influence of age and concomitant antiepileptic drugs and monitoring implications, *Ther. Drug Monit.*, **26**, 251 257 (2004).
- 9) W. E. Rosenfeld, S. Liao, L. D. Kramer, G. Anderson, M. Palmer, R. H. Levy, R. K. Nayak, Comparison of the steady-state pharmacokinetics of topiramate and valproate in patients with epilepsy during monotherapy and concomitant therapy, *Epilepsia*, **38**, 324 333 (1997).
- 10) M. Bialer, D. R. Dose, B. Murthy, C. Curtin, S. Wang, R. E. Twyman, S. Schwabe, Pharmacokinetic interactions of topiramate, *Clin. Pharmacokinet.*, **43**, 763 780 (2004).
- 11) W. Froscher, K. R. Schier, M. Hoffmann, A. Meyer, T. W. May, B. Rambeck, J. Rosche, Topiramate: a prospective study on the relationship between concentration, dosage and adverse events in epileptic patients on combination therapy, *Epileptic Disord.*, **7**, 237 248 (2005).
- 12) 兼本浩祐，海外データに基づく topiramate の基礎と臨床，*臨床精神薬理*，**10**，1923 1935 (2007).
- 13) D. J. Berry, P. N. Patsalos, Comparison of topiramate concentrations in plasma and serum by fluorescence polarization immunoassay, *Ther. Drug Monit.*, **22**, 460 464 (2000).
- 14) G. Bahrami, B. Mohammadi, A novel high sensitivity HPLC assay for topiramate, using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as pre-column fluorescence derivatizing agent, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **850**, 400 404 (2007).
- 15) G. Bahrami, S. Mirzaeei, A. Kiani, Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. B.*, **813**, 175 180 (2004).
- 16) G. Bahrami, S. Mirzaeei, B. Mohammadi, A. Kiani, High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **822**, 322 325 (2005).
- 17) H. J. Klimisch, L. Stadler, Mikroquantitative bestimmung von aliphatischen aminen mit 7-chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, *J. Chromatogr. A.*, **90**, 141 148 (1974).