高速液体クロマトグラフィーを用いた血漿中 L-DOPA の定量^{*1}水谷義勝, 石津谷修, 岡田良樹^{*2}, 小川道子^{*3}静岡労災病院薬剤部^{*2}同院神経内科^{*3}Determination of L-DOPA in Plasma by High Performance Liquid Chromatography^{*1}YOSHIKATSU MIZUTANI, OSAMU ISHIZUYA, YOSHIKI OKADA,^{*2}MICHICO OGAWA^{*3}Pharmacy, Shizuoka Rosai Hospital^{*2}Department of Neurology, Shizuoka Rosai Hospital^{*3}

(Received December 28, 1983)

The L-DOPA levels in plasma were determined by high performance liquid chromatography. Separation of L-DOPA from plasma was achieved by alumina adsorption using tris-HCl buffer (pH 8.6) without deproteinization. Adsorption of L-DOPA onto alumina showed liquid-solid equilibria with constant rates at both adsorption and extraction steps. For this reason, the recovery of L-DOPA from plasma varied with alumina amounts, acidity and volume of the eluate used. Maximal recovery (89%) was achieved when 50 mg of alumina and 1 ml of eluate of 1 M AcOH were used. Norepinephrine and epinephrine, as well as L-DOPA, were assayed by this method, and linear calibration curves were obtained as little as 2000 pg/ml for norepinephrine and epinephrine, and 5 µg/ml for L-DOPA. Reproducibility was demonstrated by a day-to-day coefficient of variation based on the change of assay value for standard plasma sample containing 1 µg/ml of L-DOPA. The day-to-day coefficient of variation was less than 4%, and the within-run coefficient of variation was less than 3%.

The interference by other probable catechols in plasma such as dopamine and carbidopa which is often administered with L-DOPA were not found. The method involving alumina extraction established in this study has general applicability in very accurately determining L-DOPA, norepinephrine and epinephrine in plasma.

Keywords—high performance liquid chromatography; plasma; L-DOPA; norepinephrine; epinephrine; catecholamine; alumina adsorption; tris-HCl buffer; liquid-solid equilibria

緒 言

L-DOPA は抗パーキンソン氏病薬として広く用いられているが、経口投与ではバイオアベイラビリティが低く、投与量、個人差による血中レベルのバラツキが大きい。¹⁻⁴⁾ L-DOPA の血中レベルと臨床像との関係につい

ては定説はなく、ある程度の相関を見出した報告⁶⁻⁸⁾もあるが、長期投与による反応性の減弱⁹⁾および副作用の発現など未解明な面が残されている。

今回、著者らは L-DOPA の血中レベルと臨床像との相関をより詳細に研究する目的のため、まず血漿中の L-DOPA 濃度測定法を確立することを試みた。測定機器としては高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を用いたが、二、三の興味ある知見を得たので報告する。

^{*1} 本報の一部は日本薬学会 103 年会 (東京 1983 年) において発表。

^{*2,3} 浜松市将監町 25; 25, Shogen-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka, 430 Japan

実験の部

1. 試薬および試料

標準物質としての L-DOPA, ノルエピネフリン(NE), エピネフリン(E), およびその他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。標準血漿は新鮮凍結血漿(血液センター)をプールしたものを, また前処理用のアルミナは W 200 neutral (INC) を Anton¹⁰⁾ の方法により活性化したものを用いた。

2. HPLC 条件

装置: 高速液体クロマトグラフ 635

検出器: 多波長 UV モニター 635-0900, 分光蛍光光度計 650-0010, トリヒドロキシインドール (THI) 用反応システム 635

カラム: 3013-C (弱酸性陽イオン交換カラム, 4.0φ × 150mm)

以上の装置はすべて日立製作所製である。

カラム温度: 45°C

移動相: 0.1 M KH_2PO_4 -0.075% H_3PO_4 (pH 3.0)

流速: 0.6ml/min

3. 試料溶液の調整

ミニカラム (藤沢メディカルサプライ, CPK用) 中に血漿 1ml, 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 50μl, 0.5M 酢酸 150μl, 1.5M トリス-塩酸緩衝液 (2% EDTA-2Na, pH 8.6) 1ml, およびアルミナ 50mg を加え, 密栓をして 10 分間はげしく振とうした後, アルミナを蒸留水 20ml で洗浄, 戸越し, 2 分間遠心脱水 (2500 rpm) した。次にフィルター部にキャップをし, 0.5~1M 酢酸を 0.2~1ml 加え 20 分間ボルテックス・ミキサーで攪拌後, 抽出液 50μl を HPLC に注入した。なお, 以上の操作は室温下で行った。

結果および考察

1. HPLC 条件の検討

0.1M KH_2PO_4 にリン酸を加え移動相の pH を調整し, 標準物質 (L-DOPA, NE, E) のキャパシティ比 (k') に与える影響を調べた (Fig. 1)。この結果から移動相の pH を 3.0 (0.1M KH_2PO_4 -0.075% H_3PO_4) に設定した。L-DOPA, NE, E をそれぞれ 0.25μg 含有する 0.5 M 酢酸 50μl を HPLC に注入して得られたクロマトグラム (UV 280 nm) では各ピークの分離が良好であった (Fig. 2)。

2. 標準物質の検量線および再現性

L-DOPA を 0.5M 酢酸と溶解し, その 50 μl 中にそれぞれ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.05, 0.00125 μg の L-DOPA を含む試料を HPLC に注入した。試料の量とピ

Fig. 1. Effect of pH of Mobil Phase on k' Value of L-DOPA (○—○), Nor-epinephrine (△—△), Epinephrine (□—□) and AcOH (×—×) column: 3013-C, flow rate: 0.6ml/min, detect.: 280nm, temp.: 45°C

Fig. 2. Chromatogram of Catecholamines 1: AcOH 2: L-DOPA 3: Norepinephrine 4: Epinephrine

HPLC conditions were the same as those in Fig. 1. mobil phase: 0.1M KH_2PO_4 -0.075% H_3PO_4 (pH 3.0)

ークの高さとの間には, UV 法 (280 nm), 蛍光法 (Ex 280 nm, Em 320 nm), THI 法 (Ex 410 nm, Em 510 nm) の各検出法でそれぞれ良好な直線性が得られた。UV 法の場合, 回帰式は $y = 0.0236x - 0.00001$, 相関係

数 $r=0.999$ であった。Yはピークの吸光度、Xは注入量 (μg) を示す。定量は絶対検量線法を用いた。また $N=10$ における $0.5\mu\text{g}$ 試量のピークの高さの変動係数は 1.8% であった。

3. 血漿の前処理法

NE および E を除蛋白せずに測定した方法¹¹⁾ に準じ、トリス-塩酸緩衝液を用いて L-DOPA をアルミナに吸着させる処理法を検討した。

1) アルミナへの吸着

濃度既知の L-DOPA を含む蒸留水 1 ml を検体としてアルミナによる吸着処理を行った後、水溶液の一部を直接 HPLC に注入して残存 L-DOPA 濃度を測定した (Fig. 3)。この結果からアルミナに対する L-DOPA の吸着等温線は液-固平衡型の直線となり、吸着係数 (アルミナ 1 mg 中の L-DOPA 量) / (水溶液 1 ml 中の L-DOPA 量) は 0.9 であった。なお、吸着試験はすべて室温で行った。

2) アルミナからの抽出

L-DOPA を吸着したアルミナからの抽出操作では、回収率が抽出液量に依存する傾向がみられた。そこで L-DOPA を含まない蒸留水検体を処理したアルミナに濃度既知の L-DOPA を含んだ 0.5 M 酢酸を加え、室温下 20 分間攪拌後、L-DOPA の残存濃度を測定して抽出時におけるアルミナへの再吸着を検討した。抽出液 (0.5 M 酢酸) が 0.2 ml の場合、アルミナ量の増加に伴い吸着は増加した (Fig. 4)。しかし一定量のアルミナ (50

Fig. 3. Relationship between Alumina Amounts and Residual Concentration of L-DOPA in Aqueous Solution (pH 8.5) at Adsorption Step

Initial concentration of L-DOPA $0.5\mu\text{g/ml}$ (○—○), $1\mu\text{g/ml}$ (△—△) and $1.5\mu\text{g/ml}$ (□—□).

Fig. 4. Relationship between Alumina Amounts and Residual Concentration of L-DOPA 0.2 ml of 0.5 M AcOH at Extraction Step Initial concentration of L-DOPA $2\mu\text{g/ml}$ (○—○), $4\mu\text{g/ml}$ (△—△) and $6\mu\text{g/ml}$ (□—□).

Fig. 5. Relationship between Volume of Eluate (0.5 M AcOH) and Residual Concentration of L-DOPA at Extraction Step

Initial concentration of L-DOPA $2\mu\text{g/ml}$ (○—○), $4\mu\text{g/ml}$ (△—△) and $6\mu\text{g/ml}$ (□—□), the amounts of alumina were 50 mg .

mg) に対しては抽出液量の増加に伴い吸着は減少した (Fig. 5)。これらの結果より抽出時における液-固平衡型の再吸着現象 (吸着係数 0.004) が示唆された。

3) 標準血漿からの L-DOPA の回収率

前処理操作において、標準血漿と蒸留水との間に回収率の差はなく、血漿の処理中にも液-固平衡型の吸着が保持されることが推察された。回収率 Y ($Y=1$ で 100%) は次式で表わすことができた。

$$Y = \frac{K_a \cdot X \cdot V_e}{(K_a \cdot X + V_a)(K_e \cdot X + V_e)}$$

ここで K_a , K_e は吸着および抽出時における吸着係

Table 1. K_a and K_e of Alumina for L-DOPA

Products	Mesh	$K_a^*(\text{L/g})$	$K_e^{**}(\text{L/g})$
Alumina W-200 neutral (ICN)	200	0.9	0.004
Alumina for Catecholamine (Wako)	~100 (40%) 100~145 (40%) 145~200 (20%)	0.6	0.003

* pH 8.5

** 0.5M-AcOH

数 (L/g), V_a , V_e は吸着試料および抽出液の容量 (ml), X はアルミナの量 (mg) を示す. $1.0 \leq V_a \leq 3.0$, $0.2 \leq V_e \leq 1.0$, $50 \leq X \leq 100$ の各条件下において実測の回収率は Y 式の値と一致し, 検量線は血漿中濃度として $5 \mu\text{g/ml}$ 以下で原点を通る直線となった.

1M 酢酸で抽出を行うと K_e が 0.0011 と低値を示し回収率は向上したが, クロマトグラム上で NE と E の分離能が低下した.

4) アルミナと L-DOPA の吸着係数

アルミナ W 200 neutral (ICN) と活性アルミナ (カテコールアミン測定用) (和光純薬) の 2 種類のアルミナについて, K_a , K_e を測定した (Table 1). 両者間にみられる差異は主に単位重量あたりの表面積に依存しており吸着特性は同じと考えられた.

4. 測定精度

前処理にアルミナ 50mg を用いて L-DOPA を吸着させ, 0.5M 酢酸 0.2ml で抽出した場合と 1M 酢酸 1ml で抽出した場合で, 回収率はそれぞれ 47% と 89% を示した. L-DOPA $1 \mu\text{g}$ を含有する 1ml の血漿を 7 日毎に 16 週間測定した結果, 両抽出法による測定値はともに変動係数が within-run で 3% 以下, day-to-day で 4% 以下と良好であった.

5. L-DOPA, NE, E の同時測定

HPLC の検出器に THI システムを用いることにより血漿中の NE, E を L-DOPA と同時に測定することが可能であった. 前処理には 50mg のアルミナを用い 0.5M 酢酸 0.2ml で抽出を行った. 血漿中濃度として L-DOPA が $5 \mu\text{g/ml}$, NE と E が 2000pg/ml 以下ではそれぞれ回収率が 47%, 80%, 80% と一定であり検量線は直線性を示した. また, 検出限界 ($S/N=2$) は血漿中濃度としてそれぞれ 1ng/ml , 40pg/ml , 20pg/ml に相当した.

6. 測定妨害物質

血漿およびアルミナからの夾雑物はクロマトグラム上, $k' < 1.5$ に現れた. L-DOPA と併用されることの多い carbidopa および遊離 dopamine は同じく $k' > 4$ に

Fig. 6. Plasma Concentration Curve of L-DOPA after Oral Administration (200mg tablet) to Normal Subject

現れた. このことより本法はこれらの構造類似物質により妨害をうけないことが確かめられた.

7. 健康成人におけるモニタリング

健康成人男子 (37歳) 1 名に対して市販の L-DOPA 200mg 錠を空腹時経口投与し, 血漿中濃度を測定した (Fig. 6). 投与後 2 時間で $0.17 \mu\text{g/ml}$ のピークがみられ, 4 時間後にはほとんど消失しており大本らの報告¹²⁾と同様の結果を得た.

結 論

今回報告した血漿中 L-DOPA 濃度測定法は前処理に除蛋白操作を要せず, 回収率, 測定精度についても満足な値が得られた. また, 本法の前処理法は多くのカテコール化合物の血漿中濃度測定に応用が可能であると考えられる.

謝辞 本研究に際し, carbidopa 標準品を提供された三共株式会社に深謝いたします.

文 献

- 1) D.B. Calne: Clin. Pharm. Therp., 11, 789 (1970).
- 2) T.J. Crow, I.G. Grove-White: Brit. J. Pharmacol., 43, 464 (1971).
- 3) G. Curzon, B.D. Kantamanemi, J. Trigwell: Clin. Chim. Acta, 37, 335 (1972).
- 4) T.A. Hare, B.L. Beasley: Chim. Acta., 45, 273 (1973).
- 5) K. Imai, M. Sugiura: Chem. Pharm. Bull., 20, 759 (1972).
- 6) I. Shoulson, G.A. Glaubiger, T.N. Chase: Neurology, 25, 1144 (1975).
- 7) R.D. Sweet, F.H. McDowell: Neurology, 24, 953 (1974).

- 8) E.S. Tolsa, W.E. Martin, H.P. Cohen, R. L. Jacobson: *Neurology*, **25**, 177 (1975).
- 9) C.D. Marsden, J.D. Parkes: *Lancet*, **1**, 345 (1977).
- 10) A.H. Anton, D.F. Sayre: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **138**, 360 (1962).
- 11) P. Hjerdah, M. Daleskog, T. Kahan: *Life Science*, **25**, 131 (1979).
- 12) 大本堯史, 難波真平, 岸川秀実: *基礎と臨床*, **10**, 507 (1979).

等張で200Cal/L補給できる維持液

アセテート維持液

アクチット[®]注

Actit Inj. (点滴静注用)

- 塩基源としての酢酸ナトリウムは、肝よりも筋肉およびその他の末梢組織において代謝され、かつ、乳酸ナトリウムとは異なる代謝経路により速やかに代謝され塩基源として有効に作用します。
- マルトースはインスリン依存性が少く、非経口投与の場合、糖尿病及び糖尿病状態時(外科的糖尿病)にもよく利用され、従来の5W/V%糖加維持液と同様に1ℓ当り200Calの熱量補給が可能です。

*用法・用量、使用上の注意等は製品添付文書をご参照下さい。

健保適用

あしたの健康を考える
日研化学株式会社
本社 東京都中央区築地5-4-14