[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
一般論文
19(1) 46-52 (1993)

高速液体クロマトグラフィーによる血清中 Gliclazide 濃度測定法の開発と 糖尿病患者および肝硬変合併糖尿病患者における体内動態

町支臣成^{†1}, 寺澤千佳子^{†1}, 大田博子^{†1}, 岸田充廣^{†1}, 堀本重紀^{†1}, 高科成良^{†2}
広島県厚生農業組合連合会広島総合病院薬剤部^{†1}, 同内科^{†2}

Development of the Measurement of Gliclazide in Serum by High-performance Liquid Chromatography Method and its Pharmacokinetics in Non-Insulin Dependent Diabetic Mellitus (NIDDM) Patients and NIDDM Patients with Liver Cirrhosis

TOMINARI CHOSHI^{†1}, CHIKAKO TERAZAWA^{†1}, HIROKO OHTA^{†1},
MITSUHIRO KISHIDA^{†1}, SHIGENORI HORIMOTO^{†1}, SEIRYOU TAKASHINA^{†2}
Department of Pharmacy^{†1} and Department of Medicine^{†2},
Koseiren Hiroshima General Hospital

(Received May 6, 1992)
(Accepted October 7, 1992)

Gliclazide is a hypoglycemic drug that highly binds to plasma proteins, but it is little reported about pharmacokinetics of free gliclazide which has a hypoglycemic action. In this study, we had an aim of establishing the HPLC method to measure free gliclazide and clarifying the effect of some diseases on it. Calibration curves were linear in the range of 0.2–10 µg/ml ($r = 0.999$). The limit of determination was 0.2 µg/ml (C.V. 2.8%). Binding of gliclazide was not influenced by FFA under conditions employed and was dependent on bovin serum albumin (BSA) concentrations *in vitro*. In clinical, area under the curve (AUC) of free gliclazide of NIDDM with liver cirrhosis ($n=3$) was twice that of NIDDM without complication ($n=8$). (2.7 ± 0.2 vs 1.3 ± 0.2 µg·hr/ml)

Keywords—gliclazide; free gliclazide; HPLC; pharmacokinetics; protein binding; diabetic mellitus patients

はじめに

経口血糖降下剤の蛋白結合率は、一般に非常に高いことが知られている。その多くはアルブミンと結合し、結合していない遊離型の薬物のみが血糖降下作用を示すとされている。しかし、遊離型

の体内動態に関する報告はほとんどされていない¹⁾。また、経口血糖降下剤の一つである gliclazide の血中濃度測定については、ラジオイムノアッセイ^{2,3)}、ガスクロマトグラフィー⁴⁾および高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC)^{1,5-8)} による方法が報告されているが、測定時試料の調製の繁雑さのため、臨床上簡便な方法とはいえない。そこで、今回、血中 gliclazide 濃度の

^{†1,2} 広島県廿日市市地御前 1-3-3; 1-3-3, Jigozen,
Hatsukaichi-shi, Hiroshima, 738 Japan

HPLC 測定法を確立し, gliclazide の蛋白結合および蛋白結合に対する遊離脂肪酸の影響などの基礎的検討を行った. 更に, 肝硬変患者の gliclazide の体内動態に関しても若干の知見を得たので報告する.

実験の部

1. 試料および試薬

Gliclazide は大日本製薬, glibenclamide (内部標準) は山之内製薬より提供を受けた. 標準血清は, 臨床化学分析用管理血清 (第一化学薬品) を用いた. Gliclazide の $596\mu\text{g/ml}$ のメタノール溶液, および glibenclamide の $168\mu\text{g/ml}$ のメタノール溶液を標準液として調製した. 測定 of 都度それぞれの標準液をアセトニトリルで希釈し標準試料とした. その他の試薬はナカライの試薬特級品または液体クロマトグラフィー用試薬を使用した.

2. Gliclazide の抽出条件の検討

HPLC 用試料の調製の際, 血清からの夾雑物の混入を最小限に抑え, 目的物を効率よく抽出することが好ましい. 著者らは, 以前クロナゼパムの HPLC 測定法⁹⁾ を確立する際, 酢酸エチル/ヘキサン混液による抽出で, 夾雑物の混入を少なくできることを見出している. そこで, この混合溶媒の比率を変え抽出効率の検討をし, 酢酸エチル:ヘキサン=3:7の割合が夾雑物の混入を抑え良好であった.

更に, 血清中の薬物の抽出には, 血清の pH が大きく影響する⁵⁾. そこで, 各リン酸緩衝液の pH を変え, gliclazide と内部標準との抽出効率の最もよい pH を検討し, 図 1 に示すように, 酸性側での抽出率が良好であったが酸性が強くなると夾雑物も多く抽出されたため, pH 6 が最適であることがわかった.

3. 抽出操作

図 2 に示すように, $250\mu\text{l}$ のリン酸緩衝液 (pH 6) に, $250\mu\text{l}$ の血清と内部標準 $30\mu\text{l}$ と 4ml の有機溶媒 (酢酸エチル:ヘキサン=3:7) を加え振とう (5分) 後, 遠心分離 (1700g , 5分) した. 3.6ml の有機層を取り減圧下 40°C で留去

図 1. Gliclazide と内部標準物質のリン酸緩衝液の pH による抽出率
●—●; Gliclazide
○—○; 内部標準物質

図 2. Gliclazide 濃度測定における抽出方法

し, 残留物を $120\mu\text{l}$ のアセトニトリルに溶解後, フィルター (CHROMATODISC 4P) でろ過し, HPLC 測定用試料とした.

遊離型 gliclazide の分離は, 血清 1ml を遠心性限外ろ過法¹⁰⁾ (MPS-3, アミコン社) で遠心分離 (2200g , 30分) し, 同様の操作で試料の調製を行った. また, 内部標準は, gliclazide の場合 7.5倍に希釈し, 遊離型 gliclazide の場合 30倍に希釈し, それぞれ $30\mu\text{l}$ ずつ添加した.

4. 測定装置および分析条件

測定装置および分析条件は図 3 に示す. 定量計算はピーク高さに基づく内部標準法で行った.

5. 検量線の作成

検量線は, gliclazide の濃度範囲を $0.2\text{--}10\mu\text{g/l}$

使用機器 (ウオータース社)	510型ポンプ 710B型全自動サンプルプロセッサー 481型超高感度可視紫外検出器 730型データモジュール
カラム	Nova-Pak C ₁₈ cartridge (5mm×10mm, (ウオータース社))
溶媒	0.05Mリン酸二水素カリウム/アセトニ トリル=1/1
流速	2.5ml/min
UV波長	229nm
注入量	総濃度: 10μl, 遊離型濃度: 40μl
内部標準	Glibenclamide

図3. HPLC法における gliclazide の測定条件とクロマトグラム

ml とし、管理血清にそれぞれ添加した各濃度を3回測定後、最小二乗法により相関式および相関係数を算出した。

6. 回収率および測定精度の検討

試料は、管理血清に 0.2, 2.7, 10.9μg/ml になるように gliclazide 標準液を添加し作成した。同時再現性、日差再現性の検討は、各試料を日内に5回および1日1回4日間測定して行った。回収率は添加した既知の濃度に対する測定濃度比のパーセントとして求めた。

7. Gliclazide に対する諸種蛋白質の影響

FFA-Free bovine serum albumin (以下BSA) 1.5~5.5g/dl と α₁-acid glycoprotein (以下AAG) 0~5g/dl の各濃度における gliclazide の蛋白結合に対する影響を検討した。なお、各濃度の BSA および AAG それぞれを正確に秤量し生理食塩水で溶解し調製した。また、gliclazide は 2.7μg/ml の濃度になるように gliclazide 標準液を添加した。

8. Gliclazide とアルブミンの結合に対する遊離脂肪酸の影響

薬物がアルブミンと結合する場合、遊離脂肪酸が競合的に拮抗する場合があることが知られてい

る¹¹⁾。そこで、0.5~3mEq/l のオレイン酸を添加し、各濃度の BSA (1.5, 3.0, 4.5g/dl) と gliclazide の結合に及ぼす影響について検討した。gliclazide は、2.7μg/ml の濃度になるように gliclazide 標準液を添加した。

9. 肝硬変合併の有無による gliclazide の体内動態の解析

対象：当院入院中の合併症のない NIDDM 患者13名（男性5名、女性8名、平均年齢57.7±11.9歳、平均肥満度8.8±5.5%）（以下コントロール群）と肝硬変を合併している NIDDM 患者3名（男性3名、平均年齢54.7±6.0歳、平均肥満度3.6±1.1%）で gliclazide 投与開始から2週間経過している患者。

方法：gliclazide 40mg を朝食前30分に投与し、経時的に11回採血を行い gliclazide の総濃度および遊離型濃度を測定した。体内動態の解析は、山岡らの1-compartment model 式¹²⁾を使用した。統計処理は、t-検定で行い、有意水準は $p < 0.01$ で行った。

10. 血清アルブミン濃度と血中 gliclazide 濃度との関連

対象：合併症のない NIDDM 患者24名（男性11名、女性13名、平均年齢57.8±11.2歳、平均肥満度7.0±5.1%）（以下コントロール群）、ミクロアルブミン尿陽性患者11名（男性6名、女性5名、平均年齢65.6±10.6歳、平均肥満度9.6±5.5%）、肝硬変を合併している NIDDM 患者8名（男性8名、平均年齢55.4±4.9歳、平均肥満度6.2±4.5%）。

方法：gliclazide 1日1~2回20~80mg を投与している当院入院患者の早朝空腹時の遊離型 gliclazide 濃度を測定し、血清アルブミンとの相関関係をみた。統計処理は分散分析により行った。

結果と考察

1. Gliclazide の検量線

検量線のグラフを図4に示した。血中 gliclazide 濃度は、0.2~10μg/ml 間の濃度範囲で直線性（相関係数： $r = 0.9996$ ）が得られた。

2. 回収率および測定精度

表1に日内変動, 日間変動および回収率を示した。日内変動は3%以下, 日間変動は5%以下と十分な精度が得られた。また, 回収率は, 94~100%の範囲内であった。

また, 遊離型 gliclazide を測定する場合には, 血清 1 ml を使用し測定試料を調製することで, 測定は十分可能であった。以上の結果より, 血中 gliclazide 濃度は迅速かつ正確に測定可能であった。

図 4. 内部標準法における gliclazide の検量線

表 1. Gliclazide の同時再現性, 日差再現性および回収率

濃度 (μg/ml)	同時再現性* ¹		日差再現性* ²	
	C.V.(%)* ³	回収率(%)* ⁴	C.V.(%)* ³	回収率(%)* ⁴
0.2	2.9	95.5	4.8	94.2
2.7	0.6	100.1	0.5	99.9
10.9	2.5	95.9	2.7	96.9

*1: n=5, *2: n=4, *3: C.V.= Coefficient of Variation

*4: 回収率 = $\frac{\text{測定濃度}}{\text{添加濃度}} \times 100$

た。

3. Gliclazide と諸種蛋白質との結合

図5は, *in vitro* における BSA (1.5~5.5g/dl) あるいは AAG (0~5g/dl) の濃度変化による遊離型 gliclazide の結合状態に及ぼす影響について検討した。その結果, gliclazide は主にアルブミンと蛋白結合し, AAG とはわずかではあるが結合していた。更に, *in vitro* の実験から, 正常値以下のアルブミン濃度範囲 (3.5g/dl 以下) では gliclazide のアルブミンへの結合率はアルブミン濃度に比例してほぼ直線的に上昇するが, 正常値付近のアルブミン濃度範囲 (3.5~5g/dl) では, アルブミン濃度の変動に関係なく遊離型 gliclazide の割合は一定であった。

4. 遊離脂肪酸の gliclazide とアルブミンの結合への影響

図6に示したように, 各アルブミン濃度においてもオレイン酸は gliclazide の結合に何ら影響を与えなかった。また, 同様の実験をステアリン酸, パルミチン酸についても行ったが, 同様の結

図 5. Gliclazide の蛋白結合に対する諸種蛋白質の濃度による影響

果であった。その他ビリルビンも gliclazide の結合には関与していなかった。

5. 肝硬変合併の有無と遊離型 gliclazide 濃度への影響

表2は、コントロール群と肝硬変合併患者群の

図6. Gliclazide の蛋白結合に対するオレイン酸の影響

BSA: FFA-Free bovine serum albumin

表2. Gliclazide 40mg 服用中の NIDDM 患者と肝硬変を有する NIDDM 患者の Pharmacokinetic Parameter

	n	k _a	k _e	t _{1/2}	T max	C max	AUC ₀₋₁₂ ^h	AUC ₀₋₂₄ ^h
コントロール群	13	3.38±2.22	0.078±0.014	9.16±1.81	2.33±2.54	3.07±0.99	36.73±10.44	1.36±0.51
肝硬変合併患者群	3	2.72±2.20	0.055±0.007*	12.76±1.67**	1.92±0.99	3.21±0.41	46.13±4.46	3.20±0.88**

Mean±SD * P<0.05 ** P<0.01

図7. 肝硬変合併の有無による gliclazide の総濃度および遊離型濃度の血中濃度曲線

- 合併症のない NIDDM 患者群 (n=3)
- ▲……▲ 肝硬変を合併している NIDDM 患者群 (n=13)

それぞれのパラメーターを 1-compartment model 式により算出した結果を示した。コントロール群の各パラメータは、正常人のパラメータ¹³⁾と一致しており差のないことがわかった。ところが、図7に示したように、肝硬変合併の有無により gliclazide の血中濃度下曲線 (AUC) を比較すると、gliclazide の総濃度では、 $36.73\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ に対し $46.13\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ と有意差はないが、遊離型 gliclazide の AUC は、肝硬変を合併している NIDDM で倍増していた (1.36 vs $3.20\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)。このことより、肝硬変合併患者では血糖降下作用が増強される可能性が示唆された。

6. 遊離型 gliclazide と血清アルブミンとの相関

図8に示したように、肝硬変およびマイクロアルブミン尿の有無にかかわらず負の相関を示した。相関式は、 $Y = -1.19X + 8.73$ 、相関係数 -0.631 、

図 8. 血清アルブミン濃度と遊離型 gliclazide 濃度の相関

- 合併症のない NIDDM 患者群 (n=24)
- ミクロアルブミン尿陽性 NIDDM 患者 (n=11)
- △ 肝硬変を合併している NIDDM 患者 (n=8)

危険率 $p < 0.0001$ であった。また、遊離型 gliclazide の割合は、初回および連続投与あるいは投与量による影響を受けず、更に患者個々の 1 日の血糖値の変動があるにもかかわらず一定であった。

更に、ミクロアルブミン尿陽性患者群、肝硬変合併患者群、コントロール群、3 群間の血清アルブミン濃度および遊離型 gliclazide の割合の比較を行った (図 9)。ミクロアルブミン尿陽性群 (4.067 ± 0.2494 , 3.525 ± 0.3820) とコントロール群 (4.250 ± 0.2550 , 3.550 ± 0.8944) 間では、血清アルブミン濃度および遊離型 gliclazide の割合に有意差はみられなかった。肝硬変合併群 (3.533 ± 0.4346 , 5.210 ± 0.3440) はコントロール群に比しアルブミン濃度が有意に減少し、遊離型 gliclazide の割合は上昇していた。

以上より遊離型 gliclazide の割合が増加する要因の一つとして、血清アルブミン濃度が減少していたことが考えられる。したがって、血清アルブミンが減少する病態では、遊離型 gliclazide が増加し、血糖降下作用が増強される可能性が示唆される。

結 語

HPLC 法を用い経口血糖降下剤である glicl-

図 9. 諸種疾患の有無による糖尿病患者の遊離型 gliclazide の割合および血清アルブミン濃度の比較

コントロール (合併症のない NIDDM 患者群, n=24), ミクロアルブミン尿陽性 (ミクロアルブミン尿陽性 NIDDM 患者群, n=11), 肝硬変 (肝硬変を合併している NIDDM 患者群, n=8)

azide の迅速、簡便、高感度な測定法を確立することができた。gliclazide の蛋白結合に関する基礎的検討においては遊離脂肪酸は何ら影響せず、正常値以下のアルブミン濃度では、gliclazide はアルブミンと濃度依存的に結合するが、正常値付近ではアルブミン濃度の変動に関係なく遊離型 gliclazide の割合が一定であるという結果を得た。肝硬変合併患者では総濃度は変化せず明らかに遊離型 gliclazide が増加しており、これはコントロール群に比し血清アルブミン濃度が有意に減少していたことが要因の一つとして考えられ、血清アルブミン濃度が減少する疾患¹⁴⁾では血糖降下作用が増強される可能性が示唆された。なお、本研究は第34回日本糖尿病学会年次学術集会において発表した。

引 用 文 献

- 1) 小林邦夫, 木村正子, 迫口孝文, 木谷裕子, 高嶋隼二, 三村幸一, 松岡 英, 木村行男, 臨床病理, 9, 895-901 (1981).
- 2) 梶沼 宏, 葛谷信貞, 市川勝之, 赤沼安夫, 小坂樹徳, 糖尿病, 25, 869-875 (1982).
- 3) 祝前みどり, 鈴木啓郷, 関根 豊, 前田忠男, 景本 昭, 橋本昌久, 日本薬学会第 100 年会講演要

- 旨集, 575 (1980).
- 4) 木村正子, 小林邦夫, 高嶋隼二, 井野隆弘, 秦満男, 松岡英, 金子滋夫, 木村行男, 臨床病理, 28, 63-66 (1980).
 - 5) M. Kimura, K. Kobayashi, M. Hata, A. Matsuo, H. Kitamura and Y. Kimura, *J. Chromatography*, 183, 467-473 (1980).
 - 6) Bruce G. Charles and Peter J. Ravenscroft, *Clin. Chem.*, 30, 1789-1791 (1984).
 - 7) H. Emilsson, S. Sjöberg, M. Svedner and I. Christenson, *J. Chromatography*, 383, 93-102 (1986).
 - 8) J. M. Poirier, M. Perez and G. Cheymol, *J. Chromatography*, 421, 223-226 (1987).
 - 9) 大田博子, 寺澤千佳子, 岸田充廣, 堀本重紀, 中畠千恵子, 岡本博文, 医薬ジャーナル, 24, 2484 (1988).
 - 10) 北澤式文, 上能伊公雄, 病院薬学, 15, 239-247 (1989).
 - 11) 新 弘一, 東医大誌, 45, 402-412 (1987).
 - 12) 山岡 清, 谷川原祐介, “マイコンによる薬物速度論入門”, 南江堂, 1988, pp. 159-178.
 - 13) K. Kobayashi, M. Kimura, T. Sakoguchi, Y. Kitani, M. Hata and A. Matsuo, *J. Pharm. Dyn.*, 4, 436-442 (1981).
 - 14) 長瀧重信, 三宅清兵衛, 赤沢昭一, 臨床と研究, 62, 2915 (1986).