

自動前処理装置を用いた高速液体クロマト グラフィー血中薬物濃度測定

高 橋 裕 明
森 山 弘 之
深 町 充
松 原 健 一
海 野 益 郎

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Drugs in Plasma by Automatic Sample Pretreatment Device

Hiroaki TAKAHASHI
Hiroyuki MORIYAMA
Makoto FUKAMACHI
Ken-ichi MATSUBARA
Masuo UMINO

Removal of proteins and enrichment of trace drugs in plasma have been accomplished on a specially designed protein-coated column (BSA-ODS). The drugs enriched in pretreatment column are introduced automatically into analytical column using a column switching device and total amounts of drugs, free and bound to plasma proteins, can be estimated with good recovery and precision. Drugs such as theophylline and lidocaine are successfully analyzed within 15 min including sampling time.

1. はじめに

薬物血中濃度モニタリング (Therapeutic Drug Monitoring: TDM) の目的は、さまざまな病態にある患者の治療効果の把握にあるが、薬物の治療濃度範囲が狭く、多量服用で重篤な副作用を有する薬物、あるいは、吸収の個人差が大きい薬物、または、患者の服薬状況の確認などにおいて測定意義が大きいといわれている^{1), 2)}。一方、新薬の開発においては血中濃度と薬効、毒性の関係や薬物速度論との関係を明らかにする上でも TDM は重要である。

その測定法としては、ガスクロマトグラフィー法、吸光度法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、免疫学的測定法などある³⁾ が、HPLC 法は操作が簡単でランニングコストが安いことからよく用いられる測定法の1つである。

HPLC による測定においては、酸、有機溶媒による除タンパク、限外ろ過膜を使った除タンパク、有機溶媒による抽出、およびディスパーザブルカラム (TOYOPAK ODS, SP など) を用いたクロマトグラフィー法による粗分画などの前処理が必要である。これらの操作はいずれも用手法であるため煩雑で時間のかかる場合があるばかりでなく、再現性にも乏しい。また、個人差あるいは操作中のバラツキを抑えるため前処理操作を含めた分析には内部標準法がとられるが、適切な内部標準物質の選択が難しいことが多い。

そこで我々は、特殊な前処理専用カラムとカラムスイッチングが自由にプログラミングができる前処理装置を使うことによって、血漿を直接カラムに注入するだけで除タンパクを含めた分析がオンラインでできる自動化法を開発した。

2. 実 験

2.1 試薬および装置

アセトニトリル, メタノールは液クロ用溶媒 (キシダ化学), 薬物は Sigma 製品を用いた。その他の試薬は和光純薬特級を用いた。

分析用装置としてはすべて CCP & 8000 シリーズ製品 (東洋曹達工業) を用いた。ポンプ; CCPM, 自動試料注入装置; AS-48, 自動前処理装置; PT-8000, 検出器; UV-8000, 記録計; FBR-2, データ処理装置; Chromatocorder 11.

前処理カラムとして TSKprecolumn BSA-ODS, TSKprecolumn SW (4.6 mm I.D.×35 mm), 分析カラムとして TSKgel ODS-120T, ODS-80T_M (4.6 mm I.D.×150 mm) を用いた。

流通系統図を Fig. 1 に示す。

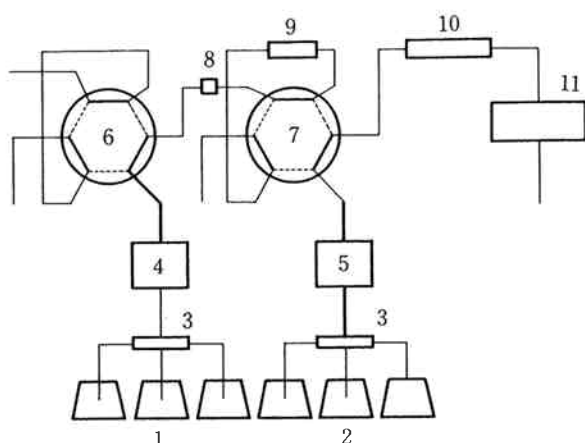


Fig. 1 Flow diagram of HPLC drug analysis with automatic sample preparation

1: eluent for pretreatment, 2: eluent for analysis, 3: solvent switching valve, 4: pump A for pretreatment, 5: pump B for analysis, 6: auto sampler, 7: column switching value in PT-8000, 8: line filter, 9: pretreatment column, 10: analytical column, 11: detector

2.2 薬物添加血漿の調製法

健康人から集めたプール血漿に対し, メタノールあるいは, 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0) に溶解した薬物標準液を5%以下の混合比で次の濃度になるように添加した⁴⁾。テオフィリン (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), エトサクシミド (50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), プリミドン (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), フェノバルビタール (18, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), カルバマゼピン (6, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), フェニトイン (12, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), バルプロ酸ナトリウム (100

$\mu\text{g}/\text{ml}$), リドカイン (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) プロブコール (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

2.3 自動前処理の原理と PT-8000 の操作法

試料の自動前処理の原理を簡単に説明すると次のようになる。Fig. 1 においてオートサンプラに吸引された試料は前処理液の流れているポンプAにより前処理カラムへ注入される。そのまま数分間送液することによって試料中のタンパク質などが洗い出される (前処理工程)。一方, 分析カラムには分析液がポンプBから送液されていて前の試料の分離あるいは, 次の試料の分離に備えている (図の実線の流路)。次にカラム切替えのための六方バルブが ON の状態になり, 前処理カラムと分析カラムの流路がつながり (図の点線の流路) ポンプBから送液される分析液によって前処理カラムに吸着された目的成分は脱着され分析カラムへ導入される (カラムの接続工程)。その後, カラム切替えバルブを元の状態 (OFF) に戻す (図の実線の流路) と同時に溶離液切替えバルブを操作して, ポンプAより分析液を前処理カラムに送りカラムを洗浄する。この間, 分析カラムでは分離が行なわれている (分離および洗浄工程)。数分後に溶離液切替えバルブが OFF となり次の試料の前処理に備える (前処理カラムの再生工程)。

これら一連の動作は, 前処理条件, 分離条件に沿って各々の切替えバルブの ON, OFF の時間を入力して作成されたプログラムに従って自動的に進行する。本装置はこのようなプログラムを9個まであらかじめ作成しておくことができるため, 条件の異なったルーチン分析をする場合でも, また最適な分析条件を検討するための終夜運転にも便利である。

このように種類の異なるカラムの流路をつないだり, はずしたりすることをカラムスイッチング法⁵⁾と呼ぶが PT-8000 には, このカラムスイッチングバルブが2個付いている他, 数種類の溶離液を選択的に送液できるように三方電磁バルブが4個内蔵されている。

3. 測 定 例

3.1 気管支拡張剤

気管支喘息の治療薬として広く知られているテオフィリンは古く1937年頃から使われてきている薬剤で気管支平滑筋弛緩作用を有する⁶⁾。血中の治療濃度範囲は10~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と狭いため TDM が重要な薬剤の1つである。

テオフィリンの分析において前処理時間を種々変えて分離パターンをみると前処理時間が短い場合, テオフィリン以外にも夾雑物が前処理カラム内に残り分析カラムへ導入されていることが観察された (Fig. 2)。したがっ

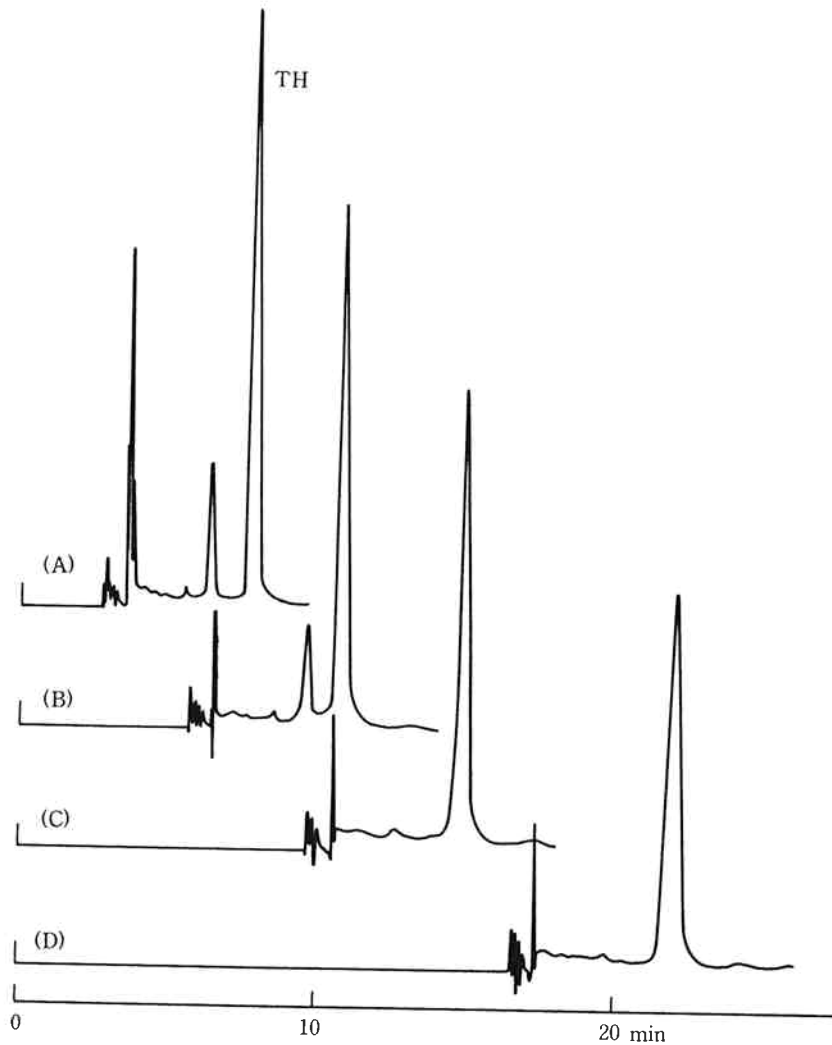


Fig. 2 Optimum sample preparation time for removal proteins

Sample preparation time; (A): 1 min, (B): 4 min, (C): 8 min, (D): 15 min

HPLC conditions; precolumn: TSKprecolumn BSA-ODS, eluent: 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0), flow rate: 1.0 ml/min, analytical column: TSKgel ODS-120T, eluent: 20% MeOH in 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0), flow rate: 1.0 ml/min, detection: 273 nm, conjunction time of precolumn and analytical column: 4 min, sample: plasma spiked with theophylline (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), injection volume: 20 μl , peak: TH=theophylline

て、分析カラムでの分離に影響を与えるような夾雑物を分析カラムへ導入させないためには、ある程度前処理時間を長くした方がよいことになる。また、この場合、前処理カラムへ試料が入った流れとは逆の方向からテオフィリンは分析カラムへ押し出されている（このときのカラムの接続を逆方向と呼ぶ）が前処理時間が長い程ピークはブロードになっていることから、50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0) の前処理液での処理中にテオフィリンは前処理カラム内でやや移動しながら拡散していることがうかがわれる。一般にはカラムの接続方向が逆方向のときピー

クの形状が鋭くなる傾向にあり、前処理カラムに吸着されやすい薬物ほどその傾向が強い。

Fig. 3 に15分サイクルで連続測定した際のクロマトを示す。前処理時間は4分であったがこの試料では夾雑ピークが見られなかった。(c)のクロマトからわかるように血漿ブランクにはテオフィリンの位置にピークが見られないことから、前処理カラムや分析カラムあるいはPT-8000 内のカラム切替えバルブなどへの薬物の残存現象はほとんどないことがわかる。

3.2 抗てんかん薬

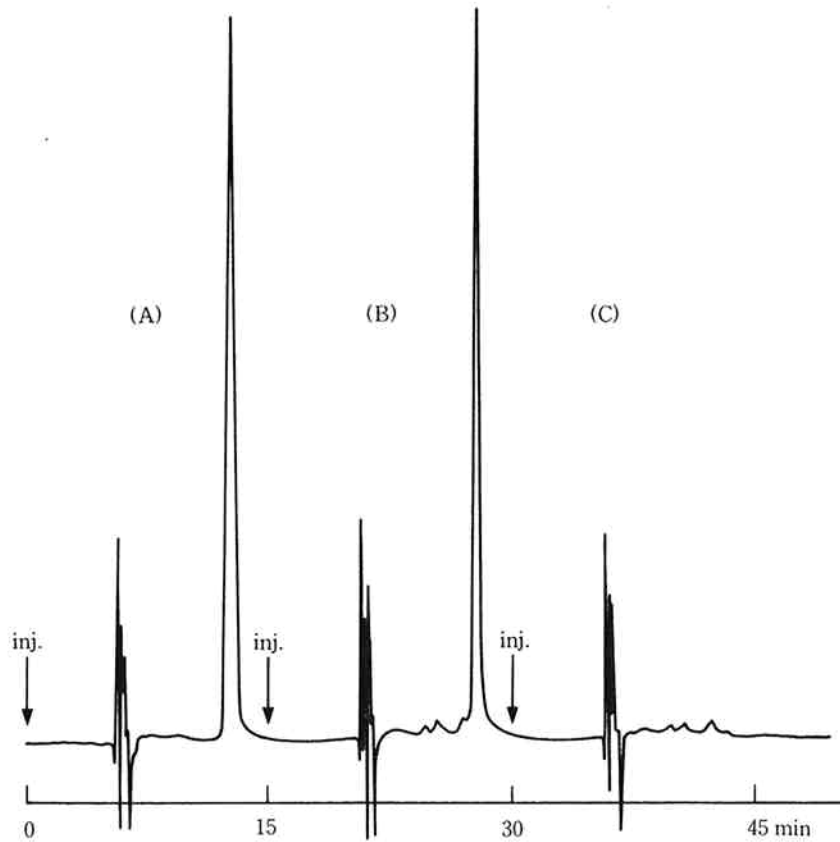


Fig. 3 Chromatograms of theophylline

HPLC conditions are same as Fig. 2.

sample; (A): standard solution of theophylline ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), (B): plasma spiked with theophylline ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), (C): plasma blank

抗てんかん薬バルプロ酸は $\text{pK}_a=4.95$ と酸性物質であることおよび吸光特性が 200 nm 付近にしかないことなどから HPLC による分析が難しい薬物の 1 つである。ここでは前処理カラムとの親和性を高めるため、前処理液の pH を 2.5 に下げた。一方、分析カラムでの分離のためには逆に ODS 層との親和性を下げるため pH を 7.0 とした (Fig. 4)。前処理液の pH を下げることによりバルプロ酸以外のものまでが前処理カラムの ODS 層に吸着されやすくなるため分析カラムでの分離パターンはかなり複雑なものとなっている。この条件ではバル

プロ酸のうしろに夾雑物が溶出しているため、バルプロ酸溶出後、分析カラムを 80% アセトニトリルで洗浄している。

抗てんかん薬は単剤投与以外に数種類の薬剤が同時に投与されることがある。Fig. 5 には、プリミドン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトインの 4 種の抗てんかん薬の一斉分析例を示す。HPLC 法ではこのように複数薬剤の一斉分析ができるというところに特徴があるものの単一の溶離液で分離を行なうと時間がかかることが多い。そこで、3種類の溶離液を使ったス

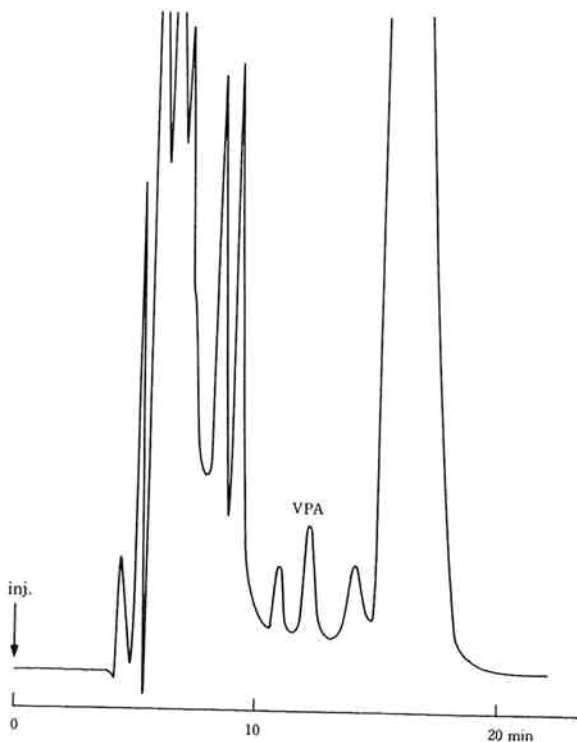


Fig. 4 Chromatogram of valproic acid

HPLC conditions; precolumn: TSKpre-column BSA-ODS, eluent: ①50 mM KH_2PO_4 (pH 2.5), 0→4 min ② $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20), 6→8 min, flow rate: 1.0 ml/min, analytical column: TSKgel ODS-120T, eluent: ①40% CH_3CN in 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0), 0→13 min, ② $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20), 13→15 min, sample: plasma spiked with sodium valproate (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), injection volume: 1 ml (diluted by 10 times), peak: VPA=valproic acid, detection: 210 nm, pretreatment time: 4 min, conjunction time of precolumn and analytical column: 2 min

テップワイズグラジエント法によって分析時間の短縮を図った。その結果、前処理時間8分間、前処理カラムの洗浄時間2分間とした場合でも、1サイクルは分離時間とほぼ同じぐらいの24分で連続注入が可能であった。

3.3 抗不整脈剤

抗不整脈剤として広く用いられているリドカインは10数分サイクルで連続分析が可能であった (Fig. 6)。リドカインの pK_a は7.85とやや塩基性にあるため pH 7.0

の溶離液では ODS 層との親和性が高いため、その溶出のためには溶離液中の有機溶媒の濃度を高くする必要があった。そこで、溶離液の pH を下げリドカインの解離を抑えることにより、より少ないアセトニトリル濃度でも早く溶出するような条件とした。カラムの接続によりベースラインの乱れが大きくなっているのは、検出感度を上げている (210 nm, 0.04 AUFS) ことにもよるが前処理液と分析液の pH が違うことも一因している。

3.4 脂質改善薬

最近注目されている脂質改善薬プロブコール⁷⁾についての分析例を Fig. 7 に示す。プロブコールの構造式 (Fig. 8) からわかるように疎水性が非常に高いため、ODS カラムを使った場合の溶離液として95%という高濃度のアセトニトリル溶液が用いられた。また、前処理カラムとしては、今までの例とは異なり TSKpre-column SW の方が、夾雑ピークを少なくする意味で適切であった。つまり、SW カラムの疎水的吸着性は BSA-ODS と比べ弱いためプロブコールのように疎水性の高い薬物の選択的な吸着に適するものと考えられる。溶離液中のアセトニトリル濃度が60%を越えるような薬物の前処理カラムとしては SW カラムが有効であると考えている。

4. 考 察

血液中の薬物は血中タンパク質 (主にアルブミン) と結合した形態 (結合型) と結合しない形態 (遊離型) の平衡状態で存在している。その結合率は血中のタンパク質濃度および薬物の種類にもよるが、数%のものから90数%のものまでさまざまである¹⁾。実際に有効な薬物は遊離型のものであるが、その両者を区別して測定することは非常に難しいためほとんどの場合、TDM においては総量測定で代用されている。

ここで述べた自動前処理による HPLC 法でも血中薬物は総量として測定されることが市販コントロール血清品の測定 (Table 1) および血漿からの添加回収測定 (Table 2) の結果から推定された。つまり、抗てんかん薬の添加された市販コントロール血清は、ほぼ表示通りの値が本法では測定された。同時に行なったアセトニトリル、過塩素酸、トリクロロ酢酸による用手法の前処理法では、定量値がかなり違っているものもあり正確度においても用手法は問題であった。また、測定時の同時再現性は4%以下とバラツキの少ない測定が可能であった。一方、血漿からの添加回収率は94~103%とほぼ定量的であった。

自動前処理が可能のための条件は、目的成分が HPLC で分離できるということの他に、前処理カラム

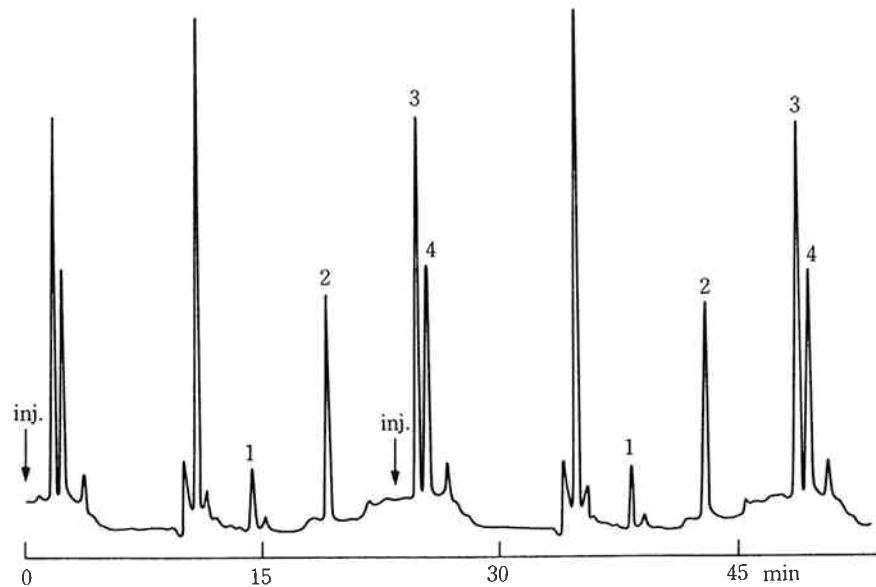


Fig. 5 Chromatogram of anticonvulsant drugs

HPLC conditions; precolumn: TSKprecolumn BSA-ODS, eluent: 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0), flow rate: 1.0 ml/min, analytical column: TSKgel 120T, eluent: 20% CH_3CN in 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0) 0→14 min, 27% CH_3CN in 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0) 14→18 min, 35% CH_3CN in 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0) 18→24 min, flow rate: 1.0 ml/min, sample: plasma spiked with anticonvulsants, 1=primidone (10 $\mu g/ml$), 2=phenobarbital (20 $\mu g/ml$), 3=carbamazepine (10 $\mu g/ml$) 4=phenytoin (20 $\mu g/ml$), injection volume: 10 μl , detection: 220 nm, pretreatment time: 8 min, conjunction time of precolumn and analytical column: 2 min

で目的成分が吸着されかつタンパク質は除去されるという条件が満たされることである。ここでは、その条件を満足するカラムとして分析カラムに ODS カラムを前処理カラムに BSA-ODS カラムと SW カラムを使用した。BSA-ODS カラムは吉田ら^{8),9)}の開発したタンパク被覆 ODS に基づき製造したもので、ODS ゲル表面に牛血清アルブミン (BSA) を化学結合させたものである。粘稠性の高い血清などをカラムに直接注入することを考えた場合、ゲル粒径が大きい程その流れを妨げないため、ここでは 20 μm 程度の ODS ゲルが使われている。このことによって、血清中のタンパク質などの高分子は BSA-ODS カラムに吸着されることなく素通りし、薬物など疎水性のある低分子はゲルのポア内に浸透し ODS 層に吸着される¹⁰⁾。

ここでは、一部の薬物への適用例を示したが、その適用限界は ODS 層、SW 層に吸着され難い親水性の高い成分への応用にある。その場合、イオン交換カラムへの適用を考えねばならない場合もあるが、バルプロ酸の例に見られるように前処理液の pH を変えることなどによりその薬物の疎水性を増加させ前処理カラムに吸着

させることも可能であるため、BSA-ODS カラムおよび SW カラムだけでもかなり広範囲の性質の薬物への適用が可能であると期待している。

自動前処理により連続測定を行なう際の注入サイクルは、前処理工程（前処理カラムの洗浄および再生時間を含む場合がある）か分析カラムからの溶出するまでの時間のうちどちらか長い方の時間に左右される。それは、自動前処理においては、前処理用カラムと分析用カラムが別々にあるため前処理工程と分析工程を並行して行なうことができるためである。したがって、測定の 1 サイクルが前処理時間と分析時間の合計とはならない点からも試料のオンラインでの前処理法は全体的にも分析時間の短縮につながっているといえる。

5. おわりに

HPLC 法による血中薬物の分析において、従来の的手法による試料の前処理にかわる方法として、試料をそのまま HPLC に注入するだけで自動的に前処理を行なう方法について検討してきた結果、特殊な前処理カラムとして BSA-ODS カラムとカラムスイッチングが自動

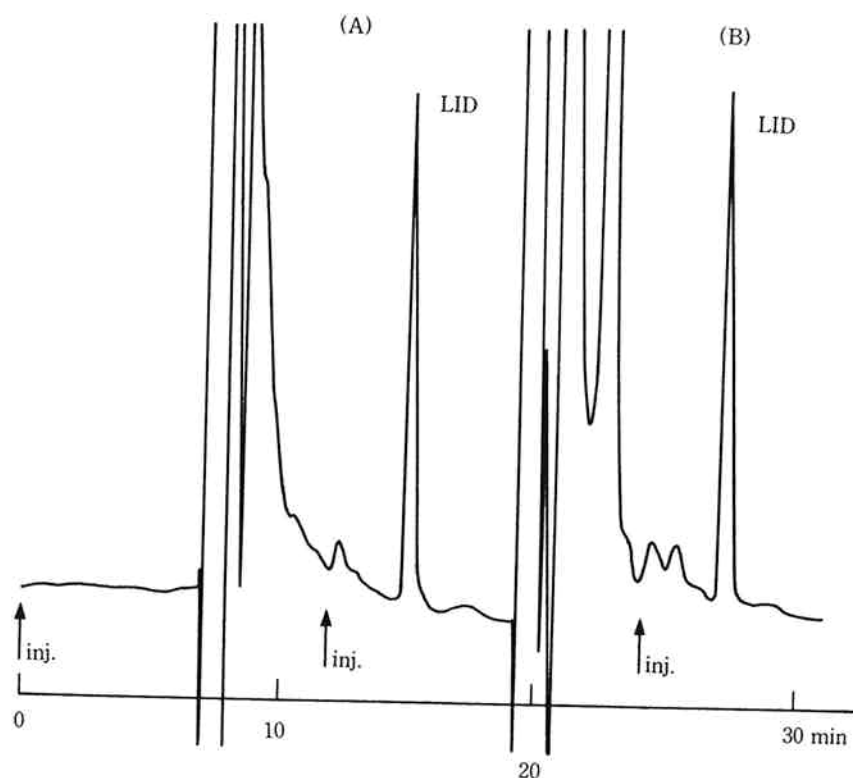


Fig. 6 Chromatogram of lidocaine

HPLC conditions; precolumn: TSK precolumn BSA-ODS, eluent: 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0), flow rate: 1.0 ml/min, analytical column: TSK gel ODS-120T, eluent: 15% CH_3CN in 50 mM KH_2PO_4 (pH 2.5), flow rate: 1.0 ml/min, sample: (A); lidocaine (2.5 $\mu g/ml$), (B); plasma spiked with lidocaine (2.5 $\mu g/ml$), peak: LID=lidocaine, injection volume: 20 μl , detection: 210 nm, pretreatment time: 6 min, conjunction time of precolumn and analytical column: 2 min

的に行なえる自動前処理装置を開発することによってその目的を達することができた。

本法によれば、操作が簡単な上に測定精度が高く、1試料当りの測定時間も短く、ランニングコストが低いなど多くの利点があるため、今後 HPLC 法における試料の前処理法として TDM^{(11), (12)} においてはもちろん、医薬品の開発研究^{(13), (14)} においても今後発展していくものと期待される。

最後に PT-8000 の開発に当り御協力いただいた旭計器工業(株)と本法の開発において御尽力願った当社科学計測開発部の諸氏に感謝する。

文 献

- 1) 海老原昭夫, 立石正登; 神経精神薬理, 7, 591(1985)
- 2) R. W. Giese; Clin. Chem., 29, 1331 (1983)
- 3) J. A. F. deSilva; J. Chromatogr., 340, 3 (1985)
- 4) 田村善蔵, 堀岡正義; “薬物血中濃度制度の実際”, p. 92 (1984) (薬業時報社)
- 5) J. Lankelma, H. Poppe; J. Chromatogr., 149, 587 (1978)
- 6) 向山徳子; 小児内科; 15, 1407 (1983)
- 7) S. Kudo, H. Akiyama, M. Odomi, G. Miyamoto; J. Chromatogr., 277, 419 (1983)
- 8) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima, H. Imai; Chem. Pharm. Bull., 30, 2287 (1982)
- 9) H. Yoshida, A. Nagami, I. Morita, T. Masujima, H. Imai; J. Pharm. Dyn., 7, 8-18 (1984)
- 10) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima, T. Tsuru,

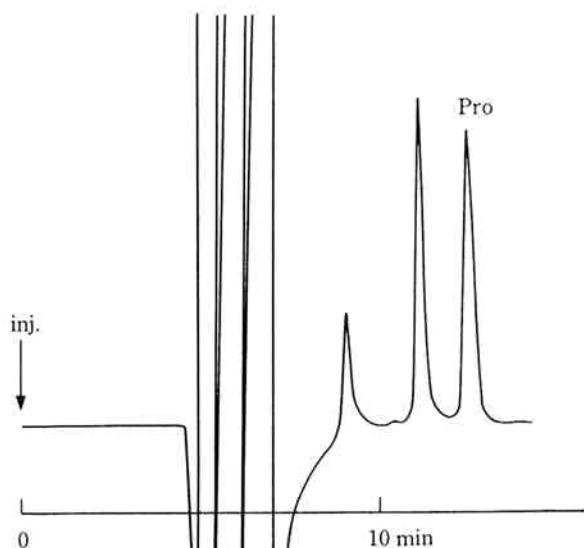


Fig. 7 Chromatogram of Probucole
HPLC conditions; precolumn:
TSKprecolumn SW, eluent: 20 mM NaCl,
flow rate: 1.0 ml/min, analytical column:
TSKgel ODS-80T_M, eluent: 95% CH₃CN
including 0.1% H₃PO₄, flow rate: 1.0 ml
/min, detection: 254 nm, sample: plasma
spiked with probucole (1 µg/ml), injection
volume: 20 µl, peak: Pro=probucole,
pretreatment time: 4 min, conjunction
time of precolumn and analytical column:
2 min

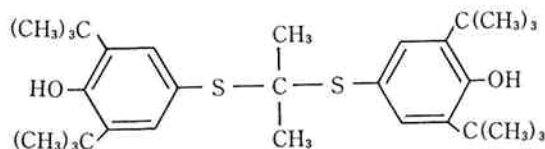


Fig. 8 Structure of probucole

Table 2 Recovery of drugs by automatic sample preparation method

Drug	Concentration in plasma		Recovery
	Added	Found	
Phenobarbital	18 µg/ml	17.2±0.22 µg/ml	95.6%
Phenytoin	12	12.0±0.25	100.0
Carbamazepin	6	5.8±0.22	97.2
Ethosuximide	50	51.3±0.82	102.0
	100	100.3±1.44	100.0
Valproic acid	100	94.0±2.30	94.0
Theophylline	20	19.5±0.44	97.5
Lidocaine	2.5	2.57±0.076	102.8

Table 1 Determination of the anticonvulsant control

Drug	Representative ¹⁾ concentration µg/ml	Found concentration µg/ml			
		Present method (c. v.)	CH ₃ CN ²⁾	HClO ₄ ³⁾	TCA ⁴⁾
Primidone	7.2±1.4	7.0 (2.4%)	6.6	5.1	5.0
	12.4±2.5	12.4	—	—	—
Phenobarbital	14.7±4.1	14.6 (1.3%)	20.2	14.0	13.5
	38.6±7.7	40.8	—	—	—
Phenytoin	7.3±1.3	8.3 (3.0%)	12.0	2.5	2.1
	19.5±3.9	25.9	—	—	—
Carbamazepine	4.0±0.8	4.2 (3.6%)	4.2	1.0	0.9
	7.7±1.2	8.8	—	—	—

1) ORTHO Bi-Level Assayed Anticonvulsant/Antiasthmatic Control Set I, II

2) sample+CH₃CN (1:1)

3) sample+5% HClO₄ (1:1)

4) sample+10% trichloroacetic acid (1:1), and the supernatant was analysed.

- N. Takai, H. Imai; *Chromatographia*, **19**, 466 (1984)
- 11) 松原健一, 稗田幸江, 中村互志; 日本臨床化学会記録第23集, p. 88 (1983)
- 12) Y. Tokuma, Y. Shiozaki, H. Noguchi; *J. Chromatogr.*, **311**, 339 (1984)
- 13) 高萩英邦, 黒崎かおる, 繁原英治, 同合賢司, 駒井亨, 田中 実; 薬物代謝と薬効毒性シンポジウム (1983)
- 14) 疋田興造, 石井信親, 井上義政, 宗像友彦, 薬物治療モニタリング研究会, 第1回研究発表会, p. 26 (1985)