

## 高速液体クロマトグラフィーによる3環系 抗うつ薬脳内・血清内濃度の検討

金沢大学医学部神経精神医学講座 (主任：山口成良教授)

倉 田 孝 一  
古 田 寿 一  
木 戸 日 出 喜  
岸 谷 和 之  
山 口 成 良

(昭和61年7月24日受付)

3環系抗うつ薬(TCA)の簡便な測定法について検討した後、15 mg/kgの imipramine (IP) hydrochloride をラットの皮下に投与し、IP および desipramine (DP) の脳内および血清内濃度の継時変化を検索した。TCA の分離と定量は逆相分配高速液体クロマトグラフィー法と 254 nm における紫外吸収法を用いた。この方法では各々の TCA に対する検量線は良好な直線性を示した。内部標準としては clomipramine を用いた。IP と DP の回収率を検討すると、人血清では各々  $100 \pm 2.0\%$  (平均値  $\pm$  S. D.)、 $97.9 \pm 3.1\%$  であり、ラット血清では  $97.3 \pm 3.0\%$ 、 $98.8 \pm 3.2\%$ 、ラット脳ホモジェネートでは  $96.9 \pm 5.2\%$ 、 $97.7 \pm 6.0\%$  であった。IP のラットにおける速度論的検討では次のようであった。IP は注射 30 分以内にラット体内に急速に分散し、その後その血清内濃度は 72 分の半減期で減少した。その脳内濃度は 30 分で最高となり、その後血清内濃度の減少に対応して減衰した。一方、IP の活性代謝産物である DP の濃度は、脳内および血清内両者において 30 分以内に急速に上昇した。その後、180 分以内では両者におけるその濃度は、徐々に上昇した。IP および DP の脳/血清内濃度比は、注射後 30 分で一定となった。前者は  $44.1 \pm 13.3$  (平均値  $\pm$  S. D.,  $n=16$ )、後者は  $20.4 \pm 5.3$  ( $n=16$ ) であった。

**Key words** measurement, antidepressant, high-performance liquid chromatography

近年、3環系抗うつ薬(TCA)の治療有効濃度の問題が注目され、血中濃度モニタリングの必要性が報告されている<sup>1)~3)</sup>。従って、簡便で感度の良い測定法と、薬物速度論的研究が必須のものと考えられる。

従来、TCA 濃度測定のための種々の方法が考案され、いくつかの総説<sup>2)3)</sup>も出ている。しかし、抗てんかん薬などと比較すると、その血中濃度は著しく低値であり、測定のためには種々の難点があった。近年、高速液体クロマトグラフ(HPLC)およびその充填剤の進歩にともない、簡便な方法が報告され<sup>4)~7)</sup>、TCA 血中濃度測定は臨床の場に応用されうるものとなりつつあ

る。今回、われわれは imipramine (IP) を主とした TCA の HPLC 定量法を試み、あわせてラットを用いてその血清内および脳内濃度の動態を研究し、本法の臨床応用の可能性についても検討した。

### 対象および方法

#### 1. 試 薬

IP hydrochloride, desipramine (DP) hydrochloride, maprotiline (MT) hydrochloride および clomipramine (CP) hydrochloride は Ciba-Geigy 社より提供をうけた。methanol, tetrahydrofran は市販

Abbreviations: AT, amitriptyline; CP, clomipramine; DP, desipramine; HPLC, high-performance liquid chromatography; IP, imipramine; MT, maprotiline; NT, nortriptyline; TCA, tricyclic antidepressant.

の高速液体クロマトグラフィー用を用い、リン酸、triethylamine, n-heptane, isoamylalcohol は特級試薬を用いた。

## 2. 高速液体クロマトグラフィー

ウォーターズ社製 6000 A 型ポンプ, U6K 型インジェクター, 440 型紫外線吸収計 (254 nm 固定波長式) に  $\mu$ -Bondapak C<sup>18</sup> を充填したカラム (30 cm×3.9 mm i. d.) を接続した。

移動相は 1% triethylamine 水溶液をリン酸で滴定して、pH 3.0 に調製したものと、tetrahydrofran と methanol を 1:2 の割合で混合した有機溶媒を 58:42 の比で混合して用いた。移動相の流速は 1.0 ml/分とした。なお、溶媒は各々 0.5  $\mu$ m のフィルターでろ過後混合し、減圧下で超音波処理を行い、ガス抜きをした後使用した。

## 3. 動物

Wistar 系雄ラット、体重 150–200 g を用い、IP hydrochloride 15 mg/kg を皮下投与後、3 時間に渡り、所定の時間に断頭し、血液・全脳を採取した。脳は重量測定後ただちに凍結し、血液は血清分離後、脳と同様に -80°C で保存した。脳は分析直前に蒸留水 4.0 ml を加え、Ika-Werk 社製 Ultraturrax 18-10 S1 型ホモジェナイザーにて 1 分間ホモジェネートしたものを資料とした<sup>8)</sup>。

## 4. TCA の抽出操作

血清または脳ホモジェネート 0.1–1.0 ml に 0.5 N-NaOH 0.5 ml, 内部標準 CP 200 ng, MT 2000 ng および n-heptane/isoamylalcohol (99/1) 5.0 ml を加え、ガラス性 10 ml の有栓試験管に入れ、60 分間振とう・遠心後、ドライアイス・アセトン槽につけ、水層を凍結した後、上層の有機層を同様の試験管に移した。この有機層に 0.05 N HCl を 0.1 ml 加え、15 分間振とう・遠心後下層の水層 10–30  $\mu$ l を HPLC の分析用の試料とした。血清および脳内濃度の計算是 peak height ratio 法を用いた。

## 成 績

図 1 の (A) に対照人血清 2.0 ml に IP, DP を各々 100 ng, MT 2000 ng, CP 200 ng を加えて抽出した HPLC 流出パターンを示した。図 1 の (B) には IP 135 mg 1 日 3 回服用中の患者よりえられた血清 2.0 ml に、MT 2000 ng, CP 200 ng を加えて抽出したものを示した。図 1 に示すように、IP, DP, MT, CP の retention time は各々 10.8, 12.4, 15.2, 20.8 分を示し、分離は良好であった。ラット血清、人血清各々 1.0 ml およびラット脳ホモジェネート 0.2 ml のみから抽出すると何ら有意なピークは認められず、測定を障害す

る物質は存在しなかった。

図 2 に人対照血清 2.0 ml に IP, DP を各々 20, 50, 100, 150, 200, 300 ng および内部標準 CP 200 ng を加えた際の、IP, DP の CP に対する peak height ratio の関係を示した。IP, DP とも明瞭な直線性を示し、良好な定量性がえられた。IP, DP とも血清 1.0 ml を用いれば 5.0 ng/ml 程度より測定が可能であった。ラット脳ホモジェネート、ラット血清でも同様の良好な定量性がえられた。

IP, DP を各々 100 ng, 200 ng を人血清 2.0 ml に加え、5 例づつその peak height ratio を検討した。100 ng では IP 1.11±0.02 (平均値±S. D.), DP 0.95±0.03, 200 ng では IP 2.14±0.13, DP 1.90±0.10 であり、各々の変動係数は 1.8, 3.2, 6.1, 5.3% を示した。人血清 2.0 ml, ラット血清 1.0 ml およびラット脳ホモジェネート 0.2 ml に、IP, DP 各々 150 ng および CP 200 ng を加え、各々の組織から、IP, DP の回収率を 4 例づつ検討すると、人血清 100±2.0% (平均値±S. D.), 97.9±3.1%, ラット血清 97.3±3.0%, 98.8±3.2%, ラット脳 96.9±5.2%, 97.7±6.0% であった。なお通常は CP を内部標準とするが、次に述べるように実際の臨床上では種々の薬剤が併用投与され、TCA の測定を妨害する場合がありますので、MT 2000 ng を内部標準とする場合も検討した。この際、IP, DP を各々 100 ng, 200 ng づつ加え、計 5 回について検討すると、IP, DP 各々 100 ng では peak height ratio は 1.37±0.16 (平均値±S. D.), 1.10±0.07 であり、200 ng では 2.36±0.31, 1.98±0.22 を示した。したがって、変動係数は 11.7, 6.4, 13.1, 11.1% であり、CP を内部標準とした場合に比べると誤差が大きかった。

次に、一般的によく用いられる抗うつ薬および抗うつと併用される可能性のあるベンジアゼピン系、フェノチアジン系薬物の分離状況について検討し、各々の薬物の容量係数 (K') を表 1 に示した。その結果、amitriptyline (AT), trimipramine, estazolam, chlordiazepoxide, carpipramine, levomepromazine と IP, DP, および chlorpromazine と CP の分離が不十分であった。

図 3 にラット皮下に IP hydrochloride 15 mg/kg を投与し、5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 分後に全脳および血清中の IP, DP 濃度を測定した結果を示した。IP は投与後 5 分以内に迅速に吸収され、その血清内濃度は急速に減衰した。30 分以内に拡散相は終了し、その後半減期 72 分で減少した。DP の血清内濃度は 30 分間で同速に上昇し、その後 180 分間の観察期間中も徐々に上昇した。IP 脳内濃度は 30 分で極大を示し、その後は血清内濃度と同様に減衰した。DP 脳内濃度は

ほぼ DP 血清濃度と併行に推移した。IP, DP の脳/血清内濃度比は、両者とも 30 分以後より一定値を示した。60 分以後の 16 例について検討すると、IP  $44.1 \pm 13.3$  (平均値  $\pm$  S. D.), DP  $20.4 \pm 5.3$  を示した。

### 考 察

われわれは Wallace ら<sup>6)</sup>に準じて TCA の抽出を行った。試料を強アルカリ性に保ち、有機溶媒で抽出後、少量の希塩酸で再抽出した。この方法は簡便であり、良好な定量性がえられた。TCA はフェノチアジン系薬物などともに、ガラス面の吸着が問題となり、その抽出には注意を要する。一般に行われるように、有機溶媒抽出後乾固し、再溶解する方法では定量性は不良となり、ガラス器具のシラン処理<sup>9)</sup>が必要である。われわれは本法において、ガラス器具のシラン処理の有無による定量性の差異について検討したが両者に差は

なかった。なお、再抽出後の少量の水層については、pH 試験紙を用いて検討したが、常に pH 2.0 以下を示し、アルカリの混在はみられなかった。

本法を臨床的に用いる場合を考えて、表 1 に示すような種々の薬物について IP, DP との分離を検討した。AT, trimipramine を IP, DP と明瞭に分離できなかったが、临床上 3 環系抗うつ薬の併用は少いので、実際には適用可能と思われる。chloromazine と CP および IP, DP と estazolam, chlordiazepoxide, caripramine, levomepromazine の分離にも難点があった。しかし、本法ではベンゾジアゼピン系薬物は水層にほとんど再抽出されないで、実際上はフェノチアジン系薬物の混在が問題となる。chlorpromazine については MT を内部標準とすれば測定可能であるが、levomepromazine については検討の余地がある。なお MT を内部標準に用いると定量性がやや不良

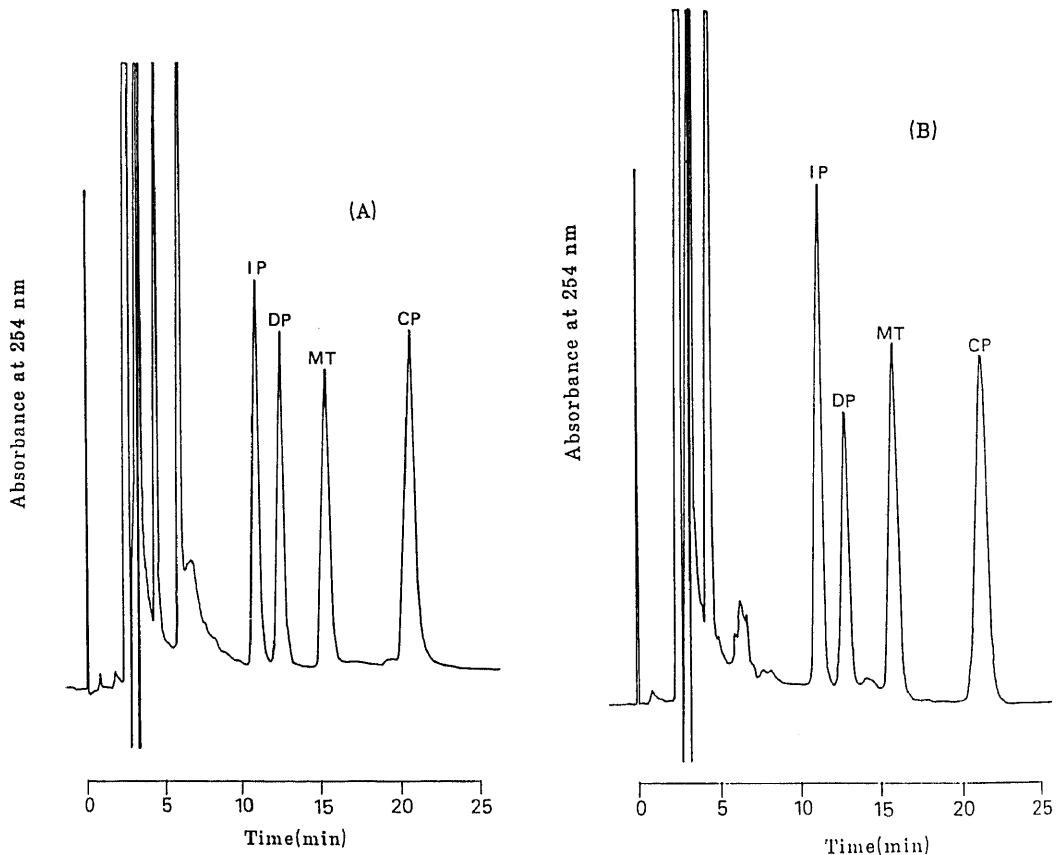


Fig. 1. HPLC elution patterns of IP, DP, MT and CP obtained from standard sample (A) and patient's serum (B). (A): IP 100 ng, DP 100 ng, MT 2000 ng and CP 200 ng were added to a 2.0 ml of the drug-free serum. (B): MT 2000 ng and CP 200 ng were added to a 2.0 ml of patient's serum, receiving a 135 mg of IP every day. The serum levels of IP and DP were 62 ng/ml and 49 ng/ml, respectively.

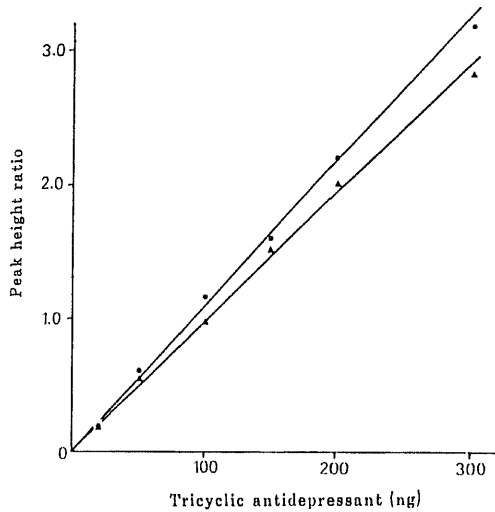


Fig. 2. Peak-height ratio as a function of drug concentration for IP (●) and DP (▲). A 200 ng of CP was used as an internal standard.

Table 1. Comparison of capacity factors of various drugs in this analytical system

Drugs	k'
Cloazolam	<0.6
Carbamazepine	2.25
Promethazine	2.67
Estazolam	3.46
Imipramine	3.50
Chlordiazepoxide	3.50
Amitriptyline	3.83
Carpipramine	3.92
Trimipramine	3.96
Desipramine	4.16
Levomepromazine	4.63
Nortriptyline	4.75
Maprotiline	5.33
Chlorpromazine	7.04
Clomipramine	7.67
Desmethylclomipramine	7.83
Clocarpramine	8.04
Diazepam	9.00
Clotiazepam	9.33
Thioridazine	9.92
Sulpiride	—

k', capacity factor

となるので、通常は CP を内部標準とした。

ラットの薬物速度論的検討では、IP 皮下投与後 5 分以内に吸収相は終了し、その後 IP, DP の脳内・血清内濃度の変化は図 3 に示すようであった。また、IP, DP の脳/血清内濃度比は各々 44.1, 20.4 を示した。

本報告の結果を従来のラットにおける TCA の研究と比較すると、Brookman ら<sup>10)</sup>の IP 80 mg/kg の腹腔内投与では、IP 脳内濃度の極大は 30 分、脳/血漿内濃度比は IP 24-42, DP 3.5, 半減期 82 分とされ、DP の脳/血漿内濃度比以外は、われわれの結果とよく一致していた。AT では AT およびその活性代謝産物 nortriptyline (NT) の脳内/血漿内濃度比は各々 8-40<sup>11)12)</sup>, 20.9-36.7<sup>12)</sup>とされ、NT の血漿内濃度は AT の約 1/10<sup>12)</sup>である。したがって、TCA の脳/血清内濃度比は本研究も含めて 20-40 と考えられ、投与 30 分後よりその血清内濃度は、活性代謝産物も含めて脳内濃度は反映する。また、IP の半減期は 72 分であったが、TCA は 3-コンパートメント・モデルに従うの

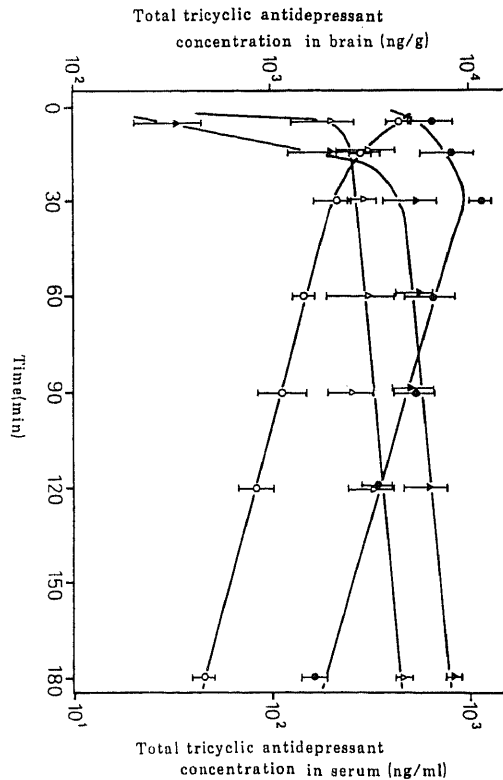


Fig. 3. Changes of IP and DP in serum and brain of rat after IP administration. IP hydrochloride was injected s.c. (15 mg/kg). ○, IP concentration in serum; □, IP concentration in brain; △, DP concentration in serum; ◇, DP concentration in brain.

で<sup>13)</sup>, この半減期は $\beta$ -相のものであろう。なお, TCAのfirst-pass effect 90-100%<sup>(13)(14)</sup>であり, 従来検討されてきた腹腔内投与では著しくbioavailabilityが変動するため, 本研究では皮下投与にて検討を行った。またIPではATと相違して活性代謝産物DPが大量に生じたが, これは同じTCAであっても明らかに代謝経過が異なることを推測させる。

### 結 論

TCAの簡便な定量法について検討し, その後IP hydrochloride 15 mg/kgをラット皮下に投与し, IPとDPの脳内・血清内濃度の推移について検討した。結果は次のようであった。

1. TCAの分離は逆相分配クロマトグラフィー法を用い, 254 nmにて測定した。この方法ではIP, DPに対する検量線は良好な直線性を示した。内部標準としてはCPを用いた。IP, DPの回収率を検討すると, 人血清では各々 $100 \pm 2.0\%$  (平均値 $\pm$ S. D.),  $97.9 \pm 3.1\%$ , ラット血清では $97.3 \pm 3.0\%$ ,  $98.8 \pm 3.2\%$ , ラット脳ホモジェネートでは $96.9 \pm 5.2\%$ ,  $97.7 \pm 6.0\%$ であった。

2. ラットIP投与では, 投与30分以内にIPはラット体内に急速に分布し, その後その血清内濃度は72分の半減期で減衰した。IPの脳内濃度は30分で最高となり, その後血清内濃度の減少に従って減衰した。一方, IPの活性代謝産物DPは脳および血清内において30分以内に急速に上昇し, 以後も徐々に増加し続けた。IP, DPの脳/血清内濃度比は投与30分以降一定となり, 各々 $44.1 \pm 13.3$  (平均値 $\pm$ S. D.,  $n=16$ ),  $20.4 \pm 5.3$  ( $n=16$ )であった。

以上の結果より本法のTCA測定法は, 臨床および実験的研究に有用であると結論される。

### 文 献

- 1) Amsterdam, J., Brunswick, D. & Mendel, J.: The clinical application of tricyclic antidepressant pharmacokinetics and plasma level. *Am. J. Psychiatry*, **137**, 653-662 (1980).
- 2) Jatlow, P.: Therapeutic monitoring of plasma concentration of tricyclic antidepressants. *Arch. Path. Lab. Med.*, **104**, 341-344 (1980).
- 3) Mendlewicz, D. R.: Tricyclic antidepressant plasma level: The state of the art and clinical aspects. *Neurophychobiol.*, **8**, 73-85 (1982).
- 4) Breutzmann, D. A. & Brouer, L. D.: Reversed-phase liquid chromatography and gas

chromatography/mass fragmentography compared for determination of tricyclic antidepressant drugs. *Clin. Chem.*, **27**, 1907-1911 (1981).

- 5) Moyes, R. B. & Moyes, I. C. A.: Measurement of plasma antidepressant levels by high-performance liquid chromatography. *Post. Grad. Med. J.*, **53** (Suppl.), 117-123 (1977).
- 6) Wallace, J. E., Shinek, E. L. J. & Harris, S. C.: Determination of tricyclic antidepressants by high-performance liquid chromatography. *J. Anal. Toxicol.*, **5**, 20-23 (1981).
- 7) Watson, I. D. & Stewart, M. J.: Quantitative determination of amitriptyline and nortriptyline in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **132**, 155-159 (1977).
- 8) Preskorn, S. H. & Glotzbach, R. K.: A liquid chromatographic method for quantitating amitriptyline in brain tissue. *Psychopharmacology*, **78**, 23-24 (1982).
- 9) Raddats, B. A. & Thompson, S. G.: Reliable routine method for the determination of plasma amitriptyline and nortriptyline by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **162**, 351-366 (1979).
- 10) Brookman, S. & Kourounakis, P.: Alterations induced in distribution and in vivo metabolism of imipramine by pregnenolone-16 $\alpha$ -carbo-nitrile. *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1492-1494 (1977).
- 11) Glotzbach, R. K. & Preskorn, S. H.: Brain concentrations of tricyclic antidepressants: Single-dose kinetics and relationship to plasma concentrations in chronically dosed rat. *Psychopharmacology*, **78**, 25-27 (1982).
- 12) Baumann, P., Gillars, J. M., Jonzier-Perey, M., Gerber, C. & Bouras, C.: Evaluation of the levels of free and total amitriptyline and metabolites in the plasma and brain of the rat after long-term administration of doses used in receptor studies. *Psychopharmacology*, **84**, 489-495 (1984).
- 13) 岸谷和之・倉田孝一・木戸日出喜・倉知正佳・山口成良: 生物学的精神医学最近の進歩 (難波益之編), 367-370頁, ヘスコインターナショナル, 東京, 1985.
- 14) Beaubien, A. R. & Pakuts, A. P.: Influence of dose on first-pass kinetics of <sup>14</sup>C-imipramine in the isolated perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.*, **7**, 34-39 (1979).

**Measurement of Tricyclic Antidepressants in Serum and Brain Tissue by High-performance Liquid Chromatography** Kouichi Kurata, Hisakazu Furuta, Hideki Kido, Kazuyuki Kishitani and Nariyoshi Yamaguchi, Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — Juzen Med. Soc., 95, 664–669 (1986)

**Key words :** measurement, antidepressant, high-performance liquid chromatography

#### Abstract

A routine method for determination of tricyclic antidepressants (TCA) was studied. Thereafter, the time courses of imipramine (IP) and desipramine (DP) concentrations in the brain and serum were studied in rats after the administration of IP hydrochloride (15 mg/kg, sc). Separation and quantitation for TCA were performed by reversed-phase high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection at 254 nm. Clomipramine was used as an internal standard. A high degree of linearity of standard curve for each TCA compound was obtained by this method. The recovery rates of IP and DP were  $100 \pm 2.0\%$  (mean  $\pm$  S.D.) and  $97.9 \pm 3.1\%$  from the human serum,  $97.3 \pm 3.2\%$  and  $98.8 \pm 3.2\%$  from the rat serum and  $96.9 \pm 5.2\%$ , and  $97.7 \pm 6.0\%$  from the brain homogenate, respectively. In a kinetic study of the rats, the results were as follows. IP was rapidly dispersed through the rat body within 30 minutes of the injection, and thereafter, its serum levels declined with a half-life of 72 minutes. Its brain concentration showed a maximum value at 30 minutes and then declined in accordance with the decrease of its serum level, while the concentrations of DP, an active metabolite of IP, rapidly increased in both the serum and brain within 30 minutes. Subsequently its concentration in both tissues gradually increased within 180 minutes. The brain : serum concentration ratio of IP and DP appeared as constant values 30 minutes after the injection. The former was  $44.1 \pm 13.3$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n=16$ ), and the latter was  $20.4 \pm 5.3$  ( $n=16$ ).