

カラムスイッチング HPLC システムによるゾニサミドの 高感度測定法の評価†¹

金 明姫†², 西尾 忠†³, 嶋田 努†³, 竹田和喜†³, 横川弘一†³, 宮本謙一*†³
延辺大学医学院附属病院薬剤部†²
金沢大学医学部附属病院薬剤部†³

Evaluation of a Highly Sensitive Measurement Method of Zonisamide by an HPLC System with Column-Switching†¹

Meiki Kim†², Tadashi Nishio†³, Tutomu Shimada†³, Kazuki Takeda†³,
Koichi Yokogawa†³ and Ken-ichi Miyamoto*†³

Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Yan bian University†²

Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Kanazawa University†³

{ Received August 29, 2002
Accepted November 17, 2002 }

A fully automated high-performance liquid chromatography system with column-switching was evaluated to determine the concentration of zonisamide (ZNS) in human plasma. After the plasma sample was diluted to 10-times with the mobile phase, the sample (10 μL) was injected into the column-switching system without pre-treatment. ZNS was detected by ultraviolet absorption at 246 nm. The calibration curve of ZNS was linear and ranged from 1.57 to 50 μg/mL of plasma. The coefficients of variation in the within-run (n = 5) and the between-run (5 days) precisions of ZNS were below 5 %. The limit of quantification was 0.5 μg/mL in 1 μL of human plasma. A good correlation was found between the data obtained by this system and the ELISA system using Markit-M Excegran (r = 0.956) or the solid-phase-extraction HPLC method (r = 0.985). This system for ZNS is thus considered to be a very useful measurement for therapeutic drug monitoring because of its high sensitivity, rapidity and low cost compared with other measurement systems.

Keywords — zonisamide, HPLC, column-switching

緒 言

抗てんかん薬ゾニサミド(ZNS)は、非線形性の薬物動態を示すことから、患者個々の血漿中濃度を測定し、TDM(Therapeutic drug monitoring)を行う必要がある¹⁻³⁾。一方で、ZNSの血漿中濃度の治療有効領域が明確でな

くTDMの必要性が疑問視されている^{4,5)}。しかし、わが国ではZNSの血漿中濃度測定による特定薬剤治療管理料も認められており、現段階では血漿中ZNS濃度と有効効果あるいは副作用発現との関係の有無を決定するためにも、データの蓄積が必要と考えられる。

そのためには、TDM業務において、ZNSの血漿中濃

†¹ 本研究は、一部日中笹川医学研究者制度の助成によるものである。

†² 吉林省延吉市局子街119; 119, Kyokusi-machi, Enkitu-shi, Kiturin-syou, 133000 China

†³ 石川県金沢市宝町13-1; 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa, 920-8641 Japan

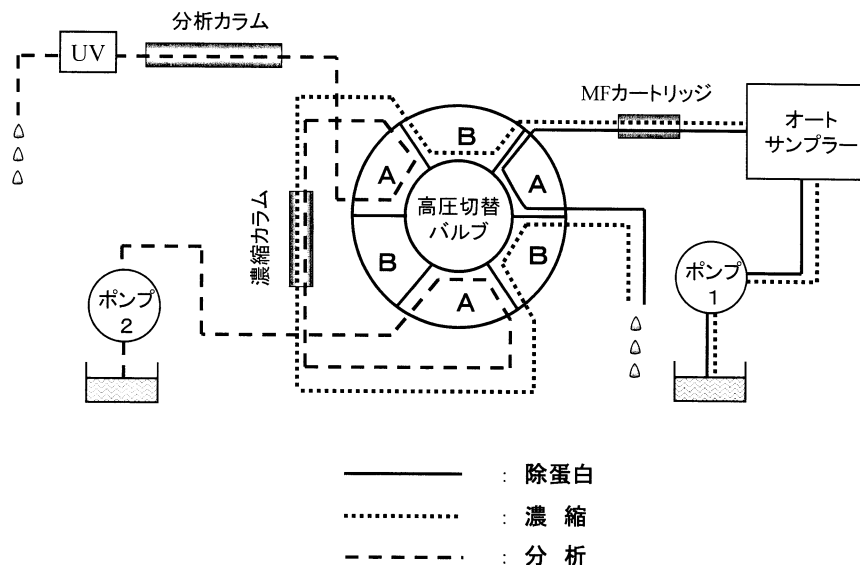


図1. 薬物分析カラムスイッチング HPLC システム

度測定 of 正確さと迅速さが要求される。現在、ZNS の測定法には、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法⁶⁾があるが1検体あたりのコストの面で、また、固相抽出による HPLC 法⁷⁻⁹⁾では、生体試料の前処理をしなければならないという問題点があった。そこで、患者の血漿サンプルを前処理なしで HPLC のオートサンプラーに注入するだけで、血漿中薬物濃度の測定可能なカラムスイッチングを接続した HPLC システムを用いた定量法について検討した。このカラムスイッチング HPLC システムによる測定法は、ワルファリン¹⁰⁾、テオフィリン、フェノバルビタール、フェニトイン¹¹⁾などに適用され、すでに報告されている。著者らは、この方法を ZNS の血漿中濃度測定に適用し、測定感度、迅速性、ランニングコストの面から、臨床における TDM に適用が可能かを評価した。

方 法

1. 分析機器

HPLC システムには、送液ポンプ(LC-10ADvp, LC-9A, 島津製作所), コントローラ(SCL-10Avp, 島津製作所), オートインジェクタ(SIL-10ADvp, 島津製作所), フォトダイオードアレイ(SPD-10Avp, 島津製作所), カラム恒温槽(CTO-10ASvp, 島津製作所), データ解析末端(C-R 8A, 島津製作所)を用いた。カラムスイッチングシステムには、高圧切替六方バルブ(資生堂)を用いた。前処理カラムは CAPCELL PAK MF カートリッジ (4.0mm i.d. ×10mm, 資生堂), 濃縮カラムは CAPCELL PAK C₁₈UG120 S5 (2.0mm i.d. ×35mm, 資生堂), 分析カラムは CAPCELL PAK C₁₈MG 5 μm (1.5mm i.d. ×150

mm, 資生堂)を用いた(図1)。

2. 試薬

ゾニサミド原末は、大日本製薬(株)より提供された。リン酸水素ナトリウムおよびリン酸二水素カリウム(和光純薬工業(株))は、特級試薬を用い、アセトニトリルとメタノール(和光純薬工業(株))は高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた。

3. 分析条件

除蛋白と濃縮過程のための移動相 I には、0.1M リン酸緩衝液(pH 7):アセトニトリル(200:1 v/v)を、分析保持過程のための移動相 II には、0.1M リン酸緩衝液(pH 7):アセトニトリル(8:3 v/v)を用いた。分析カラムは、カラムオープン中40℃に保持した。ZNS は波長246nm で測定した。患者からの血漿サンプルは、移動相 I で10倍に希釈して測定した。

4. 検量線

ZNS の検量線は、原末をメタノールで 5 mg/mL になるように溶かし、これを血漿で 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 および 1.56 μg/mL の濃度に希釈して作成した。

5. 対象患者および採血条件

ZNS (エクセグラン®, 大日本製薬(株)(服用量30~400mg/day)の血漿中濃度測定は、本院の神経科精神科, 脳神経外科, 小児科で ZNS 単独あるいは他の抗てんかん薬(フェニトイン, フェノバルビタール, カルバマゼピン, バルプロ酸ナトリウム)を併用している患者(年齢4カ

月～75歳)を対象とした。いずれの場合も薬剤を2週間以上継続服用し、血漿中ZNS濃度がすでに定常状態に達している時点で、朝服用直前に採血した。

6. 他の血漿中ZNS濃度測定法

ELISAシステムによる血漿中ZNS濃度測定は、測定装置にELISAの操作を全自動化したオムニ(BT-9000, BIO-TEK社)を使用した⁶⁾。測定試薬にはマーケットM-エクセグラン(大日本製薬(株))の市販キットを用いた。

従来のHPLCによる血漿中ZNS濃度測定は、Furunoら⁸⁾の方法に準じた固相抽出法を用いて行った。

結 果

カラムスイッチングシステム(図1)は3段階に分けて、血漿中の除蛋白、薬物の濃縮、分析を行う。第1段階として、スイッチAに切り替えて、ポンプ1で移動相Iをサンプルと一緒にMFカートリッジに通して、血漿中蛋白質を除去し、薬物だけをMFカートリッジに保持させる。第2段階ではスイッチをAからBに切り替えて、移動相Iをポンプ1からMFカートリッジを通し薬物をMFカートリッジから溶出させ、その薬物を濃縮カラムで濃縮させる。第3段階ではスイッチをBからAに戻し、移動相IIを用いて、ポンプ2により濃縮カラムで濃縮された薬物を溶出し、分析カラムで薬物を分離し、UV検出器により分析を行う。

第1段階は、ポンプ1、オートサンプラー、MFカートリッジ、UV検出器の順序で接続し、除蛋白の条件を検討した。移動相Iには0.1Mリン酸緩衝液(pH7):アセトニトリル(200:1)を用い、流速0.2mL/minで、ZNSの血漿サンプル(1 μ g/mL)を1 μ L注入し、20分間測定を行った。図2(a)に示すようにZNSのピークは4.0分で検出され、血漿のピークと良好に分離されていることから除蛋白時間を2.5分間に設定した。

第2段階はポンプ1、オートサンプラー、MFカートリッジ、濃縮カラム、UV検出器の順序で接続し濃縮条件を検討した。移動相Iの流速は0.2mL/minで、1 μ g/mLの血漿サンプルを1 μ L注入し、除蛋白時間を2.5分に設定し、濃縮時間を3、5および20分間の3条件で検討した。図2(b)には、濃縮時間を20分間にした場合を示したが、濃縮時間を変更しても、いずれの場合も同様にZNSのピークが検出されなかった。したがって、3条件ともZNSは濃縮カラムに十分濃縮されていることが確認された。しかし濃縮時間が3分間ではZNSがMFカートリッジから十分に流出されずに、またスイッチAに切り替わり、ZNSが排除されてしまう可能性があっ

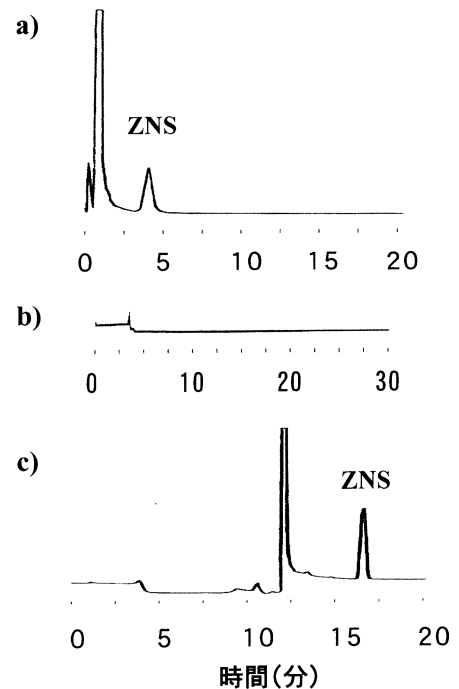


図2. 除蛋白(a)、濃縮(b)および分析(c)過程におけるZNS添加時の血漿クロマトグラム

た。また濃縮時間が20分間では一つのサンプルを測定するのに時間がかかるため濃縮時間を5分に設定した。

第3段階では、濃縮されたZNSを完全に流出させる移動相IIの組成およびZNSの保持時間について検討した。移動相を0.1Mリン酸緩衝液(pH=7):アセトニトリル(8:3)で、流速を0.1mL/minにした時、図2(c)に示すように16.5分に単離されたZNSのシャープなピークが検出された。

以上の設定条件により、検量線および患者の血漿サンプルの測定精度について検討した。血漿サンプルは、移動相Iで10倍に希釈し、前処理なしでHPLCに10 μ Lを注入した。まず、ZNSの検量線(1.57~50 μ g/mL)を作成したところ、図3に示したように検量線は、相関係数1.00と良好な直線性が得られた。表1には、検量線の同時再現性(n=5)および5日間の日差再現性を示したが、変動係数(CV)はいずれの場合も5%以下であることから十分な再現性が確認された。

実際に本院に通院している30名のZNS服用患者の血漿中ZNS濃度をELISA法とカラムスイッチングシステムを使って測定し、両者の相関性を図4に示した。その結果、 $r=0.956$ となり良好な相関性が得られた。

また、前処理を行う従来の固相抽出によるHPLC法⁶⁾で測定した患者の血漿中濃度とカラムスイッチングシステムを使って測定した濃度の相関性を図5に示した。

その結果 $r=0.985$ となり良好な相関性が得られた。

表1. カラムスイッチング HPLC システムによる ZNS の同時再現性
および日差再現性

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	同時再現性		日差再現性	
	ピーク面積	変動係数(%)	ピーク面積	変動係数(%)
50.0	354100 \pm 14100	3.98	361100 \pm 14200	3.94
25.0	177600 \pm 5300	2.96	180300 \pm 5400	3.01
12.5	86100 \pm 3500	4.07	83600 \pm 3600	4.28
6.25	39800 \pm 1600	3.94	41000 \pm 1700	4.15
3.13	19300 \pm 500	2.79	20100 \pm 600	3.00
1.57	9500 \pm 400	3.87	9400 \pm 400	4.48

各値は5回の測定結果の平均値 \pm 標準偏差を示す。

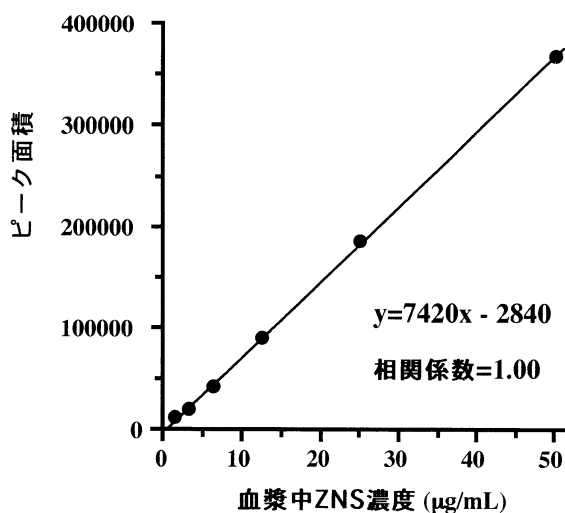


図3. カラムスイッチング HPLC システムによる血漿中 ZNS の検量線

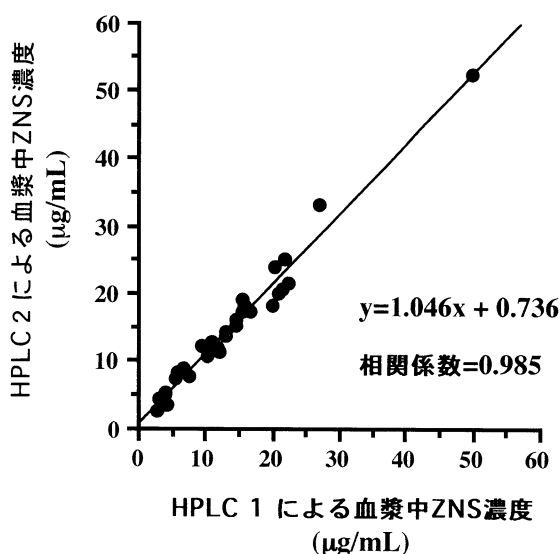


図5. 固相抽出 HPLC 法(HPLC 2)とカラムスイッチング HPLC システム法(HPLC 1)による患者の血漿中 ZNS 濃度の相関性

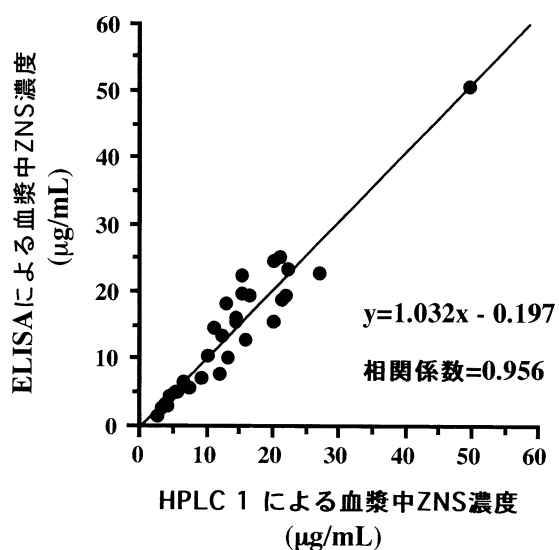


図4. ELISA 法とカラムスイッチング HPLC システム法(HPLC1)による患者の血漿中 ZNS 濃度の相関性

考 察

著者らは、カラムスイッチングシステムを用いた HPLC 法により、高感度・高精度でしかも迅速に測定可能な ZNS の血漿中濃度測定法を確立した。従来の ELISA 法では1検体あたりのランニングコストが高く、HPLC 法では血漿サンプルの前処理に時間と労力を費やす必要があった。この方法は、ELISA 法⁶⁾や蛍光偏光免疫測定法(TDX, ダイナボット株)と同様に、前処理の過程を省くことができる面では、TDM に実用的な方法といえる。

しかし、この方法では、カラムスイッチングシステムの第一段階に除蛋白過程はあるものの、血漿サンプルを除蛋白しないで直接 HPLC へ注入するために、その後の分析カラムが目詰まりする懸念がある。図2 (a)に示

表 2. 1 検体あたりの血漿中 ZNS 濃度測定条件

	HPLC1 ^{a)}	HPLC2 ^{b)}	ELISA ^{c)}
必要血漿サンプル量(μL)	1	20	10
最少検出限界 (μg/mL)	0.5	0.1	1.0
測定時間(分)	20	40	90
ランニングコスト(円) ^{d)}	340	950	8860

^{a)}カラムスイッチングHPLC, ^{b)}固相抽出HPLC, ^{c)}マーカーキットM-エクセグラン

^{d)}本院における年間ZNS測定件数 138件を基準として算出した。

したように、除蛋白の時間は十分かけた方が良いが、ZNSの流出が始まり、定量性が悪くなるので2.5分で次の濃縮過程に切り替えた。50検体を注入したが、カラム圧は90から160Kgfに上昇した。そこで、本研究では検量線および患者の血漿サンプルを移動相Iで10倍希釈した後、10μLをHPLCに注入し測定した。このように血漿を10倍希釈することにより、200検体を注入したが、カラム圧はほとんど上昇することはなかった。

また、このシステムは高感度測定が可能であり、検出限界は血漿サンプル量1μLで0.5μg/mLであった。Furuno⁶⁾の固相抽出のHPLC法の検出限界は、血漿サンプル量20μLで0.1μg/mLであった。カラムスイッチングHPLCシステム法では、極めて少量のサンプルで高感度測定が可能な理由として、サンプルの濃縮過程の存在と、そこからの移動相の流速が0.1mL/minと常法のHPLCの1mL/minに比較して、1/10と遅いことが挙げられる。

臨床では、ZNSと他の抗てんかん薬との併用療法が多く行われている。そこで、このシステムによるZNS測定におよぼす他の抗てんかん薬の影響を検討した。まず、分析第1段階の除蛋白過程に必要な時間設定を確実にすることによって生体成分の影響は、まったく見られなかった。また、併用薬物は、分析第1段階である程度分離することができる。今回のZNSの測定条件において、第1段階でZNSとほぼ同時4.2分に流出するフェノバルビタールは、最終過程の分析カラムにより分離可能であった。第1段階でZNSよりも遅く15分に流出するカルバマゼピンは、分析第2段階へ流入されずに、ZNSの分析中にシステム外へ排除された。また、第1段階で極端に遅く60分前後に緩やかに流出するフェニトインでは、最終過程の分析カラムで、オートサンプラーを用いて連続測定する時に、サンプル3本目あたりにピークが混在して出現する可能性がある。しかし、実際には第1段階および第2段階で、ほとんどシステム外に排除されるため最終過程の分析カラムには、高濃度で検討した場合でも、ピークとして確認することはできなかった。述

べたように、このシステムでは分離過程が3段階になっており、併用薬物による影響はまれであると考えられる。しかし、抗てんかん薬以外の薬物を併用している患者の血中ZNS濃度測定時には、併用薬物の影響を検討する必要があり、ELISA法やTDX測定法に比較して留意すべき点であると思われる。

また、このシステムによる患者30名の血漿中ZNS濃度をその他の測定方法と比較したところ、ELISA法あるいは固相抽出HPLC法では、相関係数が0.956あるいは0.985といずれも良好な関係が得られた。本院における血漿中ZNS濃度測定検数は、年間138件である。これら3つの測定方法における1検体当たりの検出限界、要する測定時間およびランニングコストを表2に一覧にして示した。本法は、他の測定法に比較して、高感度かつ迅速な定量、しかも低ランニングコストであり、実際のTDMにより貢献できるものと考えられた。

結論として、カラムスイッチングシステムを用いることにより血漿サンプルをHPLCの移動相で希釈するだけで感度よく測定できることから、今後のZNSの血漿中濃度測定における有用な分析手段になると考えられる。

引用文献

- 1) J. G. Wagner, J. C. Sackellares, P. D. Donofrio, S. Berent, E. Sakmar, Nonlinear pharmacokinetics of CI-912 in adult epileptic patients, *Ther. Drug Monit.*, **6**, 277-283 (1984).
- 2) J. C. Sackellares, P. D. Donofrio, J. G. Wagner, B. Abou-Khalil, S. Berent, K. Aasved-Hoyt, Pilot study of zonisamide (1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) in patients with refractory partial seizures, *Epilepsia*, **26**, 206-211 (1985).
- 3) A. J. Wilensky, P. N. Friel, L. M. Ojemann, C. B. Dodrill, K. B. McCormick, R. H. Levy, Zonisamide in epilepsy: a pilot study, *Epilepsia*, **26**, 212-220 (1985).
- 4) E. Perucca, Is there a role for therapeutic drug monitoring of new anticonvulsants?, *Clin. Pharmacokin.*, **38**, 191-204 (2000).

- 5) T.A. Glauser, C.E. Pippenger, Controversies in blood-level monitoring reexamining its role in the treatment of epilepsy, *Epilepsia*, **41**, Suppl 8, S 6-15 (2000).
- 6) 石崎純子, 横川弘一, 中島恵美, 古田壽一, 越野好文, 関秀俊, 谷口昂, 長谷川光広, 山下純宏, 市村藤雄, 全自動 ELISA システムによるゾニサミドおよびハロペリドールの血漿中濃度測定, 病院薬学, **23**, 358-363 (1997).
- 7) D.J. Berry, Determination of zonisamide (3-sulphamoylmethyl-1,2-benzisoxazole) in plasma at therapeutic concentrations by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, **534**, 173-181 (1990).
- 8) K. Furuno, R. Oishi, Y. Gomita, K. Eto, Simple and sensitive assay of zonisamide in human serum by high-performance liquid chromatography using a solid-phase extraction technique, *J. Chromatogr. B.*, **656**, 456-459 (1994).
- 9) M. Nakamura, K. Hirade, T. Sugiyama, Y. Katagiri, High-performance liquid chromatographic assay of zonisamide in human plasma using a non-porous silica column, *J. Chromatogr. B.*, **755**, 337-341 (2001).
- 10) 栗原祐子, 上杉恵三, 栢野正則, 土肥口泰生, 深山伸行, セミマイクロカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーカラムスイッチングシステムによるヒト血清および血清限外ろ過液中のワルファリンの定量, 病院薬学, **25**, 169-175 (1999).
- 11) 鈴木吉成, 山本知広, 勝又美由紀, 野田正栄, 橋本久邦, 安藤英治, 薬毒物分析 LC システムの定量への応用, TDM 研究, **18**, 343-348 (2001).