

〈抄録〉 第21回 日本臨床薬理学会年会 2000年9月28~29日 札幌

## カラムスイッチング法による抗うつ薬 フルボキサミンの微量分析法の開発

鈴木吉成\* 加藤安宏\* 内田信也\*  
影山由紀子\* 橋本久邦\*

### 目的

選択的セロトニン再取り込み阻害作用を持つ抗うつ薬フルボキサミン (FLX) の薬物血中濃度測定においてはng単位の微量分析が求められている。これまでに幾つかの報告があるが、UV検出器を用いた簡便な方法を開発するため、今回、固相抽出法あるいは有機溶媒抽出法と、カラムスイッチング法とを組み合わせた高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) により高感度定量法を検討した。

### 方法

HPLCは送液ポンプ (島津 LC-9A) 2台、システムコントローラ (島津 SCL-6B)、オートインジェクター (島津 SIL-6B)、UV検出器 (日立)、高圧バルブ (島津 FCV-2AH)、低圧バルブ (島津 FCV-3AL)、カラム恒温槽 (島津 CT0-6A)、溶媒脱気装置 (島津 DGU-12A DEGASSER)、データ解析端末 (島津 Chromatopac C-R4A) を有している。前処理カラムはShim-pack SPC-RP3、分析カラムはShim-Pack CLC-CN(M) 4.6×250mmを用いた。

分析条件は、移動相に0.01Mリン酸緩衝液pH6.8 アセトニトリル : MeOH (100:123:40 v/v) 混液を用い、流速1.0ml/min、カラム温度50℃、UV測定波長は254nmとした。前処理カラムの洗浄用溶媒は0.01Mリン酸緩衝液pH6.8とし、流速は0.3ないし

0.5ml/minとした。試料の抽出は以下の2つの方法を検討した。

A) 固相抽出法 : Oasis HLB 3cc抽出カートリッジ (Waters) を用いた。その抽出方法は操作マニュアルに従った。すなわち、血漿1mlに内部標準物質 (IS) クロミプラミン20μg/ml MeOH溶液10μl添加、混和後、コンディショニングしたHLBカートリッジに注入し、5%MeOH溶液2mlで洗浄後、MeOH2mlで溶出し、室温、窒素気流下乾固後、移動相200μlに再溶解させ、その100μlをHPLCに注入した。

B) 有機溶媒抽出法 : 血漿1mlにIS20μg/ml溶液10μlおよび0.2MKCl含有0.2MNaOH溶液1mlを加えてアルカリ化し、n-heptan-1.5%isoamyl alcohol 4mlを加え、20sec攪拌後、1500rpmで10min遠心した。有機層を分取し、0.1M HCl溶液1ml添加、20sec攪拌後、1500rpmで10min遠心した。有機層を除去し、さらに0.2M KCl含有0.2M NaOH溶液1mlおよびn-heptan-1.5%isoamyl alcohol 3mlを加え、20sec攪拌後、1500rpmで10min遠心した。有機層を分取し窒素気流下乾固後、A法と同様にしてHPLCに付した。

ヒト血漿添加検量線は各濃度のFLX MeOH溶液10μlをヒト血漿990μlに加え、最終濃度が10, 25, 50, 100, 200ng/mlになるように調製した。その後、試料抽出方法 (A, B) と同様の操作をした。

再現性はB法で行った。すなわちヒト血漿990μlにFLX MeOH溶液10μlを加え、最終濃度が10, 50, 200ng/mlになるように各濃度6試料調製した。以降検量線作成と同様にIS MeOH溶液10μl添加し、抽出後HPLCにて定量した。

\* 浜松医科大学医学部附属病院薬剤部  
〒431-3192 浜松市半田町 3600

FLX回収率を求めため、移動層190 $\mu$ lに上記3濃度のFLX MeOH溶液10 $\mu$ lを添加し、直接HPLCに付してFLXピーク面積を求め(各2回測定し平均値を使用)、再現性試験で得られたFLXのピーク面積と比較した。

### 結果

前処理カラムに試料を付加後、0.01Mリン酸緩衝液(pH6.8)でA法:流速0.5ml/min、4.0min、B法:流速0.3ml/min、1.5min洗浄することによりFLX、ISとも血漿由来の妨害ピーク無しに分離できた。カラムスイッチング後からの実質保持時間はA法でそれぞれ9.1および13.5min、B法でそれぞれ9.5および14.5minであった。ISに対するFLXの面積比(Y)、FLX濃度X(ng/ml)としたときの検量線はA法で $Y=0.0052X+0.0318$ 、相関係数0.997であり、B法で $Y=0.0045X+0.0312$ 、相関係数0.994であった。いずれも検出限界は5ng/mlであった(Fig. 1)。

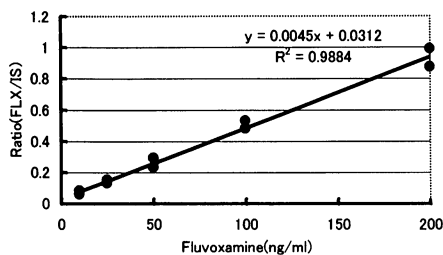


Fig.1 Standard curve (Method B)

B法におけるヒト血漿添加再現性(平均 $\pm$ SD、CV%)は10ng/mlで $6.8 \pm 0.77$ 、11.4%、50ng/mlで $51.4 \pm 4.82$ 、9.4%、200ng/mlで $213.2 \pm 14.14$ 、6.6%であった。またB法におけるピーク面積によるFLX添加回収比(平均 $\pm$ SD、CV%)は10ngで $0.68 \pm 0.091$ 、13.4%、50ngで $0.50 \pm 0.059$ 、11.6%、200ngで $0.52 \pm 0.038$ 、7.3%であった。

### 考察

固相抽出法はPalego L.<sup>1)</sup>らの方法に従って検討した。C18逆相カートリッジであるSep-pak (Waters)による抽出後、移動層に再溶解させた試料を0.45 $\mu$ m Millex-LHフィルター(MILLIPORE)で濾過しHPLCに付したが、時に目詰まりすることがあった。そこでOasis HLBカートリッジに変更したが同様に目詰まりすることがあった。このことより血漿成分の洗浄が不十分であることが示唆された。次に、Belmadani A.ら<sup>2)</sup>やWong SH.ら<sup>3)</sup>の方法に

従いアルカリ性有機溶媒による抽出を行った。両者ともさらに希塩酸または希リン酸で逆抽出し、そのままHPLCに付している。この方法では最終FLX濃度が薄く感度が不十分であったので、今回はさらに濃縮するため再びアルカリ性下有機溶媒にて抽出、有機層を分取し、窒素気流下乾固させることにより十分な感度を得ることができた。Lucca A.ら<sup>4)</sup>は有機溶媒で抽出後、dansyl chlorideと反応させ、蛍光検出器により5ng/mlまで定量可能としている。今回の著者らの結果では検出限界は5ng/mlであったが、フロントピークが小さく、狭雑物質が無いため血漿試料を増やして抽出・濃縮し、最終的にHPLCに注入する濃度を高くすることにより5ng/ml以下の検出も可能であることが示唆された。

### 結論

FLXのHPLC、UV検出器での定量は有機溶媒抽出法とカラムスイッチング法とを組み合わせることにより10~200ng/mlで良好な直線性が得られ、検出限界は5ng/mlであった。

### 文献

- 1) Palego L., et al. Simultaneous plasma level analysis of clomipramine, N-desmethyloclomipramine, and fluvoxamine by reversed-phase liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 2000;22:190-4.
- 2) Belmadani A., et al. High performance liquid chromatography with ultraviolet detection used for laboratory routine determination of fluvoxamine in human plasma. *Human & Experimental Toxicology* 1995;14(1):34-7.
- 3) Wong SH. Determination of fluvoxamine concentration in plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 1994;8(6):278-82.
- 4) Lucca A., et al. Simultaneous determination of human plasma levels of four selective serotonin reuptake inhibitors by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 2000;22:271-6.