

HPLCによるヒト血清中ピルメノール濃度測定条件及び試料保存方法の検討

浅野順治,^a 小島雅和,^b 関沢祐一,^a 大江利治,^a 宮本憲行,^c
鈴木喜之,^c 甲谷哲郎,^c 小林道也,^b 齊藤浩司^{*,b}

An Approach to Complete the Manual for Determination of Serum Pirmenol Levels

Junji ASANO,^a Masakazu KOJIMA,^b Yuichi SEKIZAWA,^a Toshiharu OOE,^a Noriyuki MIYAMOTO,^c
Yoshiyuki SUZUKI,^c Tetsuro KOHYA,^c Michiya KOBAYASHI,^b and Hiroshi SAITOH^{*,b}
*Department of Pharmacy,^a Department of Cardiovascular Medicine,^c Sapporo Medical Center NTT East,
South 1, West 15, Chuo-ku, Sapporo 060-0061, Japan and Department of Pharmaceutics, Faculty
of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido,^b
1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan*

(Received June 29, 2003; Accepted September 2, 2003; Published online September 2, 2003)

In order to complete TDM manual for pirmenol in Sapporo Medical Center NTT East, we developed HPLC method and pretreatment procedure for pirmenol samples obtained from patients. Serum (250 μ l) was alkalized and pirmenol was extracted into *n*-hexane, and then the drug was again extracted into an acidic solvent, 0.044 M KH_2PO_4 (pH 2.6) including 0.5% triethylamine. The aqueous extract was used for quantitative determination of the drug by HPLC. The mobile phase consisted of the above acidic solvent-acetonitrile (5 : 1, v/v) was delivered at 45°C with a flow rate of 1 ml/min through a 4.6 mm \times 25 cm ODS-3, a reversed-phase column. Detection of pirmenol and the internal standard (disopyramide) was achieved at 263 nm. Pirmenol and disopyramide was eluted at 5 and 11 min, respectively. Assay limit (25 ng/ml) and accuracy of the analytical method were satisfactory for TDM of pirmenol. During the HPLC analysis of patient samples, no substances that interfered with pirmenol detection were found. It was shown that 1) hemolysis did not affect pirmenol assay at all, 2) pirmenol was stable in the blood samples for at least 24 h even if they were stood at room temperature, and 3) pirmenol was stable for at least 3 days in frozen serum but there significant decrease was observed in pirmenol concentration after 7 days.

Key words—pirmenol; TDM; HPLC; assay manual; serum levels

緒 言

抗不整脈薬は血中濃度に基づいた適切な治療管理を行うことが望ましいとされ、¹⁾ これまでリドカイン、プロカインアミド、キニジン、ジソピラミドにおいて広く治療薬物モニタリング (TDM) が行われてきた。クラス Ia に属する抗不整脈薬であるピルメノールは、他の抗不整脈薬が無効である頻脈性不整脈に著効を示す。^{2,3)} 他の抗不整脈薬と同様に本剤に対しても 2000 年 4 月から特定薬剤治療管理料が設定された。しかしながらピルメノールの抗不整脈効果は血中濃度に相関すると言う報告がいくつかあるものの、^{4,5)} TDM による治療効果のモニタリン

グに関する情報はまだまだ少ないのが現状である。

現在、特定薬剤治療管理の対象となる薬物の血中濃度測定には、市販キットを用いた簡便な酵素免疫測定法が繁用されている。しかしながら、ピルメノールの場合にはこのような測定法がいまだ適用されていないことから、その TDM には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの特殊な機器を使用して行う必要がある。HPLC による血中濃度測定に際しては、採取された血液試料の前処理操作が必須であり、場合によっては煩雑な抽出操作を伴うこともある。したがって測定担当者にはこれに対する相応の知識と技能が要求されることになる。また HPLC による正確な測定を実施するためには、精度や再現性に優れた定量法を各医療施設の実状に応じて確立することが重要である。さらに試料の保存条件は測定薬物の安定性に重大な影響を及ぼすこと

^{a)}NTT 東日本札幌病院薬剤科, ^{b)}北海道医療大学薬学部薬剤学教室, ^{c)}NTT 東日本札幌病院循環器内科
e-mail: saitoh@hoku-iryo-u.ac.jp

があるため、最適な保存法や取り扱い方法を構築することも必須となる。NTT 東日本札幌病院ではこれまでピルメノールの血中濃度測定を外部機関に委託して行ってきたが、総合的な患者ケアの一環として緊急時も含めピルメノール測定を薬剤科で迅速に実施し、治療計画に反映させることとした。そこで今回、当院薬剤科所有の HPLC システムによる血清中ピルメノール濃度の定量法と試料の保存条件について種々検討を加え、簡便な院内測定マニュアルの作成を試みた。

方 法

1. 試薬 塩酸ピルメノールの標準品は、ワーナー・ランバート株式会社より提供された。内標準物質として用いたジソピラミドは Sigma 社から購入した。またアセトニトリルは HPLC 用規格品（和光純薬）、*n*-ヘキサンは残留農薬試験用（和光純薬）、2 M 水酸化ナトリウム溶液は容量分析用（和光純薬）を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. HPLC によるピルメノール測定方法

2-1. HPLC 条件 使用した装置は日立 L-7100 シリーズ（L-7100 型ポンプ、L-7420 型 UV-VIS 検出器、L-7300 型カラムオープン、D-7500 型クロマトデータ処理装置）で、分析カラムとしては Inertsil ODS-3（4.6 mm i.d.×150 mm, GL Science 社）を用いた。移動相には溶液 A（0.5% トリエチルアミンを含む 0.044 M リン酸二水素ナトリウム溶液をリン酸で pH 2.6 に調整したもの）とアセトニトリルの混合液（5:1）を用いた。なお流速は 1 ml/min、測定波長は 263 nm、カラム温度は 45°C、注入量は 20 μ l とした。

2-2. 血清の前処理操作 血清は Chart 1 に示す方法で前処理操作を行い、HPLC の注入試料を得た。すなわち血清 250 μ l を遠心管に採り、これに精製水（250 μ l）と内標準液（25 μ l）を加えて混和した後、アルカリ性条件下でピルメノールを *n*-ヘキサン層中に抽出した。分取した *n*-ヘキサンに前述の溶液 A を添加して酸性条件下で振とう後、遠心分離を行い、ピルメノールを水層中に逆抽出した。この水層の一部を HPLC の注入試料とした。

3. ピルメノール測定に影響を及ぼす要因の検討

3-1. 溶血の影響 全血に 1 μ g/ml になるよう

血 清 250 μ l

精製水 250 μ l を添加
(検量線には精製水の代わりに同量の既知濃度ピルメノール溶液を添加)
ジソピラミド溶液 (28.7 μ g/ml) 25 μ l を添加
2M NaOH 50 μ l を添加
n-ヘキサン 3 ml を添加

混合液

ボルテックスにて振とう (2分間)
遠心分離 (1000 x g, 10分)

上 清 (*n*-ヘキサン層)

溶媒 A* 400 μ l を添加
ボルテックスにて振とう (2分間)
遠心分離 (1000 x g, 10分)
n-ヘキサン層を除去

水 層 (HPLC測定へ)

*0.5% トリエチルアミンを含む 0.044 M リン酸二水素ナトリウム溶液 (pH 2.6)

Chart 1. Procedure for the Assay of Pirmenol in Human Serum

にピルメノールを添加し標準試料とした。この標準試料の一部を試験管に取り、ボルテックスで激しく攪拌して溶血させた。その後、標準試料と溶血試料を遠心分離して得られた血清を Chart 1 に示すように処理し、ピルメノール濃度を測定した。

3-2. 室温放置の影響 1 μ g/ml となるようにピルメノールを添加した全血を試験管に分け、2 時間後、4 時間後、8 時間後まで室温と冷所 (4°C) に保存した。その後、遠心分離により得た血清を Chart 1 に示すように処理し、ピルメノール濃度を測定した。

3-3. 冷凍保存時の安定性 採血後、遠心分離により採取した血清にピルメノールを 1.0 μ g/ml となるように加え、250 μ l ずつ試験管に採り、-20°C で冷凍保存した。採血当日並びに冷凍後 1 日目、2 日目、3 日目、7 日後に各 6 本ずつを 4°C で解凍し Chart 1 に示すように処理して、ピルメノール濃度を測定した。

4. 臨床応用 ピルメノール服用中の患者 1 例より血液を採取し、Chart 1 に示す方法に準拠して血清中ピルメノール濃度を測定した。患者データを Table 1 に示した。

Table 1. Data of the Patient

性 別	女性
年 齢	70 歳
疾 患 名	# 1 洞不全症候群 # 2 心室性期外収縮
服 用 量	ピルメノール 200 mg/day (朝・夕食後) (H 14.8.5 より服用開始)
採血前最終服用時間	H 14.10.8 PM 7:00
採血時間	H 14.10.9 AM 5:00
併 用 薬	シンバスタチン (5 mg) 1 Tab 1×n 夕 アルプラゾラム (0.4 mg) 3 Tab 3×n

結 果

1. HPLC 法による血清中ピルメノールの測定法の検討

1-1. HPLC クロマトグラム Figure 1 にピルメノールとジソピラミドを添加した血清から得られたクロマトグラムを示した。ピルメノール及び内標準物質の保持時間はそれぞれ約 5 分, 11 分であり, 1 試料あたりの分析は 20 分以内に完了した。また, ピルメノール水溶液 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を繰り返して 3 回測定したところ, 得られたピーク面積の変動係数は 3.5%であった。

1-2. 検量線の検討 ヒトブランク血清にピルメノール濃度が 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 及び 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように標準物質を添加し, 標準液を調製した。これを Chart 1 に示す方法に従って処理した後 HPLC にて測定し, ピルメノールと内標準物質のピーク面積の比を求めて検量線を作成した。Figure 2 は, 異なる日に調製された標準液から作成した 7 本の検量線の平均値と標準偏差をプロットしたものである。検量線はほぼ原点を通る直線性を示し, 良好な相関性を示した。

また 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ におけるピーク面積はノイズ値に比べ 100 倍以上の値を示し, 本法が極めて高感度な定量法であることを確認した。

1-3. 種々の濃度における変動係数の検討 ピルメノール濃度が 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である標準試料をそれぞれ 5 本ずつ調製して定量を行い, 各濃度における変動係数を算出した。その結果 Table 2 に示すように, 各濃度における変動係数は 5~13%であった。

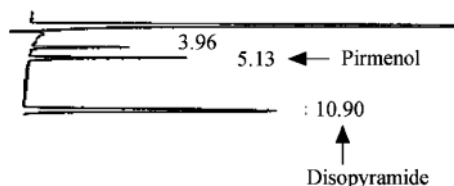


Fig. 1. HPLC Chromatogram Obtained from spiked serum. The concentrations of pirmenol and disopyramide were 1.0 and 28.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

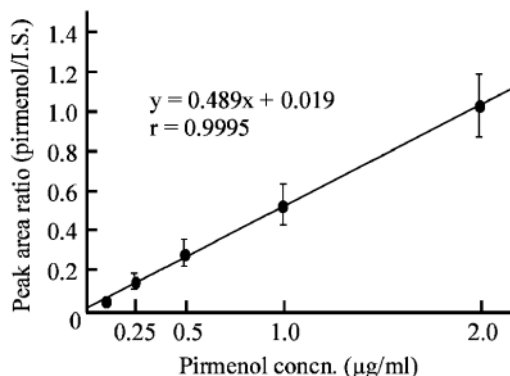


Fig. 2. Standard Curve for Pirmenol Assay
Mean \pm S.D. of 7 determinations.

Table 2. Reproducibility of Pirmenol Assay

Concn. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0
C.V. (%)	8.3	9.2	4.6	9.2	12.7

C.V. was calculated from 7 determinations.

2. ピルメノールの測定に影響を及ぼす要因の検討

2-1. 溶血の影響 ピルメノール添加後に溶血させた血液試料より血清を得, 標準血清中のピルメノール濃度との比較を行った。その結果, 両群の平均値において有意な差は見られなかった (Fig. 3)。この結果より, 血液試料が溶血した場合でもピルメノールの測定には影響のないことが示された。

2-2. 血清の保存条件の影響 室温又は冷所 (4°C) 保存下でのピルメノールの安定性を検討した (Fig. 4)。その結果, いずれの保存条件下においても 24 時間後まで Time 0 との間に有意な濃度変化は認められず, ピルメノールの分解はほとんど起こっていないことが示された。このことより, 採血後すぐに遠心分離が行えず, 血液試料を室温に放置し

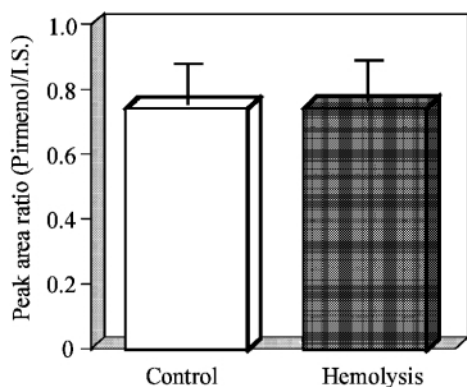


Fig. 3. Effect of Hemolysis on the Assay of Pirmenol
Mean with S.D. of 6 determinations.

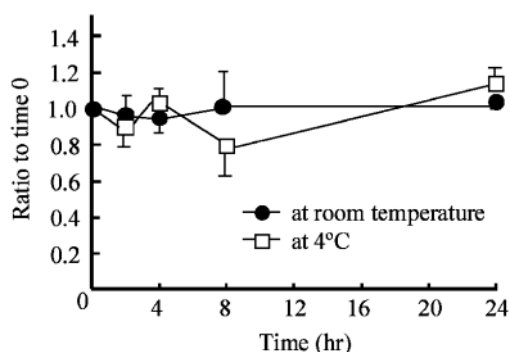


Fig. 4. Effect of Temperature on the Stability of Pirmenol in Blood
Mean \pm S.D. of 3 determinations.

てしまった場合においても、採血当日中であればピルメノールの測定結果には影響しないことが示唆された。

2-3. 冷凍保存時の安定性 Figure 5 に示すように、血清を冷凍保存した場合 3 日後までは有意な濃度変化は認められず、ピルメノールはこの間安定であることが示された。しかしながら、7 日後では凍結開始日に比べてピルメノール濃度が有意に低下したことから、長期間の冷凍保存は避けるべきであることが示唆された。

3. 患者試料の測定 ピルメノール服用中の患者 1 例の血液より血清を採取し、ピルメノールの血清中濃度を測定した。患者血清より得られた HPLC クロマトグラムを Fig. 6 に示した。ピルメノール及び内標準物質のピークは、内因性物質や併用薬であるシンバスタチン、アルプラゾラムの干渉を受けることなく良好に分離された。この患者にお

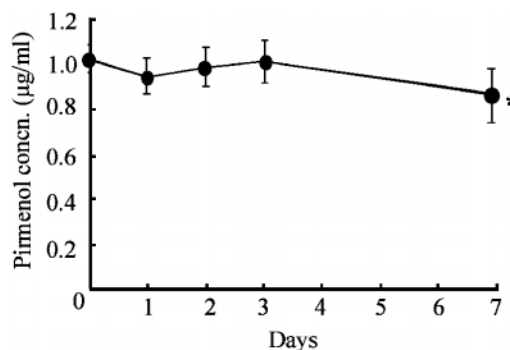


Fig. 5. Stability of Pirmenol in Frozen Serum
Mean \pm S.D. of 6 determinations.
* $p < 0.05$, significantly different from day 0.

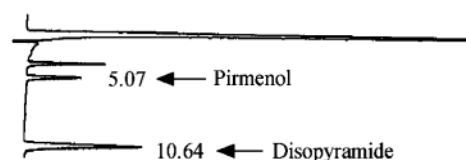


Fig. 6. HPLC Chromatogram Obtained from Patient's Serum after Oral Administration of Pirmenol

ける血清中ピルメノール濃度は $0.71 \mu\text{g/ml}$ と算出された。

考 察

ピルメノールはクラス I 群に属する他の抗不整脈薬に比べて安全性が高いとみなされているが、^{6,7)} 重大な副作用である房室ブロック、心室細動、心不全などには注意が必要である。さらにピルメノールは肝代謝を受け易い薬物であることから、種々の併用薬との相互作用にも留意する必要がある。⁸⁻¹⁰⁾ したがって今後使用頻度の増大に伴って、本剤の治療モニタリングは益々重要性を増すものと予想される。また、ピルメノールはラセミ体で投与されることから、活性体の体内動態に着目した治療モニタリングも必要になると考えられる。

最近、ピルメノールの治療モニタリングに心電図を用いた新たな方法も報告されたが、¹¹⁾ 医療現場では現在も HPLC を用いた TDM が主流である。そのためピルメノールの HPLC 測定条件に関しては多くの報告がある。¹²⁻¹⁶⁾ その一方で、正確な血中濃度の測定において重要な要因となる血液試料の保存条件や取り扱い方法に関する報告はほとんど見当たらない。そこで本研究では、新規な HPLC 定量

法の開発を目指すのではなく、従来の報告を参考にしながら NTT 東日本札幌病院の実状に即した HPLC 定量法を検討するとともに、患者試料の最適な取り扱い方法を構築することを目的とした。

種々の HPLC 定量法を比較検討した結果、ここでは血液試料の前処理操作及び HPLC の分析条件については Ichikawa らの方法¹⁵⁾が最も有用であると判断された。変更点としては、1) 血漿の代わりに血清を用いたこと、2) 定量に用いる容量を 250 μ l と少量化したことである (Chart 1)。このことにより、臨床検査用に採取された血液の一部を転用することでピルメノールの TDM が可能となった。したがって緊急時以外には TDM 用の血液試料を改めて採取する必要性がほとんどなく、患者に過度の負担を掛けることを回避できる。定量法におけるこの対応により、本法での定量限界は 25 ng/ml 前後となり、Ichikawa らが報告した 5 ng/ml には及ばないものとなった。しかしながら、ピルメノールの最小有効治療濃度は 0.5~1.5 μ g/ml と報告されており、¹⁷⁾ 本法の定量感度は臨床における TDM には十分であると考えられた。実際にピルメノールを服用中である 1 患者の血清中濃度を測定したところ、0.71 μ g/ml であった (Fig. 6)。

本法はピルメノールを塩基性条件下で *n*-ヘキサン層に抽出した後、酸性条件下で水層に逆抽出するという操作を含むために、変動係数がやや大きくなる傾向が見られたが、臨床応用上は特に問題はないと考えられた。しかしながら 1 試料につき検量線を濃度 5 点で作成して測定する際、コストは 100 円程度と安価であったが、総所要時間は約 4 時間であり、緊急時の対応に向けてはさらなる改良の必要があると判断された。

医療機関内において TDM を実施する場合に最も注意を要するのは、患者から採取された血液試料の取り扱いである。最も信頼度の高い測定結果を得るためには、採血後直ちに前処理操作を行いつつ速やかに HPLC 分析を実施することが必須である。しかしながら、採血を担当する看護師側の要因などにより、多くの場合そのような対応は不可能である。また前述したように、ここでは臨床検査用に採取された血液の一部を TDM に転用することを前提としていることから、採血から測定までに長時間が経過する場合も想定する必要がある。そこで本研究で

は、院内ピルメノール測定マニュアルの作成にあたり、患者から採取された試料の保存条件並びにその取り扱い方法を明確化するために 1) 採血時のトラブルにより血液試料が溶血した場合の測定値への影響、2) 採血後、血液試料が長時間室温で放置された場合のピルメノールの安定性、3) 再測定の必要性を踏まえて血清試料を長時間凍結保存する場合の測定値への影響の 3 点について検討を加えた。その結果、1) 溶血は測定に何ら影響を及ぼさないこと、2) ピルメノールは少なくとも採血後 24 時間までは室温放置下でも安定であること、さらに 3) 凍結保存時には 3 日以内に測定を実施する必要があることなどが明らかになり、今後ピルメノールの TDM を精度よく実施していく上で有用な知見を得ることができた。これらの知見は他の医療施設にも応用可能である。本研究で得られた知見を基に写真付きの測定マニュアルを作成し、現在活用中である。今後は種々の併用薬による測定への影響や測定者間での測定精度の変動などについてさらに検討を加え、ピルメノールの TDM 業務の充実化を図っていく予定である。

REFERENCES

- 1) Campbell T. J., Williams K. M., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 307-319 (1998).
- 2) Ellenbogen K. A., Roark S. F., Sintetos A. L., Smith M. S., McCarthy E. A., Smith W. M., Kates R. E., Pritchett E. L. C., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **42**, 405-410 (1987).
- 3) Garg D. C., Jallad N. S., Singh S., Ng K. F., Weidler D. J., *J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 812-817 (1988).
- 4) Janiczek N., Smith D. E., Chang T., Sedman A. J., Stringer K. A., *J. Clin. Pharmacol.*, **37**, 502-513 (1997).
- 5) Kasai H., Ueno K., Kusumoto M., Shibakawa M., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **55**, 77-78 (1999).
- 6) Hammill S. C., Shand D. G., Routledge P. A., Hindman M. C., Baker J. T., Pritchett E. L., *Circulation*, **65**, 369-375 (1982).
- 7) Hashimoto K., Watanabe K., Sugiyama A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **48**, 273-282 (1988).
- 8) Stringer K. A., Cetnarowski A. B., Goldfarb A., Lebsack M. E., Chang T., Sedman A. J., *J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 1094-1097 (1988).

- 9) Stringer K. A., Switzer D. F., Abadier R., Lebsack M. E., Sedman A., Chrymko M., *J. Clin. Pharmacol.*, **31**, 607–610 (1991).
- 10) Stringer K. A., Lebsack M. E., Cetnarowski-Cropp A. B., Goldfarb A. L., Radulovic L. L., Bockbrader H. N., Chang T., Sedman A. J., *J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 91–94 (1992).
- 11) Sutovsky I., Katoh T., Takayama H., Ono T., Takano T., *Circ. J.*, **67**, 195–198 (2003).
- 12) Johnson E. L., Pachla L. A., *J. Pharm. Sci.*, **73**, 754–756 (1984).
- 13) Janiczek N., Bockbrador H. N., Chang T., Amidon G. L., Smith D. E., *J. Chromatogr.*, **571**, 179–187 (1991).
- 14) Hoyer G. L., *J. Chromatogr.*, **565**, 497–503 (1991).
- 15) Ichikawa S., Mizusaki K., Sakano I., *J. Clin. Ther. Med.*, **11**, 903–908 (1995).
- 16) Ueno K., *J. Clin. Ther. Med.*, **12**, 351–358 (1996).
- 17) Johnson B. F., Haffajee C. L., Woodman T., Sloan K. L., *J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 401–405 (1988).