

高速液体クロマトグラフ法による 血漿中テオフィリンの測定

長谷川高明, 中埜末春, 須原清治
名古屋大学医学部付属病院薬剤部^{*1}

Determination of Plasma Theophylline Level by High-Pressure Liquid Chromatography

TAKA AKI HASEGAWA, SUEHARU NAKANO, KIYOHARU SUHARA

Pharmacy of Nagoya University Hospital^{*1}

In order to monitor the plasma theophylline level in asthmatic patients given aminophylline intravenously, the efficiency of high-pressure liquid chromatography in measuring the blood level was examined. This method requires only 200 μ l of serum or plasma sample. It also produces satisfactory results in view of the linearity of the standard curve, precision and analytical recovery within a therapeutic level. In the clinical application, an ampule of Neophyllin (Eisai) was injected into an asthmatic patient intravenously. The blood level of theophylline was about 15.6 μ g/ml immediately after the injection and decreased to a half level after one hour. The half-life thereafter was about 8 hours.

テオフィリンは急性・慢性気管支攣縮の疾患に気管支拡張剤として広く用いられ、その効果は広く認められているところであるが、一方、テオフィリンの静脈投与では種々の副作用が発現することもよく知られている。一般に、テオフィリンの治療有効濃度は約 10 μ g/ml であり、20 μ g/ml を超える場合には様々な副作用が発現するといわれている^{1,2,3)}。

テオフィリンの臨床効果は投与量ではなく、その血中濃度に左右されるので、有効かつ安全な治療を行うためには、その血中濃度を至適範囲内に保持するよう投与量、投与間隔、投与時間を調節し、監視する必要がある。そのためには血中テオフィリン濃度を迅速かつ正確に測定できることが必要である。

従来、テオフィリンの血清または血漿中濃度を測定する方法として、分光光度法⁴⁻⁶⁾、ガスクロマトグラフ法^{7,8)}による方法が報告されており、HPLC に関しても若干の報告がある^{9,10)}。今回著者らは、喘息治療のため入院中の患者について血漿中テオフィリン濃度を、高速液体クロマトグラフ法（以下 HPLC と略）を用いて測定

する方法を検討した。

実験方法

1. HPLC の装置および測定条件

使用機器—日本分光 FLC-350, カラム: JASCO PA-CK CV-01-500, 検出器: 紫外吸光度計 (日本分光 UVIDEC-100型), 設定波長: 278nm, 積分計: 島津 ITG-4A, 記録計: OHKURA DESK RECORDER, 移動相: 0.01 M CH_3COONa (pH 6.3), 流量: 0.3ml/min, 温度: 22°

2. 定量法

2. 1. 試験溶液

血漿 200 μ l をピペット (New Excel Tripette 50-III) を用いて、ふた付ポリエチレン製試験管に入れ、メタノール 500 μ l を同型ピペットを用いて加え、1 分間振とうした後、10,000 rpm で 1 分間遠心して、蛋白を沈殿させた上清を試験溶液とした。

2. 2. 標準溶液

新鮮凍結人血漿 (日赤) 200 μ l につき結晶オフィリン (和光) のメタノール溶液 (4 μ g/ml) 500 μ l を加えて、以下試験溶液と同様な操作によって得た上清を標準溶液

^{*1} 名古屋市昭和区鶴舞町 65 ; 65, Tsurumaicho, Showa-ku, Nagoya, 466 Japan

とした。

2. 3. 測定操作

標準溶液 および 試験溶液をそれぞれ 10 μl シリンジ (ハミルトン 701) を用いて, 5 μl をカラムに注入し, 検出器の out put を記録計 および 積分計に導き, チャートに記録するとともにピークの電圧変化を積分した値 および保持時間 (カラム注入からピークの変曲点までの時間) を印刷させた。試験溶液の示す数種のピークのうちテオフィリンと同保持時間のものをテオフィリンとして, 積分値からその量を計算した。

2. 4. 患者血漿採取法

当院第2内科に入院してアミノフィリン治療を受けている気管支喘息患者で, 他薬を服用していない患者4名を対象とした。これらの患者には採血前日よりキサンチン類を含有する飲食物の摂取を禁じた。アミノフィリン注射液1アンプル (10 ml 中アミノフィリンを 250 mg 含有; ネオフィリン注, エーザイ) は約10分間かけてゆっくりと左腕に静注し右腕より採血した。静注前, 静注直後, 15, 30 分後および1, 2, 4, 8 時間後の血液をヘパリン含有真空採血管でとり分離した血漿を試料とした。

結果および考察

1. 定量精度および回収率

1. 1. 検量線の直線性

テオフィリンとして 1, 2, 4, 6, 8 μg をクロロホルム溶液とし, ふた付試験管に分注し蒸発乾固後, 新鮮凍結人血漿 200 μl を添加して, 以下定量法に従って操作して得た値は表1に示すとおりで, この値と濃度の関係

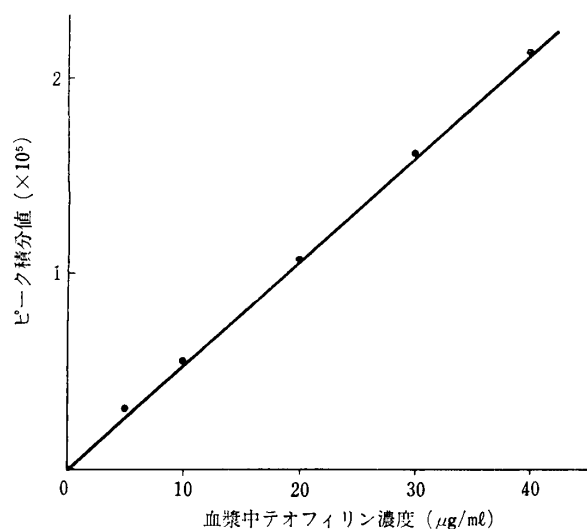


図1. テオフィリンの検量線

表1. 新鮮凍結人血漿に添加したテオフィリンの定量値

$\mu\text{g/ml}$	ピーク積分値 $n = 5$
5	30730
10	55204
20	106165
30	160328
40	212940

は図1のように直線性を示した。

1. 2. 定量精度

前項1.1.の方法に準じ, テオフィリンを 6, 15, 30 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加した血清または血漿を用い, 繰り返し10回ずつ操作して定量精度を検討した結果, 表2に示すように, それぞれ10回の測定値間の CV (Coefficient of Variation) 値は, 添加量 6 $\mu\text{g/ml}$ においては 0.5%, 15 $\mu\text{g/ml}$ では 1.5%, 30 $\mu\text{g/ml}$ では 1.8% 以内で定量精度は良好であった。

表2. 高速液体クロマトグラフ法によるテオフィリンの定量精度

	6 $\mu\text{g/ml}$		15 $\mu\text{g/ml}$		30 $\mu\text{g/ml}$	
	血清	血漿	血清	血漿	血清	血漿
$\bar{X} (\times 10^3)$	71	68	168	172	327	340
SD ($\times 10^3$)	0.2	0.3	2.4	2.3	5.4	5.8
CV (%)	0.32	0.41	1.40	1.31	1.64	1.70

1. 3. 回収率

5~40 $\mu\text{g/ml}$ に相当するテオフィリンをすでに含有している血清および血漿に対して, 5, 10 μg のテオフィリンを添加したときの回収率を求めた結果, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有の血清に対して 5 μg および 10 μg を添加したときの回収率は表3に示すように, 平均するとそれぞれ 99.4% および 100.5% であった。また, 血漿の場合はそれぞれ 99.2% および 99.1% であった。一方, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 含有の血清に対して 5 μg および 10 μg を添加したときの回収率は, 平均するとそれぞれ 98.4% および 99.1% であり, 血漿の場合はそれぞれ 97.6% および 96.9% であった。すなわち, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 含有の血清および血漿の場合の回収率が 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有の場合のそれよりも低い値を示した。また, テオフィリン総量が一般に治療量といわれる 10 $\mu\text{g/ml}$ 前後の濃度では極めて良好な回収率であった。

表3. 標準添加法によるテオフィリンの回収率

		テオフィリン添加量					
		5 μg			10 μg		
		理論値	計算値	回収率 (%)	理論値	計算値	回収率 (%)
テオフィリン含有血清 ($\mu\text{g/ml}$)	5.0	10.0	9.9	99.2	15.0	15.2	101.4
	10.0	15.0	14.9	99.6	20.0	19.9	99.6
	20.0	25.0	24.4	97.8	30.0	29.6	98.8
	40.0	45.0	44.5	98.9	50.0	49.7	99.3
	$\bar{X} =$			98.9			99.8
テオフィリン含有血漿 ($\mu\text{g/ml}$)	5.0	10.0	9.9	99.0	15.0	14.8	98.9
	10.0	15.0	14.9	99.4	20.0	19.8	99.3
	20.0	25.0	24.5	97.8	30.0	29.0	96.8
	40.0	45.0	43.8	97.4	50.0	48.5	96.9
	$\bar{X} =$			98.4			97.9

2. 患者血漿中テオフィリン量

アミノフィリン静注後の患者の血中テオフィリン濃度は、試料の都合上血漿中についてのみ測定した。その結

果全例とも静注直後に最高値 ($15.6 \pm 0.69 \mu\text{g/ml}$) を示し、15分後 $11.7 \pm 1.77 \mu\text{g/ml}$, 30分後 $9.6 \pm 1.09 \mu\text{g/ml}$, 1時間後 $8.1 \pm 1.49 \mu\text{g/ml}$, 2時間後 $5.8 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$, 4時間後 $5.7 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$, 8時間後 $3.6 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ であった (表4)。その減衰パターンをみると、不完全ながら二相性を示し、静注直後の濃度に対し1時間で約 $\frac{1}{2}$ の濃度に減衰したが、その後の減衰曲線は半減時間約8時間であった (図2)。

表4. 患者血漿中テオフィリンの濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

症例	時 間						
	投与直後	15分	30分	1時間	2時間	4時間	8時間
1	16.6	13.5	10.8	10.3	5.4	5.3	3.4
2	15.8	12.6	9.3	8.7	5.9	5.7	3.1
3	15.4	8.8	7.9	6.9	6.4	6.5	4.6
4	14.7	12.0	10.2	6.6	5.5	5.3	3.2
$\bar{X}$	15.6	11.7	9.6	8.1	5.8	5.7	3.6
S D	0.69	1.77	1.09	1.49	0.40	0.49	0.60

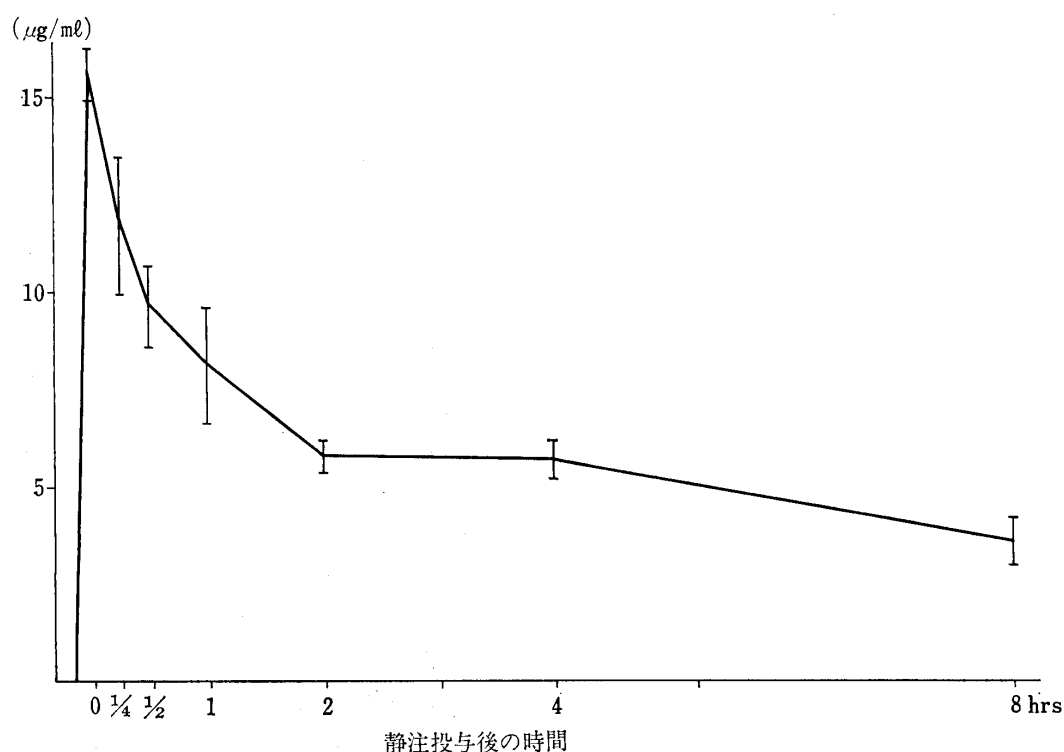


図2. 経時的血漿中テオフィリン濃度

結 論

著者らの検討した HPLC を用いる血中のテオフィリン濃度測定法は、200 μ l の試料を用いて微量のテオフィリンを簡単な操作でかつ迅速に定量できることが判明した。通常の治療有効濃度範囲において、検量線は直線性を示すとともに、定量精度、回収率も良好であり、これを実際に慢性気管支喘息患者のテオフィリンの血漿中濃度の測定に応用することができた。今後、さらに他薬併用治療の場合または投与法の異なった場合の血中テオフィリン濃度の検討を試みたいと考えている。

なお、本研究は名古屋大学医学部第2内科より依頼され、患者の承諾と医師の協力によって行ったものである。

文 献

- 1) L.S. Goodman, and A. Gilman : The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th ed., 1975, p 367.
- 2) G. Levy, E.F. Ellis and R. Koysooko : Pediatrics, 53, 873 (1974).
- 3) E.G. Clarke : "Isolation and Identification of Drugs", The pharmaceutical Press, London, England, 1969, p 864.
- 4) 河島弘文 : アレルギー, 25, 765 (1976).
- 5) J.A. Schack, and S.H. Waxler : J. Pharmacol. Exp. Ther., 97, 283 (1949).
- 6) P. Jatlow : Clin. Chem., 21, 1518 (1975).
- 7) G.F. Johnson et al : Clin. Chem., 21, 144 (1977).
- 8) J.D. Lowry et al : J. Chromatogr., 143, 83 (1977).
- 9) 久保博昭 他 : 医学のあゆみ, 101, 904 (1977).
- 10) M. A. Evenson, and B. L. Warren : Clin. Chem., 22, 851 (1976).

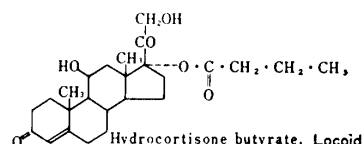
Locoid[®]

Halogen free corticosteroid

健保適用

ロコイド クリーム軟膏

一般名 酪酸ヒドロコルチゾン



特 長 * 化学構造中にハロゲン (F, Cl) を含まないが、強い局所消炎作用を持つ

* 経表皮吸収による皮膚貯留性にすぐれている

* 作用発現後は速かに生体物質とほぼ同様の代謝経路をとる

* 尋常性乾癬、掌跖膿疱症などの難治性皮膚疾患にも効果が優れている

適応症 接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎(乳幼児湿疹を含む)、神経皮膚炎(ビダール苔癬を含む)、脂漏性湿疹、貨幣状湿疹、急性および慢性湿疹、手の皮膚炎(進行性指掌角皮症、その他の主婦湿疹、手指・手部の湿疹)、痒疹、尋常性乾癬、掌跖膿疱症

包 装 クリーム・軟膏(酪酸ヒドロコルチゾン0.1%)

5g×10、5g×50、10g×10、10g×50、100g

* 用法・用量および使用上の注意等については現品添付説明書をお読みください。

提携  ヒスト・ブロック社
オランダ

製造
発売元  鳥居薬品株式会社
東京都中央区日本橋本町3-3