

血清ジソピラミド濃度測定法の検討
—高速液体クロマトグラフィー法とエンザイムイムノアッセイ法の比較—

増原慶壮, 山口友明, 篠崎公一, 井上ひろ子, 田中美雄, 荒井 栄,*¹
柏田和子, 山田令子, 木田博和, 染谷一彦,*² 佐々木康人*³

聖マリアンナ医科大学病院薬剤部*¹

聖マリアンナ医科大学第3内科*²

東邦大学医学部放射線科*³

Evaluation of Assay Methods for Serum Disopyramide Levels
—Comparison of High-performance Liquid Chromatography
with Enzyme Immunoassay—

KEISO MASUHARA, TOMOAKI YAMAGUCHI, KIMIKAZU SHINOZAKI,
HIROKO INOUE, YOSHIO TANAKA, SAKAE ARAI,*¹ KAZUKO
KASHIWADA, REIKO YAMADA, HIROKAZU KIDA, KAZUHIKO
SOMEYA,*² YASUHITO SASAKI*³

Pharmacy Department*¹, The 3rd Department of Internal Medicine,*²

St. Marianna University of Medicine and Hospital,

Department of Radiology,*³ Toho University School of Medicine

(Received September 11, 1982)

We evaluated two assay methods to determine serum disopyramide concentrations in application to the practice of medicine. The methods are high-performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme immunoassay (EMIT).

In HPLC method disopyramide was separated on a reverse phase. The degrees of precision in HPLC method and EMIT method were less than 5.2% and 5.7% in C.V., respectively. Both methods gave excellent reproducibility with C.V.: less than 5.7% in HPLC method and 5.5% in EMIT method. The recovery ratio ranged from 98.0 to 100.7% in HPLC method and from 102.1 to 103.8% in EMIT method. Disopyramide concentrations in sera of healthy subjects and those of patients measured by HPLC method correlated well with those by EMIT method. We conclude both HPLC and EMIT methods are suitable in the routine practice of medicine for measurement of serum disopyramide concentrations.

Keywords—disopyramide; high-performance liquid chromatography; enzyme immunoassay; serum concentration; monitoring therapy

緒 言

抗不整脈薬であるジソピラミドは、上室性および心室

*^{1,2} 神奈川県川崎市宮前区菅生 2095; 2095, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 213 Japan

*³ 東京都大田区大森西6丁目11-1; 11-1, Ohmori-nishi 6-chome, Ohta-ku, Tokyo, 143 Japan

性の不整脈の治療に広く使用されている。近年、血中ジソピラミド濃度は、治療効果とよい相関が認められており、2—5 μg/ml の有効治療域内に血中ジソピラミド濃度を維持するように投与設計することがよいとされている。^{1,2)} また、ジソピラミドの生体内挙動は複雑であり、^{3,4)} 薬物動態値は個体差が大きく、個々の患者で血中ジソピラミド濃度を測定することが重要であると指摘

されている。^{5,6)}

血中ジソピラミド濃度測定法は、既にガスクロマトグラフィー (GLC),^{7,8)} 高速液体クロマトグラフィー (HPLC),⁹⁻¹⁴⁾ およびエンザイムイムノアッセイ (EIA) が報告されている。しかし、わが国では血中ジソピラミド濃度測定法の報告はほとんどなく、また、HPLC 法と EIA である EMIT 法を比較した報告はない。

今回、著者らは、ジソピラミド投与法の評価と適正な投与設計を行うため、臨床の場に応用できる血中ジソピラミド濃度測定法の確立を目的として、HPLC 法と EMIT 法による血中ジソピラミド濃度測定法の検討をしたので報告する。

実験方法

1. HPLC法

1) 測定装置

用いた測定装置は、TWINCLE 高速液体クロマトグラフ、検出器として紫外吸光度計 (UVIDEC-100 III)、記録計 (PC-228) および Finepac SIL C₁₈ カラム (内径 4.6mm×250mm) より構成されている。これらの装置はすべて日本分光社製である。

2) 試薬

試薬は液体クロマトグラフ用アセトニトリル (和光純薬) とリン酸一カリウム、エチルエーテル、炭酸ナトリウムおよび硫酸 (和光純薬・特級) を用いた。

3) 測定操作

a. 血清試料の前処置

血清 0.5ml に 1 M 炭酸ナトリウム 0.25ml とエチルエーテル 3 ml を加え 1 分間混和し、5 分間遠心分離 (3000 rpm) 後、水層をドライアイスアセトンにて凍結させた。上層のエチルエーテルを分取し、0.1N 硫酸 0.1ml を加え 1 分間混和後、5 分間遠心分離 (3000 rpm) して下層の硫酸溶液 30 μ l を HPLC に注入した。

b. 分析条件

2 N 硫酸で pH 3.0 に調製した 0.03M リン酸一カリウム溶液 62 とアセトニトリル 38 の割合で混合して移動相として用い、流量 2.0ml/min で展開した。カラム温度は 40°C に設定し、検出器の波長 210nm にて分析した。

4) 測定法の検討

a. クロマトグラムの検討

ジソピラミド標準品 (中外製薬) を移動相に溶解して展開し、ジソピラミドのクロマトグラムを得た。人プール血清にジソピラミドを添加して抽出し、同一条件で展開して得たクロマトグラムのピークの保持時間をジソピラミドクロマトグラムと比較した。

b. 検量線の検討

人プール血清にジソピラミド標準品を添加し、0.62—4.75 μ g/ml の異なる濃度の試料を調製し、これらの血清抽出液を HPLC に注入して得たクロマトグラムのピークの高さを計測して検量線を作成した。

c. 精度および再現性の検討

ジソピラミド標準品を添加した血清試料をくり返し測定して、日内変動および日間変動を検討した。

d. 回収率の検討

ジソピラミド標準品を一定量添加した既知濃度の血清試料の実測値より回収率を求めた。

2. EMIT法

EMIT 法では薬物抗体と薬物 (抗原) との結合反応にあたって、酵素を標識した薬物と試料中の薬物とを競合させたのち、抗原抗体反応にあずからない遊離の標識抗原の酵素活性を測定する。

1) 測定装置

測定装置は、吸光度計 Gilford Stasar III (Gilford Instrument Labs.) とコンピュータプリンタ CP-5000 (Syva 社) およびピペッタダイリユータ (Syva 社) より構成されている。CP-5000 は濃度記憶装置が内蔵されており、検量線を作成することなく、検体の濃度をプリントアウトすることができる。

2) 試薬および測定方法

試薬は Emit-cad キット (Syva-第一化学薬品) を用いた。Emit-cad キットは試薬 A (ジソピラミド抗体、基質: グルコース-6-リン酸, 補酵素: NAD) と試薬 B (酵素標識ジソピラミド) およびジソピラミドキャリブレータより成っている。

測定方法はキャリブレータおよび検体 50 μ l を緩衝液で 36 倍希釈し、この 300 μ l に試薬 A および試薬 B をそれぞれ 50 μ l、緩衝液で 6 倍希釈して加えて、吸光度計に吸入させた。

3) 精度、再現性および回収率の検討

ジソピラミド標準品を添加した血清試料をくり返し測定して、日内変動および日間変動を検討した。回収率の検討にはジソピラミド標準品を一定量添加した血清試料の濃度値と実測値を比較した。

3. HPLC法とEMIT法の比較

ジソピラミド投与健常志願者および聖マリアンナ医科大学病院第 3 内科に入院のジソピラミド服用患者から得た血清試料 83 検体について、HPLC 法と EMIT 法の測定値を比較した。

4. ジソピラミド臨床薬物動態の検討

聖マリアンナ医科大学病院第 3 内科に入院したジソピ

ラミド服用患者4名のジソピラミド動態値を解析した。対象は、男性3名、女性1名、年齢は46—71才、体重は45—58kgであった (Table 1)。採血は定常状態に達した投与直前、投与後2, 4, 6, 8時間の4—5回行った。測定値を Open One Compartment Model を用いて解析し、ジソピラミドの動態値を求めた。ただしジソピラ

ミドの吸収率を0.8とした。⁶⁾

結 果

1. クロマトグラム

ジソピラミド標準品を人プール血清に添加し抽出後、展開して得たクロマトグラムのピークの保持時間は、ジ

Table 1. Profile of Four Patients Who Received Disopyramide Administration

Patient	Sex	Age (y.o.)	Body-Weight (Kg)	Diagnosis
K.K	M	62	52	1. Old MI ^{a)} 2. MR ^{b)} 3. PVC ^{c)}
G.M	M	68	51	1. Old MI 2. PVC
S.A	F	46	45	1. PAT ^{d)}
S.H	M	71	58	1. Acute MI 2. PVC

a) Myocardial Infarction.

b) Mitral Regurgitation.

c) Premature Ventricular Contraction.

d) Paroxysmal Atrial Tachycardia.

ソピラミド標準品を移動相に溶解し HPLC に注入して得たクロマトグラムのピークの保持時間と一致した。また、血清成分による妨害ピークは認められなかった (Fig. 1)。

2. 検量線

種々濃度のジソピラミド添加血清より得たクロマトグラムのピークの高さはジソピラミド濃度と直線的な相関を示し、回帰式 $Y=4.25X-0.07$ 、相関係数 0.998 であった (Fig. 2)。したがって検量線として用いると判断した。

3. 精度および再現性

HPLC 法では、変動係数 (C.V.%) は日内変動 2.2—5.2%、日間変動 1.6—6.3% であった (Table 2)。

EMIT 法では、変動係数 (C.V.%) は日内変動 2.1—5.7%、日間変動 4.2—5.4% であった (Table 3)。

両測定法とも、日内および日間変動係数が6%以下と臨床応用に十分な精度と再現性を有していると判断した。

4. 回収率

HPLC 法では、ジソピラミド濃度 0.98—4.55 μ g/ml

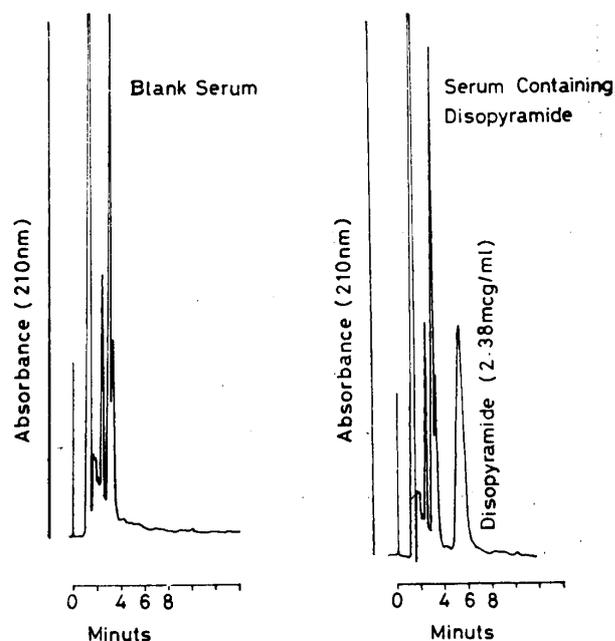


Fig. 1. Chromatograms of a Drug-free Serum (Left) and a Serum Containing 2.38mcg/ml of Disopyramide (Right)

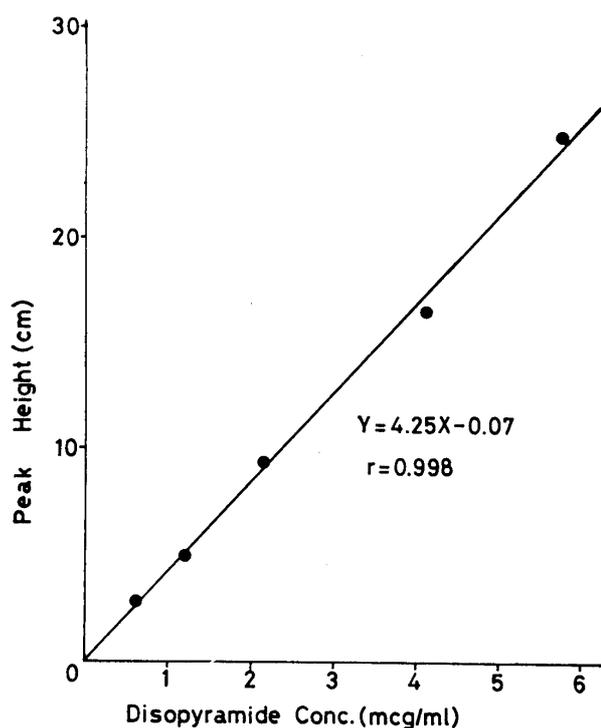


Fig. 2. A Representative Standard Curve of HPLC for Disopyramide Assay

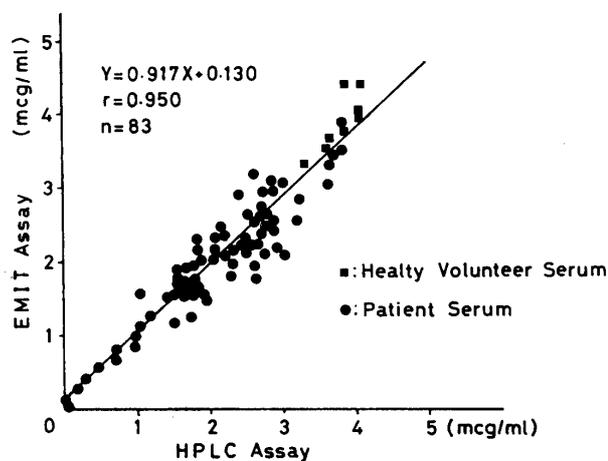


Fig. 3. Correlation of HPLC and EMIT Assays for Determining Disopyramide Concentrations in Patients' Sera

の異なる濃度での回収率は 98.0—100.7% であった (Table 4).

EMIT 法では、ジソピラミド濃度 0.75—6.00 μ g/ml の異なる 4 濃度での回収率は 102.1—103.8% であった (Table 5). 両測定法とも回収率はきわめて良好であった.

5. HPLC 法と EMIT 法の相関

ジソピラミド投与健常志願者および服用患者から得た 83 検体を HPLC 法と EMIT 法で測定した値の相関は、回帰式 $Y = 0.917X + 0.130$, 相関係数 0.950 で、ほぼ原点を通る 1 対 1 の対応を示した (Fig. 3).

6. ジソピラミド臨床薬物動態

ジソピラミド 1 回 100mg, 1 日 3 回 8 時間毎および 1 回 100mg, 1 日 4 回 6 時間毎投与を受けている患者 4 名の血中ジソピラミド濃度を HPLC 法で測定した値を Open One Compartment Model で解析した. 消失半減期 ($t_{1/2}$) は 6.80—8.14 時間 ($\bar{m} = 7.49$ 時間) で見かけの分布容積 (V_d) は 39.30—61.54 l ($\bar{m} = 52.99$ l) であった (Table 6).

考 察

HPLC を用いた血中ジソピラミド濃度測定法について、従来、多くの報告がある.¹⁰⁻¹⁴⁾ いずれの方法も逆相カラムを用い、移動相にはアセトニトリルとリン酸緩衝液^{10,13,14)} あるいはメタノールと水を用いている.¹¹⁾ 血清試料の前処置にはアルカリ性下で有機溶媒を用いて抽出する方法^{10,12,14)} とアルカリ性下で有機溶媒抽出を行いさらに酸性下で再抽出を行う方法がある.^{9,11)} 著者らの方法は逆相カラムに Finepac C₁₈ を用い、移動相には Flood ら¹³⁾ の方法を一部変更してアセトニトリル/0.03M リン酸—カリウム (pH 3.0)=38/62 を用いて行った. 従来の方法のジソピラミドのピークの保持時間が 2.8—5.6 分に対し、著者らの方法は 5 分とほぼ同等の条件を設定することができた. また、血清試料の前処置では血清成分の妨害を防ぐため Meffin⁹⁾ らの方法を用

Table 2. Precision and Reproducibility in HPLC Assay

Within-day variance				Between-day variance			
No.	Mean (mcg/ml)	1.S.D.	CV%	No.	Mean (mcg/ml)	1.S.D.	CV%
10	1.03	0.02	2.2	5	0.96	0.06	6.3
10	2.38	0.06	2.5	5	2.38	0.04	1.6
10	4.73	0.25	5.2	5	4.58	0.26	5.7

Table 3. Precision and Reproducibility in EMIT Assay

No.	Within-day variance			Between-day variance			
	Mean (mcg/ml)	1S.D.	CV%	No.	Mean (mcg/ml)	1S.D.	CV%
10	0.84	0.02	2.1	7	0.77	0.04	5.4
10	1.59	0.05	3.2	7	1.56	0.08	4.9
10	3.13	0.14	4.4	7	3.08	0.15	4.9
10	6.85	0.39	5.7	7	6.18	0.26	4.2

Table 4. Recovery Test of HPLC Assay

Target value (mcg/ml)	n	Measured value (mcg/ml)	Analytical recovery (%)
0.98	5	0.96	98.0
2.38	5	2.38	100.0
4.55	5	4.58	100.7

Table 5. Recovery Test of EMIT Assay

Target value (mcg/ml)	n	Measured value (mcg/ml)	Analytical recovery (%)
0.75	7	0.77	102.1
1.50	7	1.56	103.8
3.00	7	3.08	102.6
6.00	7	6.18	103.0

Table 6. Pharmacokinetic Parameters for Disopyramide in Patients

Patient	F ^{a)}	Half-Life (hours)	V _d ^{b)} (L)
K.K	0.8	6.89	55.18
G.M	0.8	8.09	39.30
S.A	0.8	8.14	61.54
S.H	0.8	6.80	55.94
Mean S.D.		7.49±0.64	52.99±9.56

a) Absorption factor.

b) Apparent volume of distribution.

いて2回抽出を行った。

従来報告されている HPLC 法による〔測定精度および再現性は、日内変動係数が2.0—8.3%, 日間変動係数が2.0—11.0% であり,¹¹⁻¹³⁾ 著者らの測定法による日内変動係数は2.2—5.2%, 日間変動係数は1.6—6.3% で、従来の方法に比べるとむしろ良好な結果であった。また、従来報告されている回収率は93—104.3% で,^{11,12)} 著者らの得た回収率98—100.7% はむしろ良好であった。

EMIT 法による精度および再現性は、日内変動係数が2.1—5.7%, 日間変動係数が4.2—5.4% で、HPLC 法とほぼ同様の結果であった。また、回収率は102.1—103.8% で HPLC 法とほぼ同等であった。

ジソピラミド服用患者およびジソピラミド投与健常志願者から得た83検体を HPLC 法と EMIT 法で測定した値の相関はほぼ原点を通る1対1の対応を示した。

以上の検討結果より、HPLC 法と EMIT 法は良好かつ同等の精度・再現性および回収率を有しており臨床の場に応用できると結論した。

著者らの検討した患者4名のジソピラミド動態値は消失半減期が6.80—8.14 時間で、健常成人の半減期として報告されている4.4—8.2時間の範囲内にあった。^{3,15)} しかし、半減期は腎不全の患者で8.3—43時間と大きな幅があり、⁵⁾ また、心疾患により健常成人に比べ半減期が延長することが報告されている。¹⁶⁾ 中毒域は血中ジソピラミド濃度9 μg/ml 以上とされており、中毒作用としてQRS 幅の増大、うっ血性心不全、低血圧、種々の伝導障害、徐脈が報告されている。¹⁷⁾ このため血中ジソピラミド濃度を測定し、臨床薬物動態理論を用いて解析し、個々の患者でジソピラミド投与法の評価と適正な投与設計を行うことが安全で有効なジソピラミド治療を行う上で重要と考える。

結 論

従来の HPLC 法を一部変更した本法と EMIT 法により血中ジソピラミド濃度を測定した。両測定法は精度・再現性および回収率が良好で、薬物血中濃度モニタリングの目的で臨床の場に応用できることを示した。また、

ジソピラミド服用患者4名の薬物動態値を求め、血中ジソピラミド濃度測定および測定値の解析の重要性を論じた。

謝辞 ジソピラミド標準品を提供された中外製薬株式会社と、EMIT 測定機器および Emit-cad キットを提供された第一化学薬品株式会社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) P. Jr. Danilo, and M. R. Rosen: *Am. Heart J.*, **92**, 532 (1976).
- 2) A. P. Niarchos: *Am. Heart J.*, **92**, 57 (1976).
- 3) J. L. Cunningham, D. D. Shen, I. Shudo, and D. L. Azarnoff: *Clin. Pharmacokin.*, **2**, 373 (1977).
- 4) J. L. Cunningham, D. D. Shen, I. Shudo, and D. L. Azarnoff: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **5**, 343 (1978).
- 5) R. C. Heel, R. N. Brogden, T. M. Speight, and G. S. Avery: *Drugs*, **15**, 331 (1978).
- 6) J. Koch-Weser: *N. Engl. J. Med.*, **300**, 957 (1979).
- 7) T. C. Hutsell, and S. J. Stachelski: *J. Chromatogr.*, **106**, 151 (1975).
- 8) A. M. J. A. Duchateau, F. W. H. M. Merkus, and F. Schobben: *J. Chromatogr.*, **109**, 432 (1975).
- 9) P. J. Meffin, S. R. Harapat, and D. C. Harrison: *J. Chromatogr.*, **132**, 503 (1977).
- 10) K. F. Ilett, L. P. Hackett, L. J. Dusci, and R. Tjokrosetio: *J. Chromatogr.*, **154**, 325 (1978).
- 11) J. Vasiliades, C. Owens, and F. Ragusa: *Clin. Chem.*, **25**, 1900 (1979).
- 12) L. A. Broussard, and C. S. Frings: *Clin. Toxicol.*, **14**, 579 (1979).
- 13) J. G. Flood, G. N. Bowers, and R. B. McComb: *Clin. Chem.*, **26**, 197 (1980).
- 14) J. T. Ahokas, C. Davies, and P. J. Ravenscroft: *J. Chromatogr.*, **183**, 65 (1980).
- 15) S. M. Bryson, J. R. Lawrence, and B. Whiting: *Br. Clin. Pharmacol.*, **4**, 633 (1977).
- 16) J. Hulting, and G. Rosenhamer: *J. Inter. Med. Res.*, **4** (Suppl 1), 90 (1976).
- 17) J. Hulting, and G. Rosenhamer: *Acta. Med. Scand.*, **199**, 41 (1976).