

高速液体クロマトグラフィーによる三種ベンゾジアゼピン誘導体の同時測定

菱田 広, 竹田信也, 米島隆一,*¹ 武田明夫*²国立名古屋病院薬剤科*¹国立名古屋病院臨床検査科臨床脳波センター*²High-performance Liquid Chromatographic Method
for the Simultaneous Quantification of
Three Benzodiazepines in PlasmaHIROSHI HISHIDA, SHINYA TAKEDA, RYUICHI YONESHIMA,*¹
and AKIO TAKEDA*²Department of Pharmacy,*¹ and Clinical Encephalographic Center,
Department of Clinical Laboratory,*² Nagoya National Hospital

(Received February 24, 1984)

Many benzodiazepines have valuable anticonvulsant properties. The regular monitoring of plasma concentration of benzodiazepine derivatives during treatment with the drug appears not only useful but necessary, because of the narrow therapeutic range and risk of increased occurrence of seizure in cases of overdosage.

We studied a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantification of 3 benzodiazepine derivatives in plasma. After a single extraction of the drugs from alkaline plasma, nitrazepam, clonazepam and diazepam can be resolved and quantified by using an ODS reversed phase column with 2 volumes of acetonitrile and 5 volumes of 1% triethylamine-phosphoric acid solution (pH 3.0) as mobile phase. By adding triethylamine to mobile phase, retention time can be shortened for diazepam and the other benzodiazepines can also be separated completely. The eluted drugs were detected by their absorption at 254 nm. With this method, it is possible to quantify as little as 6 ng/ml for nitrazepam and clonazepam, 18 ng/ml for diazepam with 1 ml plasma samples. Complete chromatographic resolution of the benzodiazepines resulted, permitting quantification of all being done within 30 min. The standard curves showed good linearity with ranges 6 to 400 ng/ml for nitrazepam and clonazepam, and 18 to 1000 ng/ml for diazepam.

The day-to-day precision, established by 10 replicate analyses, yielded CVs of 4.5 to 5.0%. Analytical recovery of each drugs added to plasma was complete (95 to 99%). The most common antiepileptics and plasma components did not interfere with the analysis.

Keywords—high-performance liquid chromatography; benzodiazepine derivatives; nitrazepam; clonazepam; diazepam; simultaneous quantification

はじめに

ジアゼパム, ニトラゼパムなど, ベンゾジアゼピン誘導体ははじめ抗不安薬として開発されたが, ニトラゼパムの抗てんかん作用が報告されて以来, 幅広いスペクトルをもつ抗てんかん薬として広く用いられている。またクロナゼパムはベンゾジアゼピン誘導体であるが, 抗て

んかん作用を目的として開発され, 最も抗てんかん作用が強いといわれ, ジアゼパム, ニトラゼパム同様広く用いられている。

ベンゾジアゼピン誘導体の薬物動態と臨床効果との関連について, いくつかの報告^{1,2)}がみられているが, 他の抗てんかん薬に比べ, 血清中濃度モニタリングの頻度が少ないのは, 簡便でかつ正確, 迅速な測定法が確立されていないためである。ベンゾジアゼピン誘導体の過剰投与により, てんかん発作の頻発化,^{3,4)} またクロナゼパ

*^{1,2} 名古屋市中区三の丸4丁目1-1; 1-1, Sannomaru 4-chome, Naka-ku, Nagoya, 460 Japan

ム⁵⁾について報告されているように、最適血中濃度範囲が 20~80 ng/ml で、狭いことから、血中薬物モニタリングの必要がある。同時にベンゾジアゼピン誘導体の薬物動態および臨床効果を解明するためには、より簡便な測定法の確立が必要である。

ベンゾジアゼピン誘導体は、これまでにラジオイムノアッセイ,^{6,7)} ガスクロマトグラフィー,^{8~10)} 高速液体クロマトグラフィー^{11~15)} などによる測定報告がある。とくに高速液体クロマトグラフィーを用いた測定では、Perchalski ら¹¹⁾ は順相系カラムを用いたベンゾジアゼピン誘導体の分離測定を報告している。しかし、ニトラゼパムとクロナゼパムの分離が不十分であった。また逆相系カラムを用いた報告には、Rovei ら,¹²⁾ Williams ら¹³⁾ によりニトラゼパムとクロナゼパムの分離測定、Brodie ら,¹⁴⁾ Kabra ら¹⁵⁾ によりジアゼパムの分離測定がある。しかしながら、三種薬物の同時測定の報告はなく、同時測定が可能となれば、自動試料注入装置の利用により多数検体の処理も可能となる。そこで今回著者らは、ベンゾジアゼピン誘導体のうち抗てんかん薬として用いられているジアゼパム、ニトラゼパム、クロナゼパムの高速液体クロマトグラフィーを用いた三種同時測定法の検討を行ったので報告する。

実 験 の 部

1. 測定試料および試薬

測定試料として当院外来患者血漿を用いた。標準薬物試薬としてクロナゼパム、ニトラゼパム、ニメタゼパム(日本ロシュ)、ジアゼパム、デスメチルジアゼパム(武田薬品)、フェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピン(片山化学)を用いた。

2. 抽出操作

血漿試料からの薬物の抽出は、Perchalski ら¹¹⁾ の方法に基づいて行った。すなわち血漿 1 ml に内部標準(IS)としてニメタゼパム 50ng を含むアセトニトリル 1 ml を加え、除タンパクを行う。上清に 2 M グリシン緩衝液 (pH 10.0) 0.5ml を加え、ベンゼン:ジクロロメタン (9:1) 混液 5 ml により抽出する。有機溶媒層 5 ml を濃縮乾固し、残渣を移動相:メタノール (1:1) 混液 100 μ l にて溶解し、高速液体クロマトグラフィーの試料とした。

3. 測定装置および薬物分離条件

高速液体クロマトグラフィーのポンプは 6000A 型 (Waters 製) を用い、検出器として 440 型 UV 検出器 (Waters 製) を用い、254nm で検出した。定量計算は 730 型データモジュール (Waters 製) を用い、ピーク面

積に基づいて内部標準法にて行った。薬物分離条件として、カラムはラジアルバック C₁₈ (8 mm id $\times$ 10cm, 10 μ m, Waters 製) を用い、移動相は 1% トリエチルアミン水溶液をリン酸で pH 3.0 に調整した液 5 容に対し、アセトニトリル 2 容を混ぜたものを用い、流速 2 ml で分離した。

4. 実験項目

1) 薬物分離条件, 2) 測定の直線性と測定限界, 3) 回収率: 絶対回収率と添加回収率, 4) 測定精度: 同日再現性と日差再現性, 以上の項目について検討した。

結 果

1. 薬物分離条件

薬物フリー血清 1 ml に、ジアゼパムを 200ng, ニトラゼパムおよびクロナゼパムを各 60ng 添加し、抽出操作手順に従って処理し測定試料とした。ジアゼパム、ニトラゼパム、クロナゼパム三種薬物とも単一ピークとして分離した。分析時間約 35 分で、保持時間はニトラゼパム 9.15 分, クロナゼパム 11.17 分, ジアゼパム 29.60 分, ニメタゼパム (IS) 16.40 分であり、血清由来の他成分とは完全に分離した。

他の抗てんかん薬として、フェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピンを同様の方法で処理し分離したが、保持時間はフェノバルビタール 3.55 分, フェニトイン 7.25 分, カルバマゼピン 7.40 分であり、測定妨害ピークとはならなかった。またジアゼパム服用患者においては、ジアゼパムの代謝物であるデスメチルジアゼパムが 14.45 分に認められたが、ニメタゼパム (IS) とは完全に分離した。

2. 直線性と測定限界

本測定法では Fig. 2 に示すように、ニトラゼパム 0~400ng/ml, クロナゼパム 0~400ng/ml, ジアゼパム 0~1000ng/ml の濃度範囲で良好な直線性を認めており、測定の検出限界はニトラゼパム 6 ng/ml, クロナゼパム 6 ng/ml, ジアゼパム 25ng/ml であった。

3. 添加回収率について

薬物フリー血清にニトラゼパムおよびクロナゼパムは 60ng/ml, ジアゼパムは 200ng/ml となるようにそれぞれの薬物を添加し、前述の前処理に従い、除タンパクおよび抽出操作を実施後、内部標準法により薬物測定を行った。その結果、Table 1 に示すように、測定を 10 回行い、ニトラゼパム 95.3 $\pm$ 5.4%, クロナゼパム 95.1 $\pm$ 5.4%, ジアゼパム 99.1 $\pm$ 8.0% という高い回収率を得ることができた。さらに当院外来においてベンゾジアゼピン誘導体の投与を受けている患者血漿を試料とし、これに

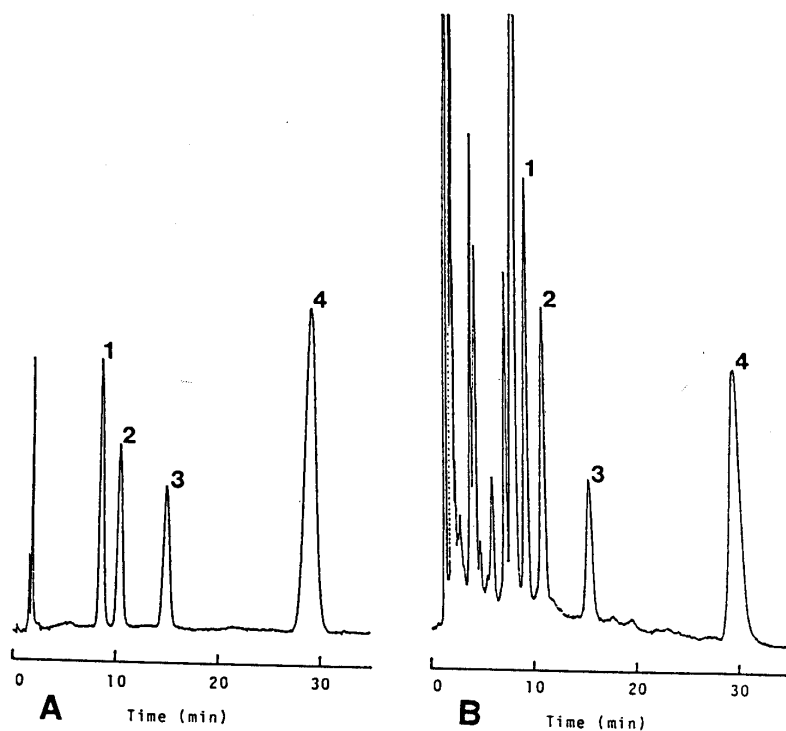


Fig. 1. Representative Chromatograms of (1) Nitrazepam, (2) Clonazepam, (3) Nimetazepam (Internal Standard) and (4) Diazepam

- A. Drug standards containing nitrazepam (60 ng/ml), clonazepam (60 ng/ml) and diazepam (200 ng/ml).
 B. Extraction of patient's plasma spiked with nitrazepam (100 ng/ml), clonazepam (100 ng/ml) and diazepam (150 ng/ml). patient's plasma contained phenytoin, phenobarbital, primidone and carbamazepine.

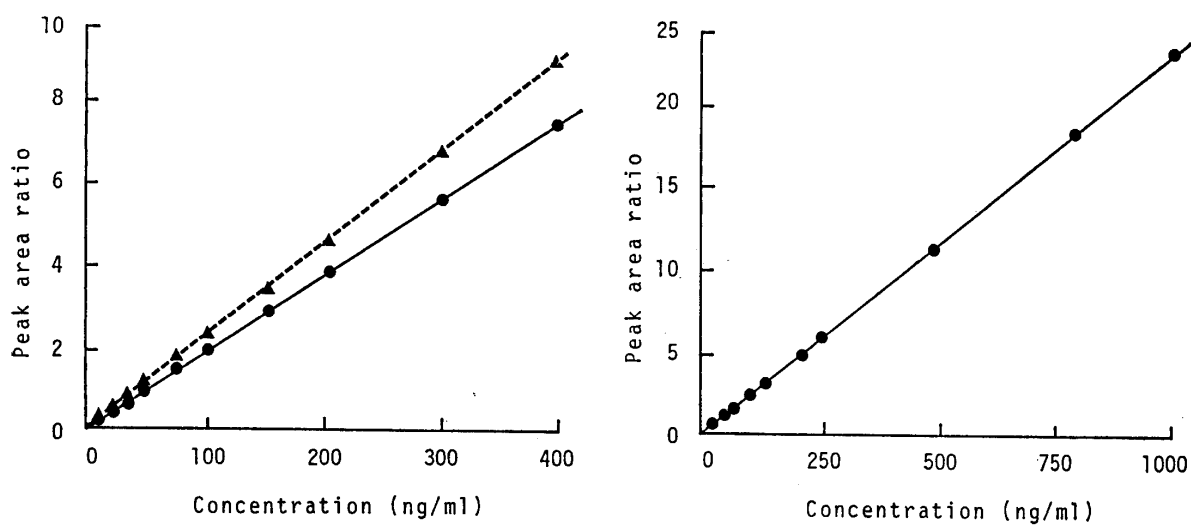


Fig. 2. Typical Standard Curves with Nimetazepam as the Internal Standard

- A) for nitrazepam (▲) and clonazepam (●)
 B) for diazepam

Table 1. Analytical Recovery of the Analysis for Benzodiazepines

	Drug free serum mean $\pm$ SD	Patient plasma mean $\pm$ SD
Nitrazepam	97.6 $\pm$ 6.2	95.3 $\pm$ 5.4
Clonazepam	98.2 $\pm$ 6.0	95.1 $\pm$ 5.4
Diazepam	99.3 $\pm$ 7.3	99.1 $\pm$ 8.0

N=10

Table 2. Within-day and Day-to-day Precision of the Analysis for Benzodiazepines

	Coefficient Variation (%)	
	within-day	day-to-day
Nitrazepam	2.2	4.5
Clonazepam	3.9	4.8
Diazepam	2.8	5.0

N=10

既知量の薬物を添加し、同様の操作を行った。

ベンゾジアゼピン誘導体服用患者血漿からの回収率は、薬物を添加した試料の測定値から薬物未添加試料の測定値を差し引き、添加薬物量の回収率として算出した。各薬物とも10試料の測定を行い、ニトラゼパム97.6 $\pm$ 6.2%、クロナゼパム98.2 $\pm$ 6.0%、ジアゼパム99.3 $\pm$ 7.3%の結果を得た。

4. 測定精度

薬物フリー血清に、ニトラゼパムおよびクロナゼパムは60ng/ml、ジアゼパム200ng/mlの濃度になるように薬物を添加して測定試料とし、測定精度を検討した。測定の同日再現性は、各薬物を同日内に10回測定し、また日差再現性は、各薬物を10日間にわたり毎日測定した。同日再現性のCV値はTable 2に示すように、ニトラゼパム2.2%、クロナゼパム3.9%、ジアゼパム2.8%であり、日差再現性のCV値は、ニトラゼパム4.5%、クロナゼパム4.8%、ジアゼパム5.0%と良好な結果が得られた。

考 察

アセトニトリルとリン酸緩衝液の二成分移動相による各種抗てんかん薬を含む検体の薬物分離は完全ではない。たとえばジアゼパムの保持時間を短縮すると、ニトラゼパム、クロナゼパムのみならずカルバマゼピンなどの比較的保持時間の短い薬物については、まったく分離

することができない。そこで残留しているシラノール基の影響を抑制する目的で用いられているトリエチルアミンの添加を試みた。このトリエチルアミンの添加により、ジアゼパムの保持期間が、トリエチルアミンを添加しない条件に比べ、約半分に短縮可能となり、しかも比較的早く流出してくるニトラゼパム、クロナゼパムの完全な分離も可能であった。すなわちトリエチルアミンの添加により、他成分の分離を損なうことなく、ジアゼパムの保持時間の短縮が可能となり、分離時間35分で、血漿成分、他薬物、その代謝物の測定妨害もなく、三種ベンゾジアゼピン誘導体の同時測定が可能となった。順相系カラムを用いたPerchalskiら¹¹⁾、また逆相系カラムを用いたRoveiら¹²⁾の報告にもあるように、カルバマゼピンの血漿中濃度が高いと、カルバマゼピンとニトラゼパム、クロナゼパムとの分離ができないこと、またジアゼパムの代謝物であるデスメチルジアゼパムと内部標準として用いているニメタゼパムとの分離ができなくなることから、これ以上の分離時間の短縮は不可能であった。また移動相のpHが3.0以上となると、保持時間が長くなる傾向があり、移動相のpHを3.0とした。

測定の回収率に関しては、三種薬物とも薬物フリー血清での添加回収率は、内部標準法により測定を行っていることから、97.6~99.3%と非常に良好であり、Perchalskiら¹¹⁾の報告よりもすぐれた結果であった。今後、前処理カラムの利用により、前処理操作上の抽出効率を高め、測定限界がさらに低下するよう検討を加えたい。またベンゾジアゼピン服用患者血漿での添加回収率は、95%以上と良好な結果を得ているが、ジアゼパムにおいては8.0%の変動を認めている。これはジアゼパムの保持時間が長い影響がでているものと考えるが、臨床上での問題とはならない。また測定精度においては、同日再現性と日差再現性をみている。三種薬物ともそのCV値は同日再現性では4%以下、日差再現性では5%以下であり、Perchalskiら¹¹⁾の報告とほぼ同様な値であり、再現性もすぐれた測定法であると考える。同一分離条件で、三種ベンゾジアゼピン誘導体の測定が可能となり、特に自動試料注入装置を含めた高速液体クロマトグラフィーであれば、多数検体の処理も可能となり、非常に有用な測定法であると考える。また今後、前処理カラムなどの利用により、抽出、濃縮操作の必要もない全自動の測定が可能となるよう検討を加えたい。

謝辞 本研究のために試薬を提供していただいた日本ロシュ株式会社、武田薬品工業株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) B. Mikkelsen, P. Berggreen, P. Joensen, O. Kristensen, O. K  hler, B. O. Mikkelsen : Epilepsia, 22, 415 (1981).
- 2) 三浦寿男 : 神経精神薬理, 2, 505 (1980).
- 3) P. L. Morsell : "Drug Disposition During Development," Spectrum Publication Inc., 1977, pp. 3-40.
- 4) P. L. Morselli : "Neuropsychopharmacology," Pergamon Press, 1978, p. 877.
- 5) J. K. Penry : "Drug Interactions," Raven Press, 1974, p. 299.
- 6) W. R. Dixon, R. L. Young, A. Liebman : J. Pharm. Sci., 66, 235 (1977).
- 7) W. R. Dixon, R. L. Young, A. Liebman : Pharmacologist, 17, 251 (1975).
- 8) P. M. Edelbroek, F. A. De Wolff : Clin. Chem., 24, 1774 (1978).
- 9) J. P. Cano, J. Guinrand, C. Aubert, A. Viala : Arzneim. Forsch., 27, 338 (1977).
- 10) J. P. Cano, J. Catalin, A. Viala, J. Roger, C. A. Tassinari, C. Draved, H. Gastaut : Eur. J. Toxicol. Environ. Hyg., 9, 213 (1976).
- 11) R. J. Perchalski, B. J. Wilder : Anal. Chem., 50, 554 (1978).
- 12) V. Rovei, M. Sanjuan : Therapeutic Drug Monitoring, 2, 283 (1980).
- 13) R. C. Williams, J. L. Viola : J. Chromatogr., 185, 505 (1979).
- 14) R. R. Brodie, L. F. Chasseaud, T. Taylor : J. Chromatogr., 150, 361 (1978).
- 15) P. M. Kabra, G. L. Stevens, L. J. Marton : J. Chromatogr., 150, 355 (1978).

アレルギー性疾患 慢性肝疾患に……

■グリチルリチン製剤 強力ネオミノファーゲン

健保略称 強ミノC

●作用

抗アレルギー作用, 抗炎症作用, 解毒作用, インターフェロン誘起作用, および肝細胞障害抑制・修復促進作用を有します。

●用法・用量

1日1回, 1管(2ml, 5ml, または20ml)を皮下または静脈内に注射。

症状により適宜増減。

慢性肝疾患には, 1日1回, 40mlを静脈内に注射。年齢, 症状により適宜増減。

●適応症

アレルギー性疾患(喘息, 蕁麻疹, 湿疹, ストロフルス, アレルギー性鼻炎など)。食中毒。薬物中毒, 薬物過敏症, 口内炎。

慢性肝疾患における肝機能異常の改善。

包装 20ml 5管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管

※使用上の注意は, 製品の添付文書をご参照下さい。

●内服療法には

グリチロン錠二号

包装 1000錠, 5000錠

健保適用

ネオミノファーゲン製薬本舗 (〒160) 東京都新宿区四谷3-2-7