The Japan Society for Analytical Chemistry

高速液体クロマトグラフィーによる血清及び尿中フロセミドの定量

久保博昭®*，李　好枝**，小林良江，木下俊夫*

(1985 年 10 月 1 日受理)

簡単な前処理法で蛍光検出高速液体クロマトグラフィーを用いた迅速，簡便，再現性の良い血清及び尿中フロセミドの定量法を確立した．前処理法は血清ではアセトニトリル除タンパク，尿では 50 倍希釈という操作を行った．高速液体クロマトグラフィーの条件は，逆相用カラムを使用し，移動相は 5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウムを含む 30% アセトニトリル溶液 (pH 3.5) を用い，流速は 2.5 ml/min とした．検出は励起波長 333 nm，蛍光波長 415 nm で行った．血清及び尿中からの回収率は 90% 以上と良好であった．再現性も血清の場合，日内変動は 3.48%，尿の場合，2.58% と良好であった．

1 緒　言

フロセミド (Furosemide, FD) はループ利尿薬として広く用いられている薬剤である．近年，我が国で女性間にやせ薬としてこの利尿薬を乱用する悪弊が広まり，その結果，血清中のカリウム濃度が低下する電解質代謝異常の副作用が生じている．この副作用は Bartter 症候群と同じ病態像を示すことが知られており pseudo-Bartter 症候群とも言われている．多くのこの利尿薬乱用患者は服薬事実を隠すので[1]，患者の体液中の分析が必要となる．

FD の測定方法として，従来，放射性同位元素利用法[2]，蛍光法[3]，薄層クロマトグラフィー・蛍光法[4]，ガスクロマトグラフィー[5]，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法が使用されている．その中で，HPLC を用いた方法は薬物体液中濃度測定に適しており，既に幾つかの方法が報告されている[6)~13)]．しかし，これらの方法は，大量の試料を必要とし，煩雑な抽出操作を行い再現性も劣っている．そこで今回著者らは，HPLC を用いて微量の血清及び尿で，簡便，迅速，再現性の良い FD の定量法を確立したので報告する．

2 実　験

2•1 試　薬

FD は東京化成工業製，ヘキサンスルホン酸ナトリウムは Aldrich 製を使用した．移動相に用いた溶媒は，高速液体クロマトグラフ用で，その他の有機溶媒及び試薬はすべて試薬特級を用いた．

2•2 装　置

高速液体クロマトグラフは日本ウォーターズ 6000A ポンプ，U6K 注入装置，Radial pak μ Bondapak C_{18} (粒子径 10 μm，10 cm×8 mm i. d.) 充てんカラムを用いた．検出器は，日立 F 1000 蛍光分光光度計で，励起波長 333 nm，蛍光波長 415 nm を用いた．

2•3 移動相

5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウムを含む 30% アセトニトリル溶液を酢酸で pH 3.5 に調節したものを使用した．流速は，2.5 ml/min で行った．

2•4 定量操作

2•4•1 血　清　血清 100 μl を 1.5 ml のポリプロピレン製遠沈管に採り，次に 100 μl のアセトニトリルを加え混合し，析出した血清タンパク質を約 10000 *g* で 2 分間遠心 (KM-15200，久保田商事) して沈殿させる．遠心して得た上澄み 100 μl を正確にマイクロシリンジ (ハミルトン，250 μl 用) に採取し，続いて同じマイクロシリンジ内に対イオンである 10 mM のヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液 (pH 2.8，酢酸で調製) 100 μl を採取する．マイクロシリンジ内に気泡を作り，気泡を少なくとも 10 回マイクロシリンジ内を上下移動させ混和後，高速液体クロマトグラフに注入する．得られたクロマトグラム上で FD のピークの高さを求め，別に作

* 北里大学薬学部：108　東京都港区白金 5-9-1
** 沈阳药学院：中華人民共和国沈阳市文化路 2-7

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

成した FD の検量線の回帰直線の方程式を用いて定量する.

2•4•2 尿 尿 100 μl を 10 ml の目盛付き試験管に採り，蒸留水で 5 ml にし混和後，希釈尿 50 μl を正確にマイクロシリンジに採取し，後は 2·4·1 の操作でヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液を 50 μl にて行った.

3 結果及び考察

3•1 前処理及び分離条件の検討

従来の FD の血清からの抽出法は，エーテル[9)10)12)]，ヘキサン[7)]，エーテル-ヘキサン[11)]，塩化メチレン[13)]のような水と混和しない有機溶媒を用いて抽出しているが，この抽出操作は度々エマルジョンを生じ層分離に時間がかかる．又，この方法は分離した有機相を乾固し，移動相に溶解して高速液体クロマトグラフの試料とするという手間のかかる方法である．そこで，今回，著者らは主に分析を妨害するタンパク質を除去するために，水と混和する有機溶媒アセトニトリルを使用する除タンパク法を用いた．血清 100 μl と微量の検体を使用して，100 μl のアセトニトリルを加え，析出した血清タンパク質を遠沈するという簡単な操作である.

FD は，分子内にカルボン酸とアミノ基をもつ両性イオン物質であり，アミノ基に注目して種々の対イオンを検討したところ，ヘキサンスルホン酸を用いたとき，FD の保持時間のところに血清中の混在物のピークは見られなかった．このとき，アセトニトリル除タンパクだけの上澄みを分析すると，FD のピークは不対称となり定量はできなかった．そこで，上澄みに移動相に添加しているヘキサンスルホン酸を含む対イオン水溶液 (0.01 M, pH 2.8) を加えシリンジ内で混和して，上澄み中のアセトニトリルの含量を希釈し分析すると，FD のピークは対称となり，標準品の保持時間と同じ位置に溶出し定量が可能となった．その結果を Fig. 1 に示す．シリンジ内での混和は，上澄みを他の容器に移す操作が簡略化され，迅速な前処理操作となった.

3•2 測定条件の検討

FD は酸性域で蛍光を発する物質で，pH によって蛍光強度が変化する[6)]．又，移動相の組成と pH によっても励起波長及び蛍光波長が異なるので[1)~7)9)~11)13)]，測定時の条件での波長を決めなければならない．前述の 3·1 で得た移動相は，イオン対クロマトグラフィーを行う条件で pH 3.5 であり，蛍光も存在した．FD を移動相に溶解して得た励起及び蛍光スペクトルを Fig. 2 に示す．励起極大波長は 333 nm, 蛍光極大波長は 415 nm であった．測定波長を各極大波長に設定した.

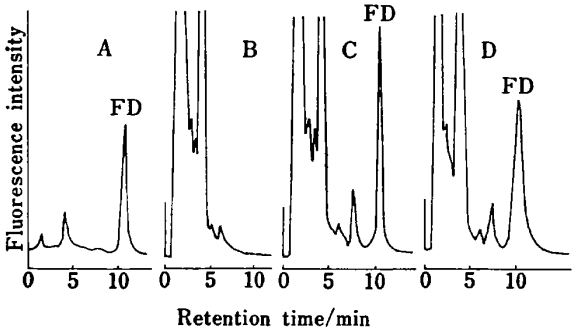

Fig. 1 Chromatograms of standard sample (A), blank serum with counter ion (B), spiked serum with counter ion (C), and spiked serum without counter ion (D)
FD : furosemide

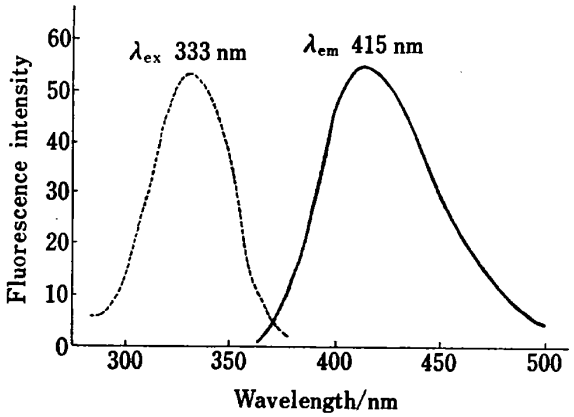

Fig. 2 Excitation and emission spectra of furosemide in mobile phase
Furosemide concentration : 376 ng/ml

3•3 検量線及び定量精度の検討

3•3•1 血清 低濃度 FD 標準血清 (25, 50, 100, 250 ng/ml) 及び高濃度 FD 標準血清 (0.5, 1, 2, 5, 10 μg/ml) を調製し，蛍光計の感度を変え，各々 3 回ずつ 2·4·1 に従って処理し，得られたクロマトグラム上で FD のピークの高さの平均値を求め，検量線を作成した．横軸 (x) に FD 濃度を，縦軸 (y) にピーク高さをとり，最小二乗法により回帰直線の方程式を求めたところ，低濃度は，$y=0.085x+0.458$ ($r=0.999$)，高濃度は，$y=2.079x+0.119$ ($r=0.999$) の式を得，濃度とピーク高さとの間に良好な直線性があった．回収率は検量線作成のとき，血清の代わりに 50% メタノール 1 ml を加えて処理し，得たピーク高さを比較して求めたところ，低濃度 93.5%，高濃度 101.7% と非常に良好であった.

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

FD を添加した血清を用いて，再現性を見たところ，Table 1 に示す値を得た．日内変動は 3.48%，日差変動は 2.07% 以下と良好な結果が得られた．検出感度は，$S/N=2$ で，FD 濃度 2.5 ng/ml であった．

Table 1 Reproducibilities for analysis of furosemide in serum

Furosemide concentration in serum/ ng ml^{-1}	R. S. D. †, %	
	Within-run (n=10)	Day-to-day (n=6)
116.5	3.48	2.07
233	3.40	1.44
466	2.66	0.4

† Relative standard deviation

3•3•2 尿 FD を 25, 50, 100, 250, 500 ng 採取し，尿を蒸留水で 50 倍希釈し，その希釈尿を 1 ml 加え，FD 標準希釈尿 (25, 50, 100, 250, 500 ng/ml) を調製した．各々原尿中の FD 濃度として (1.25, 2.5, 5, 12.5, 25 μg/ml) である．この FD 標準希釈尿を各各 3 回 2•4•2 に従って処理し，得られたクロマトグラム上で FD のピーク高さの平均値を求め，検量線を作成した．横軸(x)に FD 濃度を，縦軸(y)にピーク高さをとり，最小二乗法により回帰直線の方程式を求めたところ，$y=0.078x+0.012$($r=0.999$)の式を得た．回収率は，検量線作成のとき，50 倍希釈した尿液の代わりに 50% メタノール 1 ml を加えて処理し，得たピーク高さを比較して求めたところ，90.8% と良好であった．FD 標準希釈尿を用いて，再現性を見たところ，500 ng/ml の検体で日内変動は 2.58% (n=11) と良好な結果が得られた．検出感度は，$S/N=2$ で，FD 濃度 5.8 ng/ml であった．

以上，本法は前処理にアセトニトリル除タンパクとシリンジ内での対イオン混和という簡単な操作で再現性及び精度よく定量でき，実際試料に適応できる方法と言える．

文 献

1) 内野克善，山村喜一，斎藤侑也，磯崎貞夫，田村善蔵，中川富士雄，関根一雄，小島 至：薬誌，**104**, 1101 (1984).
2) W. J. Tilston, A. Fine : *Clin Pharmacol. Ther.*, **23**, 644 (1978).
3) W. Rupp and P. Hajdu : "*Pharmacokinetic and Pharmacodynamics of a diuretic agent*", in H. J. Dengler ed. : "*Symposium on Pharmacological and Clinical Significance of Pharmacokinetics*", p. 105 (1970), (F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart).
4) F. Anderasen, E. Millelsen : *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **12**, 15 (1977).
5) B. Lindstrom, M. Molander : *J. Chromatogr.*, **100**, 189 (1977).
6) R. S. Rapaka, J. R. CT. Viswanathan, T. J. Goehl, V. K. Prasad, B. E. Cabana : *J. Chromatogr.*, **227**, 463 (1982).
7) R. L. Nation, G. W. Peng, W. L. Chiou : *J. Chromatogr.*, **162**, 88 (1979).
8) E. T. Lin, D. E. Smith, L. Z. Benet, B.-A. Hoener : *J. Chromatogr.*, **163**, 315 (1979).
9) S. E. Swezey, P. J. Meffin, T. F. Blaschke : *J. Chromatogr.*, **174**, 469 (1979).
10) K. Carr, A. Rane, J. C. Frolich : *J. Chromatogr.*, **145**, 421 (1978).
11) A. L. M. Kerremans, Y. Tan, C. A. M. Nan Ginneken, F. W. J. Gribnau : *J. Chromatogr.*, **229**, 129 (1982).
12) W. Snedden, J. N. Sharma, P. G. Fernandez : *Therapeutic Drug Monitoring*, **4**, 381 (1982).
13) K. Uchino, S. Isozaki, Y. Saitoh, F. Nakagawa, Z. Tamura, N. Tanaka : *J. Chromatogr.*, **308**, 241 (1984).

☆

Determination of furosemide in serum and urine by high performance liquid chromatography. Hiroaki Kubo*, Haozhi Li**, Yoshie Kobayashi and Toshio Kinoshita* (*School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5–9–1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108; **Shenyang College of Pharmacy, 2–7, Wenhua Road Shenyang, People's Republic of China)

A simple, rapid and reproducible method for the determination of furosemide in serum and urine by high performance liquid chromatography has been developed. Only 100 μl of serum is required. Serum proteins are precipitated with 100 μl of acetonitrile. After the centrifugation, 100 μl of the supernatant and the same volume of the counter ion solution (0.01 M hexanesulfonic acid sodium salt, pH 2.8) is drawn into a microsyringe, successively. Urine is diluted with water to 50 times. Fifty microliters of the diluted urine and then the same volume of the counter ion solution are drawn into the microsyringe. Afer mixing the two solutions in the microsyringe, the whole mixture is directly injected into the chromatograph. The chromatograph used is that from Waters Associates consisted of a model 6000 A pump and a U6K injector. A Radial Pak μ Bondapak C_{18} (10 μm, 10 cm × 8 mm i. d.) cartridge was used as the analytical column. The flow rate of mobile phase, 30% acetonitrile solution containing 5 mM hexanesulfonic acid sodium salt (pH 3.5) was 2.5 ml/min. The eluate was monitored with a Hitachi F-1000 fluorescence detector. The wavelength of excitation was 333 nm and that of emission was 415 nm. The retention time for furosemide was 11 min. A calibration curve was linear in the range from 25 ng/ml to 10 μg/ml for the serum and from 1.25 μg/ml to 25 μg/ml for the urine. The limit of detection was 2.5 ng/ml of serum and 5.8 ng/ml of urine. The recoveries of added furosemide were above 93.5% for the serum and 90.8% for the urine. For the analyses

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

of serum samples at 116.5, 233 and 466 ng/ml, the within-run reproducibilities were 3.48, 3.40 and 2.66% ($n=10$) respectively, and those of the day-to-day were 2.07, 1.44 and 0.40% ($n=6$) respectively. For the diluted urine, the within-run reproducibility for 500 ng/ml was 2.58% ($n=11$).

(Received October 1, 1985)

Keyword phrases

fluorometric determination of furosemide in serum and urine; deproteinization with acetonitrile; ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography.

NII-Electronic Library Service