

## 膵液、胆汁中ジメタジオン濃度の測定

—抽出法の検討ならびにガスクロマトグラフ法と高速液体クロマトグラフ法との比較—

日野 一成, 近藤 佳典, 島原 将精, 三井 康裕, 高取 敬子,  
山本 亮輔, 井手口清治, 大海 庸世, 山本晋一郎, 平野 寛

膵液、胆汁中に排泄されるジメタジオン (DMO) 濃度をガスクロマトグラフ法 (GC), 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) で測定する際の検体の抽出法を考察した。検体を酸性化し、クロロホルム/メタノール (2:1) を加え塩析することで二層に分離可能であった。また、その検体は GC, HPLC 両者に使用が可能であった。(平成4年12月1日採用)

### A New DMO Extraction Method for GC and HPLC

Kazunari Hino, Yoshinori Kondo, Masakiyo Shimabara,  
Yasuhiro Mitsui, Keiko Takatori, Ryosuke Yamamoto, Seiji Ideguchi,  
Tsuneyo Ohumi, Shinichiro Yamamoto and Yutaka Hirano

We designed a new method for extraction of DMO from bile and pancreatic juice for measurement by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC).

The extraction procedure is as follows: To 1 ml of material in a test tube a small quantity of HCL, 2 ml of chloroform/methanol (2:1) and 0.8 mg of maleimide are added as internal standard for GC. There is no standard for HPLC.

To perform salt out, some NaCl is added to the tube. Then the tube is shaken for 3 min and centrifuged at 1500 g for 1 min. The chloroform layer obtained is dried as a sample.

Sample can be analysed by both GC and HPLC. (Accepted on December 1, 1992)

*Kawasaki Igakkaishi 18(4): 323-326, 1992*

- Key Words** ① Dimethadione ② Gas chromatography  
③ High performance liquid chromatography  
④ Extraction procedure

## はじめに

ジメタジオン (dimethadione; DMO) は、てんかん小発作治療薬トリメタジオン (trimethadione; TMO) が生体に取り込まれた後に肝で脱メチル化されて生成される物質である。<sup>1)</sup> この反応はすばやく進行することから TMO (ミノアレピアチン<sup>®</sup>) の有効血中治療量を決定する際の代用として DMO が測定されており、ガスクロマトグラフ法 (GC)<sup>2)</sup> によることが多い。近年、TMO を膀胱溶解療法に用いる可能性が指摘され、てんかん小発作治療薬以外の用途が注目されはじめている。本法は、TMO を内服すると肝で変化し DMO となり血中に放出され、それが膀胱中に排泄されると DMO の持つ弱酸性の性質から膀胱を構成している  $\text{CaCO}_3$  が溶解するという原理に基づいている。<sup>1)</sup> 我々も DMO を用いた膀胱溶解療法の検討を行っており、GC で膀胱液中 DMO 濃度を測定しているが、<sup>3), 4)</sup> 今回 DMO 濃度測定のための独自の抽出法を考案したので報告する。さらに、その方法を用いて胆汁中 DMO の抽出も可能か否を検討するとともに、最近、血中 DMO 濃度測定に用いられるようになった高速液体クロマトグラフ法 (HPLC)<sup>5)</sup> にも同様の方法で抽出した検体を用いるかどうかを調べ、また、GC と HPLC との比較も行ったのであわせて報告する。

## 測定法

1. GC: 装置は島津 GC-5A. 検出器は水素炎検出器 (FID). ガラスカラム  $1.5 \text{ m} \times 3.3 \text{ m}$ . 充填剤は TENAX<sup>®</sup> GC. キャリアーガスは  $\text{N}_2$  65 ml/min,  $\text{H}_2$  50 ml/min, エア-0.8 l/min. カラム温度は  $160 \sim 250^\circ\text{C}$  で昇温速度は  $8^\circ\text{C}/\text{min}$ .

2. HPLC: 装置はウオー

ターズ. マルチソルベントシステム. カラムは YMC-Pack ODS-Ap ( $150 \times 4.6 \text{ mm I.D.}$ ). サンプルの調整は乾固した抽出物をメタノールに溶解させた. 溶解液はアセトニトリル/水 ( $\text{H}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) = 18:85 で流速は 0.8 ml/min. 検出は 203 nm.

## 抽出操作

GC, HPLC ともに同じ抽出操作を行う。

1. コントロール: 試験管にベンゼンに溶解させたマレイミド (0.8 mg/ml) を入れ、内部標準とする。さらにベンゼンに溶解させた DMO (1 mg/ml) を加え乾固させる。TMO 投与前の膀胱液、胆汁を 1 ml 加えボルテックスで数秒混和した後、HCL 数滴で酸性化する。クロロホルム/メタノール = 2:1 の割合で混和した抽出液 (クロメタ) 2 ml を加え、ボルテックスで 3 分間混和した後、NaCl 少量を加え 1500 G, 1 分間遠沈し塩析する。その下層を採取し乾固させて検体とする (Fig. 1)。

2. 測定用膀胱液と胆汁: コントロールと同様に試験管にマレイミド (0.8 mg) を入れるが、DMO は入れずに乾固させる。それに膀胱液、胆汁 1 ml を加えコントロールと同様の処理を行い、乾固させた検体を得る。

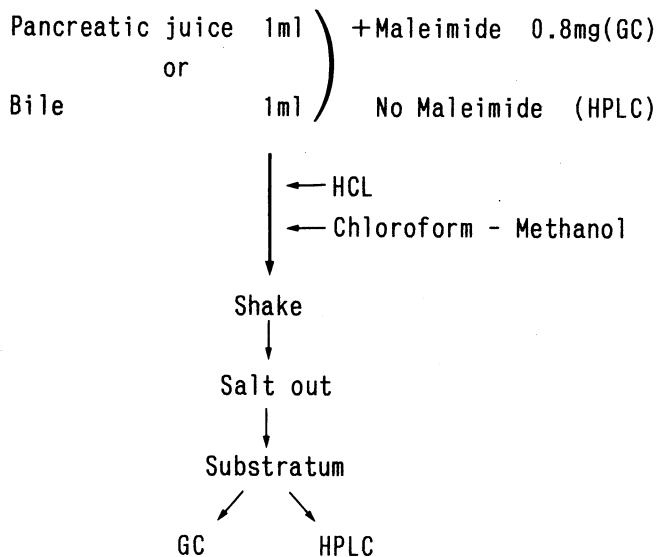


Fig. 1. Extraction procedure

なお、HPLCでは内部標準は不用であるためマレイミドは入れなくてよい。

### 試料中 DMO 濃度の算定

1. GC：上記の操作で得られた検体を 75  $\mu$ l のクロメタに溶解し、その内 2  $\mu$ l を GC 装置内に注入する。コントロールの測定で得られた 1 mg/ml の DMO のピークと DMO 未知量の検体の DMO と思われるピークの面積比を Chromatogram Processor Model 7000 B で求め、液体中の DMO 濃度を計算した (Fig. 2)。

2. HPLC：既知量の DMO を胆汁に添加したもので検量線を作製し、それより算定した (Fig. 3)。

### 対 象

1. 膵液：急性膵炎後に膵嚢胞が発生したため持続膵嚢胞ドレナージを実施中の40歳女性に、

ヘルシンキ宣言にのっとり説明し了解を得た上で TMO 1.5 g/日を 3 日間服用させ、服用開始後 2 日目、3 日目および服用終了翌日の膵液をドレナージチューブより採取した。

2. 胆汁：肝門部胆管癌による閉塞性黄疸で PTCO を実施中の66歳女性に、上記と同様の了解のもとに TMO 1.5 g/日を 7 日間内服させ、7 日目の胆汁を採取した。これを約 1 カ月の間隔をあけて 2 回繰り返した。

### 成 績

1. 膵液中 DMO 濃度：1 検体につき GC でのみ 3 回測定した。2 回目  $200 \pm 110 \mu\text{g/ml}$ 、3 回目  $580 \pm 130 \mu\text{g/ml}$ 、投与終了翌日  $610 \pm 90 \mu\text{g/ml}$  であった。

2. 胆汁中 DMO 濃度：1 検体につき 3 回測定した。初回投与時の 7 日目は GC で  $300 \pm 40 \mu\text{g/ml}$ 、HPLC で  $290 \pm 32 \mu\text{g/ml}$ 、2 回投与時は GC で  $430 \pm 45 \mu\text{g/ml}$ 、HPLC で  $350 \pm 30 \mu\text{g/ml}$  であった。

### 考 察

GC で膵液中で DMO 排泄濃度を測定するための抽出法を検討した。GC による血中 DMO 濃度測定のための抽出法を記載した文献<sup>1)</sup>はみられたものの、膵液よりの抽出法を明確に記載したものは見当たらなかった。そこで液状生体材料から種々の物質を抽出する場合のオーソドックスな方法を参考にして抽出を試みた。すなわち、内部標準を添加した上で酸性化した検体に各種脂質を抽出する効率の良いクロメタを加え、振盪させた後、遠心分離して測定物質が移行

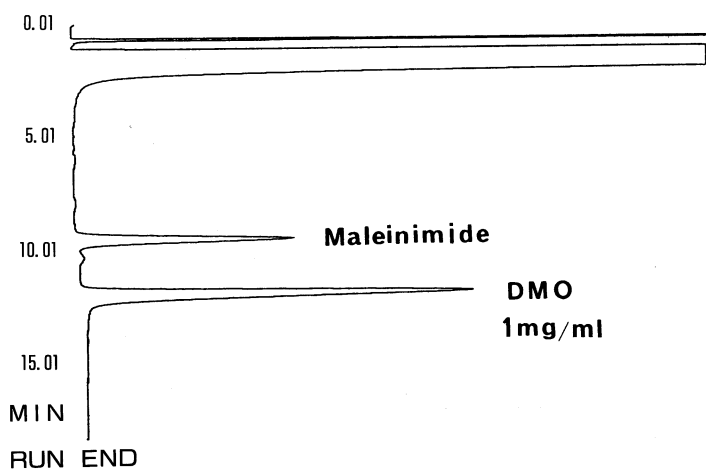


Fig. 2. GC of DMO in bile and pancreatic juice

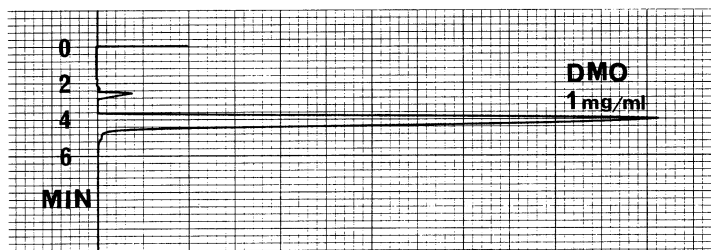


Fig. 3. HPLC of DMO in bile

したクロロホルム層を採取する方法である。しかし、膵液の場合これのみでは二層の分離は不可能であった。これは、おそらく両親媒性である脂質、蛋白質の存在比率によるものと思われる、通常、分離しにくい両親媒物質はNaClを加えることによってクロロホルム層に移行しやすくなることから塩析を併用した。これによって膵液を含む水層とクロロホルム抽出層を完全に分離することが可能となった。

このようにして得られた検体をGCで測定すると、前述のように200~610  $\mu\text{g/ml}$ のDMOが膵液中に排泄されていることが証明され、NODAらのTMO 1.3~2.0 g/日 $\times$ 3~4日投与で150~350  $\mu\text{g/ml}$ との報告<sup>6)</sup>と比べて同等かやや多い量であることがわかった。

胆汁も同様の抽出法で検体が得られたのでGC

で測定した結果、TMO 1.5 g/日 $\times$ 7日間投与で300~430  $\mu\text{g/ml}$ のDMOが排泄されていることが証明された。我々の抽出法で胆汁から抽出した検体はHPLCにも応用が可能であって、前記の検体はHPLCでは290~350  $\mu\text{g/ml}$ とほぼGCと同等の値が測定可能であった。

以上のことから、我々の抽出法は膵液、胆汁の両者について有効であり、GC、HPLCともに測定可能であることが明らかとなった。

なお、稿を終わるにあたり、検体抽出法についてご教示いただいた前生化学2教室教授 日下喬史先生、GCについてご協力いただいた生化学センター 中野裕之技術員ならびにHPLCについてご協力いただいた同センター 児子弥生研究補助員に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 野田愛司：経口膵石溶解療法。ファルマシア 23：591—595, 1987
- 2) Tanaka, E. and Misawa, S. : Simultaneous determination of serum trimethadione and its metabolite by gas chromatography. J. Chromatography 413 : 376—378, 1987
- 3) Hino, K., Takatori, K., Yamamoto, R., Ideguchi, S., Ohmoto, K., Ohumi, T., Yamamoto, S. and Hirano, Y. : A New dissolution effect of DMO on human pancreatic stone. Kawasaki Med. J. 17 : 15—22, 1991
- 4) 日野一成, 高取敬子, 山本亮輔, 井手口清治, 大元謙治, 大海庸世, 山本晋一郎, 平野 寛 : Dimethadione (DMO) の膵石溶解機序と膵液中排泄量に関する実験的検討。日消誌 88 : 526, 1991
- 5) 中野晃宏, 元山 茂, 小林讓司, 山田 浩, 早田道治, 吉村正一郎 : 高速液体クロマトグラフィーによるヒト血清中ジメタジオンの測定。病院薬学 13 : 149—151, 1987
- 6) Noda, A., Hayakawa, T., Mizuno, R., Hamano, H., Murase, T. and Shibata, T. : The excretion of dimethadione in pure pancreatic juice and bile in postoperative patients. Gastroenterologia Jpn. 19 : 121—126, 1984