Ampicillin と Cloxacillin の薄層クロマトグラフィーによる分離定量法について

西田 実・村川武雄
藤沢薬品工業株式会社中央研究所
五島瑳智子
東邦大学医学部微生物学教室
藤井良知・紺野昌俊・岡田一穂
東京大学医学部分院小児科

(昭和 44 年 7 月 7 日受付)

Ampicillin (Aminobenzyl-penicillin, AB-PC) と Cloxacillin (Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin, MCI-PC) の分離定量法として両者の抗菌活性の相違を利用し，感受性の異なる2種類の菌を検定菌とする方法が考えられる[1]。この方法は定量感度が低いため，臨床投与量における生体濃度の測定がやや困難である。また両薬剤の相乗効果[2,3,4]が定量値に影響するのではないかという批判を生ずる。このような問題を解決するため各種の Chromatography および寒天ゲル電気泳動を用いる方法を検討し，Thin layer chromatography (TLC) で分離後，Bioautography で処理して得られた活性スポットを測定する方法を考案した。この方法は両 Penicillin の分離定量法として生体試料中の薬物の測定にも利用し得ることを認めたのでこれについて報告する。

実験方法および結果

1) 使用抗生物質

Ampicillin(AB-PC) および Cloxacillin(MCI-PC) は Beecham 研究所で製造された Penbritin (Trade name, 力価 832 mcg/mg) および Orbenin (Trade name, 力価 901 mcg/mg) を使用した。

2) Thin Layer Chromatography (TLC)

市販イーストマン社製シリカゲル，クロマトシート No. 6061 (20×20 cm) を用いる上昇法でおこなつた。展開溶媒として *n*-ブタノール：酢酸：水(4：1：5, 容量)を用いた。両 Penicillin の標準液は尿試量では M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で，血清試料については血清で AB-PC および MCI-PC をそれぞれ 3.12, 6.25, 12.5, 25.0 mcg/ml(力価) となるよう希釈した。いつぽう，血清を添加した標準液および血清試料は2倍量の 95% エタノールを加えて5分間攪拌し，その遠心上清を用いた。また尿試料は推定約 10 mcg/ml となるよう蒸溜水で希釈した。検液の TLC シートへのスポットはつぎのような方法によつておこなう。すなわち標準液および尿試料は 8 μl, 血清試料では 24 μl スポットする。この場合ミクロシリンジ (仁丹テルモ, MS-10) で予め検液の一定量を採取し，これを適当な太さのガラス毛細管(私製) に吸収し，この毛細管内検液を冷風を送りながらシートの原点部にスポットする。各スポットの間隔は 2.5 cm くらいが適当である。なおこの際，スポットの大きさは直径が 6～7 mm になるよう規定する。スポット部が完全に乾燥した後，上昇法で 12～14 cm 展開させる。展開後はシートを風通しのよいところで風乾する。

3) Bioautography

定量培地として，肉エキス 0.3 g, ペプトン 0.5 g, クエン酸ソーダ 1 g および寒天末 1 g を精製水と混じ，全量 100 ml とした。これを 120°, 20 分高圧滅菌して，培地が 40～50°C に冷えてから *B. subtilis* ATCC-6633 を培地中に 10^4～10^5/ml となるよう接種した。なお試験培地の pH は修正しない。また接種培地は厚さ 2.5～3 mm となるよう Bioautography 用のガラス平板上に流しこむ。この際生ずる気泡を防止するため，市販消泡剤アデカノール原液をエタノールで4倍に希釈し，この希釈液を培地 500 ml につき1滴添加する。

つぎに展開後，風乾した TLC シートを寒天培地に密着させ，5°C で 1～2 時間放置し，これを排除後 37°C で約 20 時間培養する。以上の操作によつて得られる Biogram は Paper chromatograph で得られたのと異なり，ほぼ円型の阻止帯を与える。

4) 検量線および測定誤差

図1は上述の方法によつて得られた TLC の Bioautograph の例である。

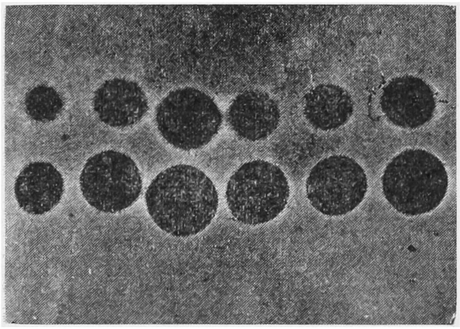
図2は同様に上記の方法によつて得られた検量線を示したものである。横軸は AB-PC および MIC-PC の検液中の濃度を対数スケールであらわした。縦軸はこれらの Penicillin 濃度に対応して得られた阻止帯を実測し，それらの直径を mm で示したものである。AB-PC および MCI-PC の濃度 3.1, 6.25, 12.5 および 25.0 mcg/ml の4点における各阻止円径の実測値から標準誤差および標準偏差を求めると，表1の結果が得られる。この結果は従来おこなわれている抗生物質の Bioassay の精

表1 本法の実験誤差

PC	濃度 (mcg/ml)	阻止円径 (mm)					平均 (mm)	標準誤差 (mm)	標準偏差 (mm)
AB-PC	25.0	20.5	20.8	20.3	20.6	20.8	20.60	0.10	0.21
	12.5	16.6	16.2	16.4	16.5	16.8	16.50	0.10	0.22
	6.25	12.7	12.2	12.0	12.6	12.0	12.30	0.15	0.33
	3.1	7.9	8.2	8.5	7.8		8.10	0.16	0.31
MCI-PC	25.0	18.8	18.4	18.6	18.9		18.68	0.11	0.22
	12.5	14.8	15.1	15.0	14.7		14.90	0.09	0.18
	6.25	10.5	10.0	10.0	9.8		10.01	0.15	0.30
	3.1	6.0	6.3	6.7	6.4		6.35	0.14	0.29

図1 Bioautographs

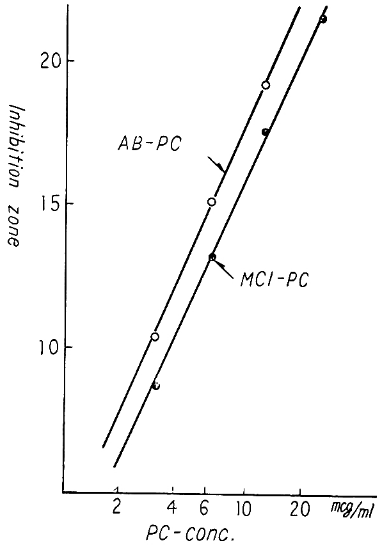
MCI-PC (alove) and AB-PC (below)



1 2 3 B U U

1～3 : Standard (5 μl apply)
1 : 5 mcg/ml, 2 : 10 mcg/ml, 3 : 20 mcg/ml
B : Serum sample
U : Urine sample

図2 検量線



度と比較して優劣がなく，定量法として充分利用し得るものと考えられる。

5) 除蛋白処理の影響

本法でシリカゲル・クロマトシートに Penicillin をスポットし，ここで使用した有機溶媒を含んだ展開剤で直接展開すると両 Penicillin の分離は良くない。そこで血清に2倍量（容量）の 95% エタノールを加え，除蛋白後その遠心上清を試料としてスポットした。この操作は蛋白結合性の強い MCI-PC などの血清濃度の測定値に影響を及ぼすことが予想されたので以下のような検討を加えた。ただ本法では直接血清試料を用いても，信頼し得る成績が得られなかつたので，この検討はディスク法でおこなつた。すなわちウサギ血清9容に Penicillin 溶液1容を加え，これに2倍量の 95% エタノールを加えた試料，およびエタノールを加えない試料を調製した。この検討に際し AB-PC および MCI-PC の濃度は最終濃度として表示のとおり 5 mcg/ml または 10 mcg/ml を使用した。なお表2の値は血清の代りに M/15 リン酸緩衝液(pH 7.0) を用いて同様に操作し，得られた測定値を 100 とした場合の比較値である。

この結果から蛋白結合性の強い MCI-PC の場合，ここに用いた濃度において除蛋白処理を省略すると，添加量の約 40% が回収されるにすぎない。これにたいしエタノール処理では約 80% が回収された。なお AB-PC は両法間に差はみられなかつた。血清試料については，その検量線に血清希釈による標準液を用いて行なうので，血清による測定値への影響は相殺されるので問題はないが，以上のことよりエタノールによる除蛋白処理は，両 Penicillin の TLC による分離をよくするのみならず，MCI-PC の free の回収率が大となり，その感度をよくする方向に作用している。

6) **AB-PC および MCI-PC 同時投与ウサギの血清中濃度および尿中濃度の測定例**

ウサギ（健常♂，2.5 kg）に AB-PC および MCI-PC

表 2 エタノール処理（除蛋白）と PC 回収率

PC conc*.	PC	処理なし (%)	エタノール処理 (%)
10 mcg/ml	AB-PC	100	97
	MCI-PC	40	83
5 mcg/ml	AB-PC	100	98
	MCI-PC	38	80

* 90% ウサギ血清中濃度
数値は *B. subtilis* を用い Disk 法で力価を測定し，対照として同じ処理をした，同濃度の PC 水溶液を用いて，この力価を 100 として表示

をそれぞれ 100 mg/kg 経口投与し，投与後 30 分および 60 分における血清中濃度を本法で測定した。また同一の血清試料について 2 種の菌を用いるディスク法 (AB-PC; *E. coli* NIHJ, MCI-PC ; *Staph. aureus* No. 20) で測定し，両者の成績を比較した。結果は表 3 のとおりである。本法では AB-PC の 30 分値が 7 mcg/ml にたいして旧法では 5 mcg/ml，60 分値では本法で 14 mcg/ml にたいし，旧法では 12 mcg/ml となつた。MCI-PC では旧法の感度が悪く，この投与条件で得られる血清試料については両者の比較成績は求められなかつた。

つぎに尿中濃度では，投与後 3 時間までに得られた尿試料で本法における AB-PC の測定値は 125 mcg/ml にたいし，旧法では 120 mcg/ml，MCI-PC の場合，98 mcg/ml（本法）と 105 mcg/ml（旧法）という結果が得られた。6 時間尿についても同様の比較をおこなつたが 3 時間尿と同じく比較的よく一致した結果が得られた。

表 3 本法とディスク法の比較

Sample*1 (rabbit)	Time \ 方法 PC	本法 AB-PC (mcg/ml)	本法 MCI-PC (mcg/ml)	Disk method*2 AB-PC (mcg/ml)	Disk method*2 MCI-PC (mcg/ml)
Serum	30 min.	7	2	5	—
	60	14	5	12	—
Urine	0～3 hr.	125	98	120	105
	3～6	430	295	450	330

*1 PC をそれぞれ 100 mg/kg 経口投与したウサギより採取
*2 試験菌 AB-PC, *E. coli* NIHJ ; MCI-PC, *S. aureus* No. 20

7) AB-PC, MCI-PC 投与ヒト血清中の両 Penicillin 濃度測定例

AB-PC および MCI-PC を同時に 250 mg づつ筋注した健康なヒトから採血し，その血清中濃度を本法で測定した。その結果は表 4 のとおりである。

3 例のうち 1 例は投与後 360 分にわたつて測定したが，240 分の血清で AB-PC は 0.6 mcg/ml，MCI-PC は測定できなかつた。他の 2 例は投与後 120 分目の血清で AB-PC 2～3 mcg/ml，MCI-PC 2～4 mcg/ml が測定された。

表 4 本法の応用例

ヒト血清中濃度 (mcg/ml)

Time \ Volunteer PC	M.T. ♂ 58 kg AB-PC	M.T. ♂ 58 kg MCI-PC	M.M. ♂ 63 kg AB-PC	M.M. ♂ 63 kg MCI-PC	N.K. ♂ 51 kg AB-PC	N.K. ♂ 51 kg MCI-PC
30 min.	10.2	15.1	8.3	9.6	5.4	8.2
60	6.5	9.4	5.1	4.9	4.3	5.2
120	2.8	2.0	2.5	2.0	3.2	4.2
240	0.6	—				
360	trace	—				

Dose ; AB-PC, 250 mg : MCI-PC, 250 mg i. m.

考察

Chromatography を利用する抗生物質の Bioassay としては，M. L. KARNOVSKY[6] らは Penicillin の培養液中の活性物質の分離定量法を報告している。その後 R. P. MILLER[7] は Cephalosporin 類の分離法として同様の方法を検討し，測定法の詳細について報告している。これらの報告では Paper chromatography を利用しているので Bioautogram の阻止帯は楕円型となり，生体試料のような tailing をしやすいものの定量には，測定時に問題を生じる場合がある。本法では TLC を用いたので，このような現象の発生が非常に軽度である。この点から測定時の誤差はかなり縮少されるものと考えられる。

また 1 つの問題点として常法の Bioassay では 血清蛋白との結合性の強い物質，たとえば Isoxazolyl 系 Penicillin 類の測定値は，測定時のわずかな条件の相違によつて動揺する。すなわち，用いられた条件下で遊離される free Penicillin 量によつて，値が変動すると思われる。本法では血清採取後，有機溶媒で除蛋白するため MCI-PC の試料中の free の量はこの場合大きくなつている。したがつて血清をそのまま使用する Bioassay より定量感度はよくなると思われる。また本法で得られる血清中の両 Penicillin 濃度は total 値が得られる。血清蛋白との結合が強い MCI-PC の free の量は，血清試料を限外沪過を行ない，沪液について Buffer 希釈 Standard の検量線で算出する。

なお本法では被検 Penicillin として AB-PC および MCI-PC を選び，両者の分離定量についてのみ検討を加えたが，適当な展開液を選んで，ここに記載した条件に準じて実験すれば他の Penicillin 類および他の抗生物質の分離定量も可能であると推定される。

まとめ

AB-PC と MCI-PC の分離定量法として TLC で両者を分離後 Bioautography で両者を定量する方法を考案した。この方法によつて両 Penicillin の濃度 3～20 mcg/ml の範囲において定量に適当な検量線が得られた。またこの方法は両 Penicillin を同時に投与したウサギ血清および尿試料の両 Penicillin の分離測定に応用することが出来る。

稿を終るにあたり，本研究に御援助をいただいた藤沢薬品・中央研究所，中野所長および熊田部長に謝意を表します。また実験に協力をいただいた若井芳美，戸井康子の両氏に感謝します。

文献

1) 峯 靖弘，西田 実：Aminobenzyl-penicillin と Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の微生物を用いる分離定量。(未発表)
2) 峯 靖弘，西田 実，五島瑳智子：Aminobenzyl-penicillin と Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の協力作用に関する研究（I）試験管内抗菌作用。Chemotherapy 17 (6)：974～978, 1969
3) 峯 靖弘，西田 実，五島瑳智子：Aminobenzyl-penicillin と Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の協力作用に関する研究（II）病原細菌による Aminobenzyl-penicillin の分解にたいする Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の阻止作用。Chemotherapy 17 (6) 979～985, 1969
4) 峯 靖弘，西田 実，五島瑳智子：Aminobenzyl-penicillin と Methylchlorophenylisoxazolyl-penicillin の協力作用に関する研究（III）動物感染治療効果および吸収排泄について。Chemotherapy 17 (6)：986～992, 1969
5) MINORU NISHIDA, YASUHIRO MINE & SHOZO KUWAHARA. Synergistic activity of ampicillin and cloxacillin. Protective effect of cloxacillin on enzymatic degradation of ampicillin by penicillinase, and therapeutic activity of mixtures of ampicillin and cloxacillin. J. Antibiotics 22 (4)：144～150, 1969
6) M. L. KARNOVSKY & M. J. JOHNSON：Filter paper chromatography of penicillin broths. Analytical Chemistry 21：1125～1132, 1949
7) RICHARD P. MILLER：A paper chromatographic assay for cephalosporins. Antibiot. & Chemoth. -1962：689～693, 1962

A CHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR THE MIXTURE OF AMINOBENZYL-PENICILLIN AND METHYLCHLOROPHENYLISOXAZOLYL-PENICILLIN

MINORU NISHIDA & TAKEO MURAKAWA
Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka
SASHIKO GOTO
Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine, Tokyo
RYOCHI FUJII, MASATOSHI KONNO & KAZUHO OKADA
Department of Pediatrics, Tokyo University Branch Hospital, Tokyo

A thin layer chromatographic assay method for separation and determination of AB-PC and MCI-PC in mixture was developed using a bioautographic technique. The measurement of the diameters of the inhibition zone was used as the mean of quantitation. With the conditions described, the values determined with this measurement is proportional to the amount of the penicillins present on the developed chromatogram. This method is useful for the separatory determination of AB-PC and MCI-PC in serum or urine after simultaneous administration of both penicillins.