

高速液体クロマトグラフィーによる血中アミノ配糖体系抗生物質の測定

渡 辺 誠

東京厚生年金病院薬剤部

近 藤 恭 子

東京厚生年金病院中央検査室

真 下 啓 明

東京厚生年金病院内科

川 本 健 志・島 津 邦 彦

株式会社島津製作所東京分析センター

(昭和 56 年 4 月 21 日受付)

アミノ配糖体系抗生物質の血中濃度モニタリングの方法を、トブラマイシンを中心に高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した。

使用機器にはアミノ酸分析システムを利用し、イオンペクロマトグラフィーによりポストカラム法にてケイ光試薬をラベルして検出した。前処理は ANHALT の方法を一部変更し、内部標準品には他のアミノ配糖体系抗生剤よりシソマイシンを選択して利用した。

本法による検量線は $0.5 \mu\text{g/ml} \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性が得られた。また本法での変動係数は $2.5 \mu\text{g/ml}$ の血清中濃度で 3.5% ($n=6$) であった。

本法の特徴は市販のアミノ酸分析システムを利用して用いることができ、特殊な装置を必要としないこと、内部標準品に他のアミノ配糖体系抗生物質を利用している点で簡易であり、また、誤差が少ないことがあげられる。さらに本法ではトブラマイシンのほかに、ネチルマイシン、ホルチミシン (KW-1070)、シソマイシンが現在のところ測定可能であり、また、他のアミノ配糖体系抗生物質に対しても応用が可能と思われる。

アミノ配糖体系抗生物質 (以下アミノ糖) は、強い抗菌力を有するためその臨床的価値は高く評価されているが、しばしば重篤な副作用をみるため投与が困難な場合も多い。近年、米国を中心に発達した臨床薬理学は血中濃度という新しい薬物側の指標に基づき、アミノ糖についても安全でかつ有効な投与法が報告され、現在わが国においても血中濃度モニタリングの必要性についての認識が高まりつつある¹⁾。

今回われわれはアミノ糖の血中濃度モニタリングの方法 (測定法) を高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) を用いてトブラマイシン (以下 TOB) を中心に検討を行なったので報告する。

I. 方 法

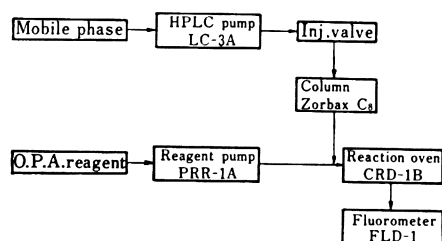
1) 機器およびカラム

装置は島津高速液体クロマトグラフ LC-3A, カラム恒温そう CTO-2A, サンプルインジェクター SIL-1A, 反応試薬送液ポンプ PRR-1A, 化学反応そう CRD

-1B, ケイ光検出器 FLD-1 (以上、島津アミノ酸分析システム) を用いた (Fig. 1)。

カラムには全多孔性シリカ微小球にオクチルシラン基を化学結合させた Zorbax-C₈ カラム (150 mm × 4.6 mm I. D.) を用い、p-トルエンスルホン酸ナトリウムによるイオンペクロマトグラフィーで分離した後、オルトフタルアルデヒド試薬でラベルし、ケイ光法で検出し

Fig. 1 Apparatus



Type: SHIMADZU

た。

2) 試薬および試液

a) 移動相：液クロ用蒸留水に、イオンペアの試薬として 0.025 M p-トルエンスルホン酸ナトリウムを加え、さらに 0.02 M リン酸 1 ナトリウムを加えて緩衝性をもたし、カウンターイオンとして過塩素酸ナトリウムを適量添加（後述）したのちリン酸で pH 2 に調整した。

b) 反応試薬：液クロ用蒸留水にホウ酸 9.4 g、水酸化ナトリウム 4.8 g、Brij-35 0.5 g を溶解し、あらかじめエタノール 6 ml に溶解しておいたオルトフタルアルデヒド 400 mg を加え、さらに 2-メルカプトエタノール 1 ml を加えたのち、蒸留水を全量 500 ml とし、水酸化ナトリウムで pH を 10.5 に調整して用いた。本試薬は用時調製した。

c) 内部標準物質（以下内標）：TOB の内標としてアミカシン、シソマイシン、マイクロマイシン（サガミシン・KW-1062）、ホルチミン（KW-1070）、ネチルマイシンを検討した結果、TOB と保持時間が近く完全に分離して検出できるシソマイシンを内標とし、ピーク高さが TOB の 5 μ g（カ価/ml とはほぼ同じ高さになる量）として 80 μ g（カ価/ml）に調製した。

3) 前処理法

オルトフタルアルデヒドは 1 級アミノ基を有する物質に対してケイ光を与えるので、血清中のアミノ酸が妨害となる。したがって前処理でタンパク以外にアミノ酸を除去する必要があり、CM セファデックスを用いた前処理を施した。生化学工業製のヘモグロビン AI 測定キット用カラム管に CM セファデックスゲルを 1 ml の容量に充填し洗浄したのちサンプル血清、内部標準液の順で添加する。次に 0.4 M 酢酸ナトリウム液でカラムを洗浄したのち、10 mM 水酸化ナトリウムを加えた 0.4 M 酢酸ナトリウム液でゲルに吸着したアミノ糖を溶離し、回収液を HPLC に注入する (Fig. 2)。

4) HPLC 条件

Table 1 に示した。

Table 1

Instrument	Fig. 1
Sample	Serum
Sample size	100 μ l
Column	Zorbax C ₈ 150 mm \times 4.6 mm I. D.
Column temp.	35°C
Mobile phase	see Text.
Flow rate	0.8 ml/min
Sensitivity	\times 4
Chart speed	2.5 mm/min
Reaction temp.	55°C
O. P. A. reagent flow rate	0.4 ml/min

II. 結 果

本法により得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示す。図中 A は血清ブランクに内標を添加したもので、B は 5

Fig. 3 Representative chromatogram of tobramycin (TOB) and sisomicin (IS) isolated from serum

A : Blank serum, B : Tobra mycin

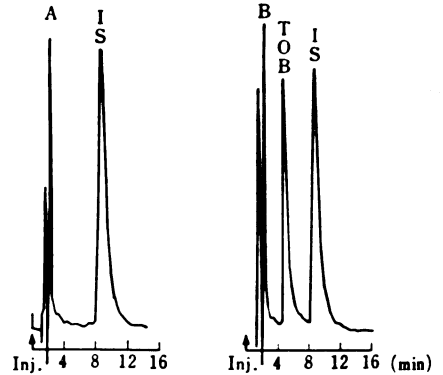


Fig. 4 Calibration curve for the determination of tobramycin in serum

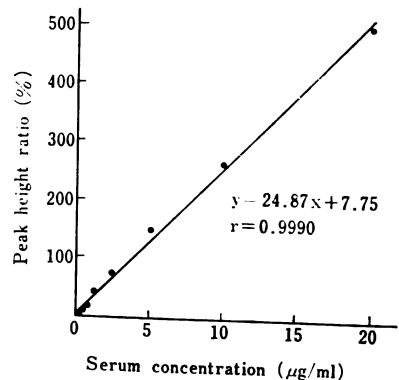
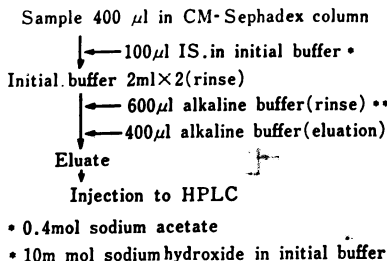


Fig. 2



$\mu\text{g/ml}$ に TOB を血清に添加したものである。血清サンプルより得られた検量線は Fig. 4 に示すように、 $0.5 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性が得られた。本法による前処理操作を含めた変動係数は $2.5 \mu\text{g/ml}$ の血清濃度で 3.5% ($n=6$) であった。

III. 考 案

従来抗生物質の測定は生物学的な方法が用いられてきたが、測定に時間がかかり、また生物特有のバラツキがモニタリングに使用する場合問題となる²⁾。しかし、これに代わる方法が近年分析学の進歩により各種クロマトグラフィーを中心に研究されてきたが、アミノ糖については検出方法に問題があり、わずかな報告があるのみである^{3,4)}。

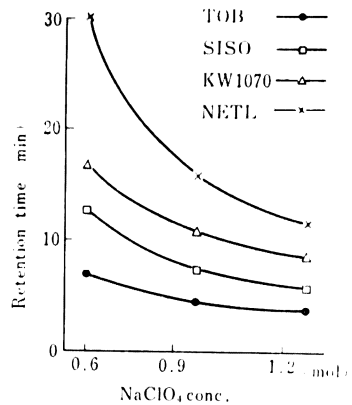
今回われわれはアミノ酸分析に用いる方法をアミノ糖に応用し各種アミノ糖の定量を試みた。

カラムについては Zorbax-C₈ と Nucleosil-5 C₁₈ を比較したところ、後者ではサンプル量を多量に増した時のピークが著しく広がり実用に適さないため、Zorbax-C₈ を選んだ。移動相についてはすべて p-トルエンスルホン酸ナトリウムをイオンペアとして用いたイオンペアクロマトグラフィーで行なった。移動相の pH と溶出時間については、pH 7 の中性域では著しくテーリングを示し、pH 2 付近ではシャープに溶出したため、pH 2.0 としたが、溶出時間がおくれるため過塩素酸ナトリウム濃度を高めることで任意の溶出時間に調節することとした (Fig. 5)。

血清からのアミノ糖の抽出については有機溶媒による方法、イオン交換樹脂による方法および CM-セファデックスを用いるカラム法について検討した結果、CM-セファデックスによる方法が回収率が高く認められた。しかしながら ANHALT の原法³⁾では溶出に硫酸ナトリウムを使用しているが、今回の検討でネチルマイシンについて原法で処理するとピークが2つに分かれる現象が観察され、酢酸ナトリウムに代えたところこの現象が生じないことがわかったため抽出液を変更した。

本法の特徴は使用機器に市販のアミノ酸分析システムをすべて利用して行なうことができ、特殊な装置を必要としないことと、内部標準品に他のアミノ酸を利用してある点あげられる。特に内標を用いることで、前処理

Fig. 5



から注入するまでの操作誤差や、注入誤差も少なくでき、多くのサンプルを同時処理した時の精度を保つことができる。また内標を目的物質と交換することにより、他のアミノ糖の定量も可能であり、現在までにネチルマイシン、ホルチマイシン (KW-1070)、シソマイシンについて検討している。さらに前処理については除タンパクと抽出をカラムにて同時に行なえるため、簡便で、前処理より測定終了までの時間は 30 分以内であり、正確かつ迅速を要求されるモニタリングの方法として充分利用できるものと思われる。

本研究は、厚生団研究費および厚生科学研究補助金の援助を受けた。

文 献

- 1) APPEL, G. B. & H. C. NEU: Gentamicin in 1978. *Ann. Intern. Med.* 89: 528~538, 1978
- 2) 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 片桐 謙: 体内 Tobramycin の微生物学的微量定量法に関する検討. *Chemotherapy* 23: No. 3, 886~893, 1975
- 3) ANHALT, J. P. & S. D. BROWN: High-performance liquid-chromatographic assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *Clin. Chem.* 24: 1940~1949, 1978
- 4) MAITRA, S. K.; T. T. YOSHIKAWA, L. B. GUZE & M. C. SCHOTZ: Determination of aminoglycoside antibiotics in biological fluids: a review. *Clin. Chem.* 25: 1361~1367, 1979

HIGH-PRESSURE LIQUID-CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF AMINOGLYCOSIDE IN SERUM

MAKOTO WATANABE

Department of Pharmacy, Tokyo Kosei Nenkin Hospital

YASUKO KONDOU

Clinical Laboratory, Tokyo Kosei Nenkin Hospital

KEIMEI MASHIMO

Department of Internal Medicine, Tokyo Kosei Nenkin Hospital

TAKESHI KAWAMOTO and KUNIIHIKO SHIMADZU

Analytical Applications Laboratory, Shimadzu Co., Ltd.

This report describes a high-pressure liquid-chromatographic method for monitoring serum levels of aminoglycoside antibiotics. "Amino Acid Analysis System" was used as the apparatus. The procedure involves separation on CM-Sephadex Column, tobramycin as the model drug, and sisomicin chosen from aminoglycosides as the internal standard. The standard curve was linear from 0.5 $\mu\text{g/ml}$ to 20 $\mu\text{g/ml}$ tobramycin concentration. The coefficient of variation was 3.5% at 2.5 $\mu\text{g/ml}$ concentration ($n=6$).

This procedure has following advantages: No special apparatus is required, and easily obtainable aminoglycoside is used as a internal standard. With this method, netilmicin, fortimicin (KW-1070) and sisomicin as well as tobramycin can be determined.