

TA-058 の体液内濃度測定法 II. 高速液体クロマトグラフ法

柳田 正・小島 幸雄・山崎 一矢
大良 勇・石川 勉
田辺製薬株式会社分析化学研究所

TA-058 の高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法) による体液内濃度測定法ならびに胆汁中での安定性について検討した。

血清、尿および胆汁試料中 TA-058 濃度測定のために設定した各 HPLC 法において TA-058 と生体ブランクは充分に分離し、それぞれ良好な検量線が得られた。これらの体液を用い TA-058 の添加回収実験を行った結果 96~103% の回収率が得られた。

TA-058 投与後のヒト血清、尿および胆汁試料について HPLC 法およびバイオアッセイ法で測定した結果、両測定法間に高い相関関係が認められた。

TA-058 はヒト胆汁中において -20°C 凍結保存では少なくとも 7 日間は安定であった。

結 言

TA-058 は側鎖にアミノ酸残基を導入した新規半合成ペニシリン (PC) 剤であり、グラム陰性菌およびグラム陽性菌に広範囲に有効な抗生物質である。

TA-058 の吸収、排泄および体内分布を測定するにあたり、体液内濃度測定法ならびに体液中での安定性について検討したので前報¹⁾のバイオアッセイ法に引続き HPLC 法について報告する。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

TA-058 は当社にて合成された分析用標準品を用いた。TA-058 分析用標準品の 1.1099 mg は 1 mg (力価) に対応する。

2. 試薬および試料

1) 試 薬

水は蒸留水、メタノールは高速液体クロマトグラフ用を用い、その他の試薬は JIS 試薬特級を用いた。

2) 試料および前処理

血清はヒト標準血清 (ORTHO DIAGNOSTICS) を用い、尿は健康成人男子より採取した。胆汁は京都大学外科学教室第二講座より供与されたものを用いた。

各試料はいずれも 0.7 μm テフロンフィルター (梅谷精機) によりろ過を行い試料溶液とし測定に供した。なお胆汁試料の一部についてはウルトラフリー (ミリポア社) により限外ろ過を行い試料溶液とした。

3. 測定方法

血清、尿および胆汁中 TA-058 濃度の HPLC 法による測定条件を Table 1 に、またその流路図を Fig. 1 に示した。血清および尿は UV 検出法により測定した。胆汁はカラム流出液に M/5 リン酸緩衝液 (pH 11.4) を流速 0.3 ml/min. で送液し、次いでフルオレスカミン・アセトン溶液 (0.02→100) を流速 0.4 ml/min. で送液した後、励起波長 380 nm、蛍光波長 480 nm にて蛍光強度を測定した。TA-058 はピーク高さを測定し絶対検量線法により濃度を算出した。TA-058 濃度はすべて μg または mg (力価)/ml で示した。

実験結果

1. クロマトグラフィー

血清試料は移動相にリン酸緩衝液・メタノール混液を用いる逆相クロマトグラフィーにより、尿試料は尿中成分と TA-058 の分離が不十分であるため移動相のリン酸緩衝液・メタノール混液に 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを添加するイオン対逆相クロマトグラフィーにより分離を行った。胆汁試料についても逆相クロマトグラフィーを採用し、移動相を種々検討したが良好な結果が得られなかったため胆汁ブランクの影響を除きさらに検出感度を向上させるため UV 検出法の代りに蛍光検出法を採用した。蛍光検出法は Lee²⁾ により報告されているフルオレスカミンを用いるポストカラム蛍光検出法によった。

2. 検量線の作成

TA-058 の血清、尿および胆汁中濃度測定のために Table 1 に示したそれぞれの HPLC 法における検量線

Table 1 HPLC condition

	Serum	Urine	Bile
Column	TSK-GEL, LS-410 (5 μ m, Toyo Soda), 4 mm i.d. \times 150mm		
Column temp.	40°C		
Mobile phase	Buffer ¹⁾ + MeOH (94.5 : 5.5)	Buffer ²⁾ + MeOH (80 : 20)	Buffer ³⁾
Flow rate	1 ml/min.		
Detector	UV (280 nm) 0.01 AUFS	UV (280 nm) 0.08 AUFS	Spectrofluorometer Excitation : 380 nm Emission : 480 nm

1) M/20 phosphate buffer (pH 7.0)

2) M/20 phosphate buffer (pH 3.0)•M/100 sodium 1-heptane sulfonate

3) M/10 phosphate buffer (pH 5.0)

Table 2 TA-058 concentration for standard curves

	Serum	Urine	Bile
TA-058 Concentration (μ g/ml)	5~50	80~1,150	10~50

Table 3 Recovery of TA-058 in serum

TA-058 conc. (μ g/ml)		Recovery (%)
added	found	
0.98	1.00	102.0
	0.95	96.9
9.78	9.69	99.1
	9.98	102.0
48.94	49.92	102.0
	48.95	100.0

Fig. 1 HPLC flow diagram

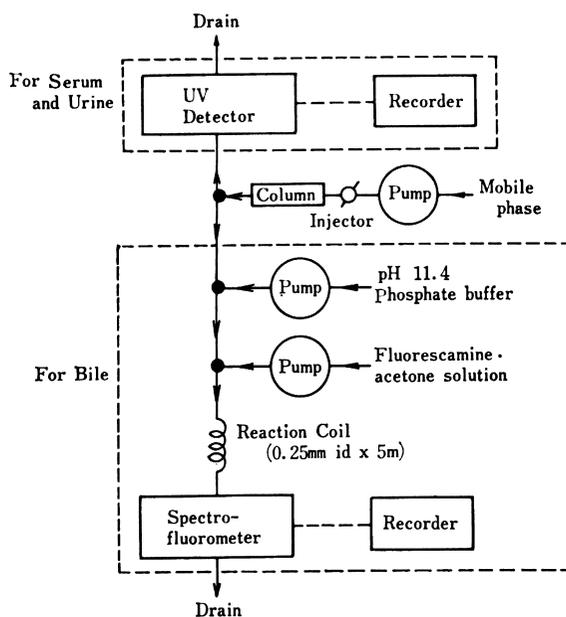


Fig. 2 Standard curves for TA-058 in serum, urine and bile

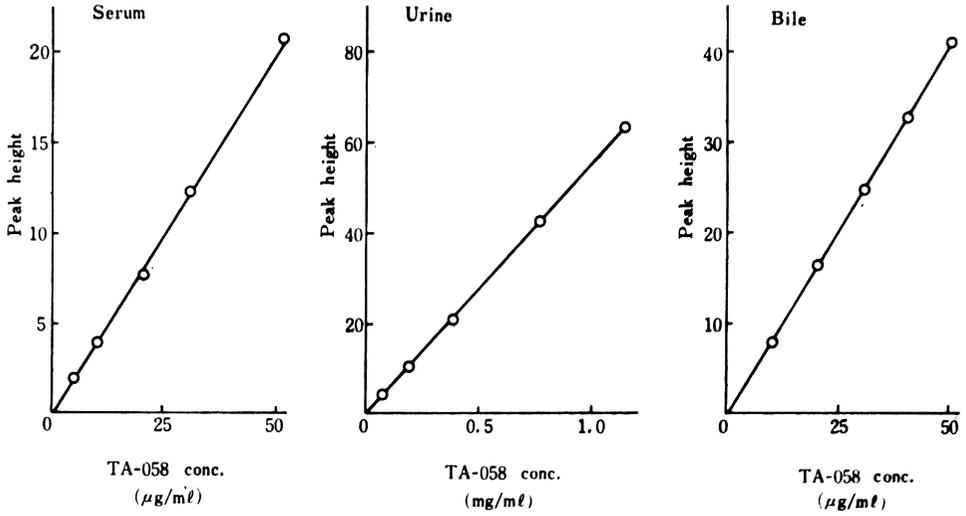


Fig. 3 Chromatograms of (A) control human serum and (B) serum containing 50 µg/ml of TA-058

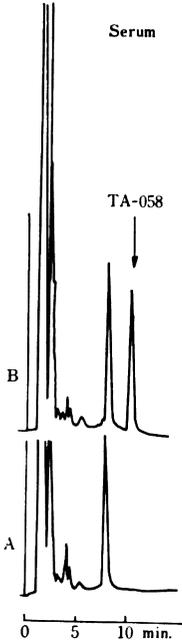
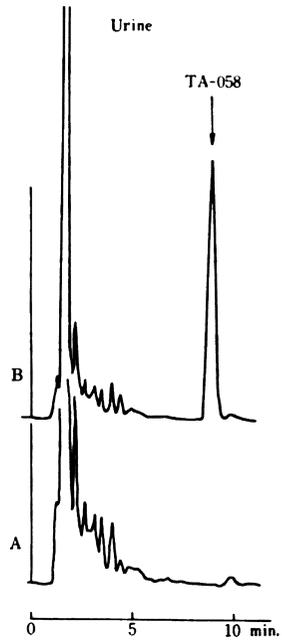


Fig. 4 Chromatograms of (A) control human urine and (B) urine containing 0.9 mg/ml of TA-058



を作成した。

TA-058 分析用標準品を水で溶かし、Table 2 に示す濃度範囲の溶液を調製し、それぞれの溶液 10 μ l ずつを用いて HPLC を行い、得られた TA-058 のピーク高さとその濃度の関係を Fig. 2 に示したが、いずれもきわめて良好な直線性が認められた。

3. 血清中濃度の測定

ヒト標準血清 1 ml に TA-058 溶液 (50~2,500 μ g/ml) 20 μ l を加え、0.98~49 μ g/ml の溶液を調製した (98%血清溶液)。この液 10 または 20 μ l を用いて HPLC を行った結果は Table 3 に示したが TA-058 の回収率は 97~102% であった。なお本測定法による測定限界は、試料溶液 20 μ l 注入の場合 1 μ g/ml であった。クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

4. 尿中濃度の測定

健康成人男子尿 1 ml に TA-058 溶液 (0.5~10 mg/ml) 0.1 ml を加え、45~914 μ g/ml の溶液を調製した (91%尿溶液)。この液 10 μ l を用いて HPLC を行った結果は Table 4 に示したが、TA-058 の回収率は 99~103% であった。クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

5. 胆汁中濃度の測定

ヒト胆汁 (pH 8.8) 1 ml に TA-058 溶液 (50 または 250 μ g/ml) 0.1 ml を加え、4.6 または 22.8 μ g/ml の溶液を調製した (91%胆汁溶液)。この液 10 μ l を用いて HPLC を行った結果は Table 5 に示したが、TA-

058 の回収率は 96~103% であった。なお本測定法による測定限界は、試料溶液 25 μ l 注入の場合 0.1 μ g/ml であった。クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

石山ら⁹⁾は PIPC 投与後の胆汁中に β -ラクタム開環体の生成を認めている。TA-058 を投与した場合も Fig. 6 に示した penicilloic acid, 5-epi-penicilloic acid など

Fig. 5 Chromatograms of (A) control human bile and (B) bile containing 23 μ g/ml of TA-058

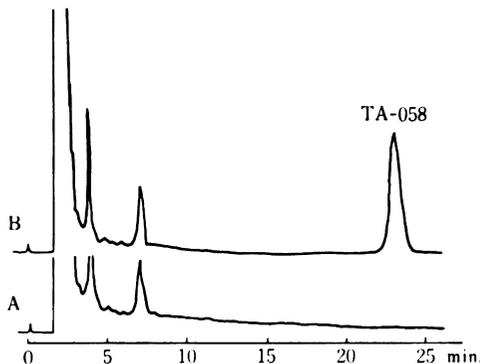


Fig. 6 TA-058 related compounds

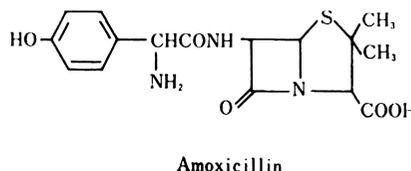
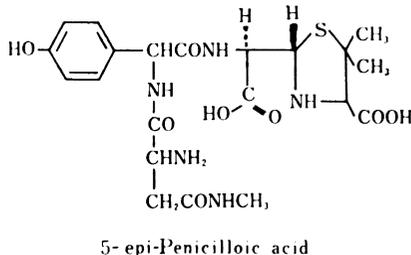
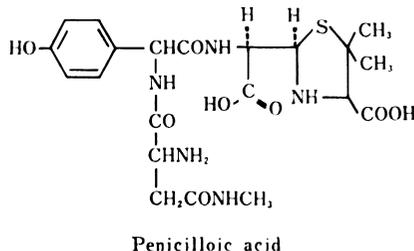


Table 4 Recovery of TA-058 in urine

TA-058 conc. (μ g/ml)		Recovery (%)
added	found	
45.7	46.9	102.6
91.5	93.8	102.5
457.1	454.5	99.4
914.1	909.1	99.5

Table 5 Recovery of TA-058 in bile

TA-058 conc. (μ g/ml)		Recovery (%)
added	found	
4.56	4.43	97.1
	4.56	100.0
	4.48	98.2
22.80	21.82	95.7
	23.10	101.3
	23.40	102.6

β -ラクタム開環体の生成が認められた (Fig. 7)。

8. 胆汁中 TA-058 の安定性

前報で TA-058 のヒト血清および尿中での安定性について、血清では -20°C 、7日間、尿においても -20°C 、7日間安定であることを報告しているが、胆汁中での安定性について検討を行った。

ヒト胆汁 (pH 8.8) に 1N-塩酸溶液を加え pH 6.0, 7.5 および 8.5 とし、その 1 ml ずつに TA-058 溶液 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.1 ml を加え 18.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を調製し (91% 胆汁溶液)、それぞれの溶液を小分けして -20°C で一定期間保存した後 HPLC 法により TA-058 の残存率を測定した。その結果は Fig. 8 に示したとおり、7日間の保存においても TA-058 の分解はほとんど

Fig. 7 Chromatograms of HPLC analysis of bile
(A) : Control bile
(B) : Bile after intravenous administration of TA-058

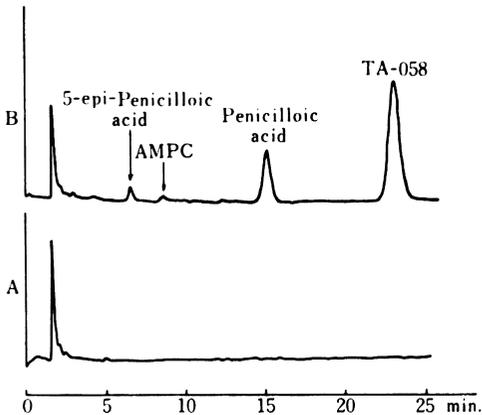
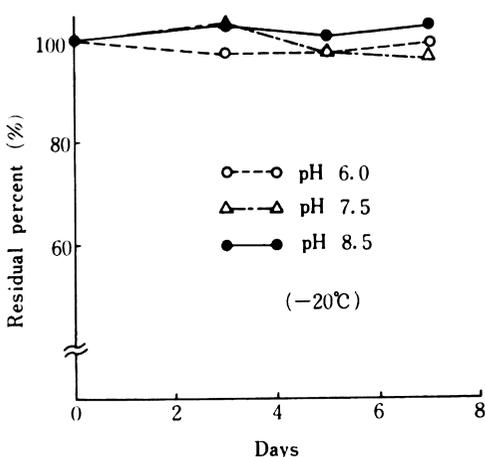


Fig. 8 Stability of TA-058 in human bile



認められなかった。

7. HPLC 法とバイオアッセイ法の比較

TA-058 を健康成人男子に投与し、投与後に採取した血清および尿を用い、また、TA-058 第二相試験⁴⁾において採取された胆汁を用い、これら試料中の TA-058 濃度を本報告で検討した HPLC 法によって測定し前報のバイオアッセイ法との相関について検討した。これらの結果は Fig. 9, 10 および 11 に示したが、血清中濃度 $r=0.987$ 、尿中濃度 $r=0.999$ および胆汁中濃度 $r=0.995$ の相関係数が得られ、いずれも両方法の間に高い

Fig. 9 Correlation between the serum levels obtained from HPLC method and microbiological method

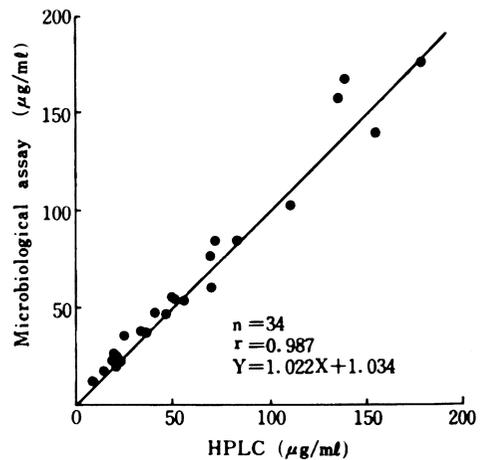


Fig. 10 Correlation between the urinary levels obtained from HPLC method and microbiological method

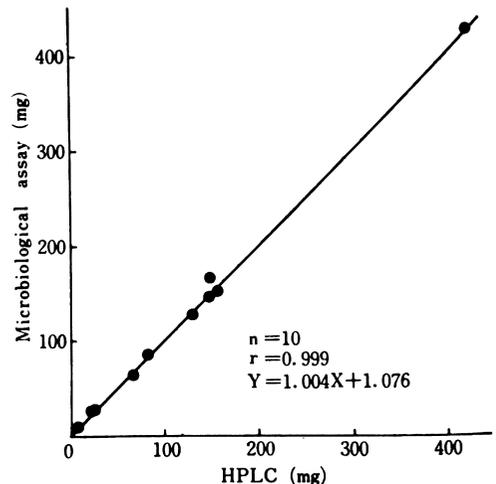
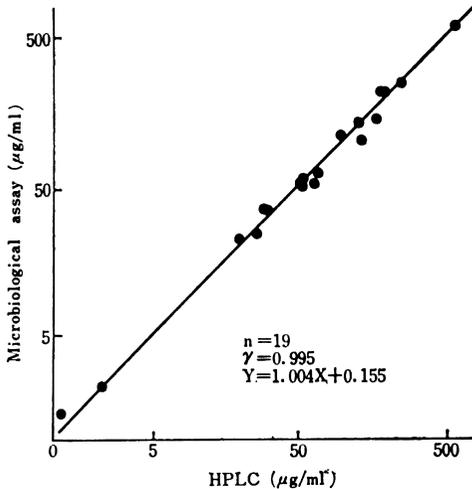


Fig. 11 Correlation between the bile levels obtained from HPLC method and microbiological method



相関関係が認められた。

考 察

HPLC 法による TA-058 の体液内濃度測定法について検討した。

試料の前処理法として、特に血清の場合、通例、トリクロル酢酸やアルコール、アセトニトリルなどにより除蛋白が行われている。しかし、除蛋白剤を加えないで、前処理としてろ過だけを行いカラムに直接注入したが、クロマトグラムが乱されることはなかった。尿および胆汁の場合も同様に試料溶液を調製し測定した。TA-058 の濃度算出はクロマトグラムのピーク高さを測定し絶対検量線法によったが、検量線、添加回収率において良好な結果が得られた。

胆汁中濃度測定は TA-058 をフルオレスカミン誘導体とする蛍光定量法を採用した。この方法は UV 検出法より特異性が高く、多成分中より一級アミンを有する TA-058 およびその関連物質を検出するのに適している。TA-058 投与後採取された胆汁中より TA-058 の

ほか、その関連物質として penicilloic acid とその 5 位が epimerization を起こした 5-epi-penicilloic acid および微量の AMPC が検出され、TA-058 も他の PC 剤と同様に β -ラクタム開環体の生成が認められた。

胆汁中における安定性は pH を 6.0, 7.5 および 8.5 に調整した胆汁について検討した結果、 -20°C 、7 日間の保存においてほとんど分解は認められず前報の血清および尿の結果と一致した。これらのことから TA-058 の血清、尿および胆汁など体液内濃度は -20°C の保存で少なくとも 7 日間は低下が認められず測定可能であると考えられる。

血清、尿および胆汁中濃度を HPLC 法とバイオアッセイ法により測定した結果、相関係数はいずれも $r=0.987$ 以上を示し、両測定法の間には良好な相関関係があることが確認された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、適切な御指導と御助言をいただいた当研究所増川健二所長に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 谷 佳都, 他: TA-058 の体液内濃度測定法 I. 微生物学的定量法. *Chemotherapy* 32(S-2): 99~111, 1984
- 2) TEH LO LEE, LUCIUS D'ARCONTE & MARVIN A. BROOKS: High-pressure liquid chromatographic determination of amoxicillin in urine. *J. Pharm. Sci.*, 68(4): 454~458, 1979
- 3) 石山俊次, 坂部 孝, 中山一誠, 岩本英男, 岩井重富, 鷹取陸美, 川辺隆道, 大橋 満, 村田郁夫, 杉本博昭, 水足裕子: 外科における T-1220 の基礎的・臨床的研究. *Chemotherapy* 25(5): 1247~1254, 1977
- 4) 谷村 弘, 斉藤 徹, 小林展章, 他: 胆道感染症の化学療法(XIX)——TA-058 の胆汁中移行とその臨床効果について. *Chemotherapy* 32(S-2): 502~513, 1984

ASSAY METHODS OF TA-058 CONCENTRATIONS
IN BODY FLUIDS
II. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC
ASSAY METHOD

TADASU YANAGIDA, YUKIO KOJIMA, KAZUYA YAMASAKI,
ISAMU DAIRA and TSUTOMU ISHIKAWA
Analytical Chemistry Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

The High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC) assay method for the quantitative determination of TA-058 in body fluids and the stability in human bile were described.

The chromatographic separation of TA-058 and body fluids blank was good. The recovery rates of added TA-058 from those body fluids were 96~103%.

The concentration of TA-058 in human serum, urine and bile detected by HPLC methods were in good agreement with those obtained by the Microbiological method.

TA-058 was stable in human bile during 7 days when it was kept in frozen state at -20°C .