

微生物学的定量法ならびにGC
またはGC-MS法による Sulbactam 及
び Sulbactam/Cefoperazone の定量法

加納 弘, 関口 金雄, 立松 洋
下岡 新雄, 沖 俊一

台糖ファイザー株式会社 新薬開発センター 生化学研究所

Sulbactam/Cefoperazone (配合比1:1) の生体内動態を明らかにするために, bioassay 法, GC 法及び GC-MS 法により, Cefoperazone (CPZ) 並びに Sulbactam (SBT) の分別定量法を検討した。CPZ は *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌として用いる bioassay 法により, 共存する SBT の影響を受けることなく, 0.4 µg/ml の濃度まで測定可能であった。また, SBT はそれ自身の抗菌力が弱い培地中に CPZ を 150 µg/ml 添加し, CPZ 耐性で β-lactamase 産生能を有する *E. coli* 603 を検定菌とする bioassay 法により, 1.6 µg/ml までの定量が可能であった。

さらに, SBT の定量法として, bioassay 法と良好な相関性を示す GC または GC-MS 法による定量条件を確立し, この方法によって血中濃度で夫々 0.5 または 0.05 µg/ml の測定が可能であった。

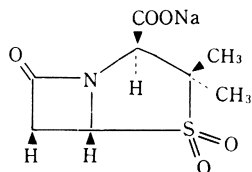
SBT または CPZ はヒト血清及び尿中において, -25℃で凍結保存するとき, 少なくとも21日間は安定であった。

Sulbactam/Cefoperazone は米国 Pfizer 社で開発された β-lactamase に対して阻害作用を示す Sulbactam (以下 SBT と略す) と Cefoperazone (以下 CPZ と略す) とを力価比で1:1の割合で含有している。

SBT は単独では弱い抗菌力を示すにすぎないが, β-lactam 系抗生物質と配合することにより, その抗生物質の β-lactamase による失活を防ぎ, 耐性菌に対して抗菌力を増強することが報告されている¹⁻²⁾。

今回, 著者らは SBT または SBT/CPZ の生体内動態を明らかにするため, 両薬物共存下で SBT または CPZ の体液及び組織内濃度を測定する方法, 並びに血清及び尿中での安定性について検討したので, その結果を報告する。

Fig. 1 Chemical structure of Sulbactam



Sodium (2S, 5R)-3, 3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylate 4, 4-dioxide

C₈H₁₀O₅SNa

M. W. 255.22

I. 実験材料および方法

1. 使用薬物及び標準物質

Sodium sulbactam (SBT, 886mg 力価/g, Fig. 1) は米国 Pfizer 社から入手したものをを用い, gas chromatography (GC) 及び gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) 法の標準品としては SBT free acid (m.p. 145~150℃ 分解) を調製した。Sodium cefoperazone (CPZ, 930mg 力価/g) は当社で合成したものをを用いた。

クロマトグラフィー用内部標準物質としては GC 用に diclofenac sodium: sodium N-(2, 6-dichlorophenyl)-O-aminophenyl acetate (ボルタレン 25mg 錠: 日本チバガイギー・藤沢薬品より回収精製した。m.p. 235℃ 分解) を, GC-MS 用に米国 Pfizer 社から入手した 6-bromopenicillanic acid を使用した。

2. Bioassay 法

1) 検定菌

米国 Pfizer 社中央研究所より分与された, *Escherichia coli* 603 及び *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用いた。

2) 検定用培地

Difco 社製 brain heart infusion agar (BHIA), heart infusion agar (HIA), antibiotic medium

No. 1 (AM-1), antibiotic medium No. 11 (AM-11), 並びに栄研製 nutrient agar (NA) を用いた。

3) 検定菌液の調製法及び検定用培地への接種

E. coli 603 または *M. luteus* ATCC 9341 は NA 平板から採取した 1 コロニーを brain heart infusion broth (BHIB) に接種し、それぞれ 30℃ で一晩または 28℃ で 48 時間培養し、同 broth で希釈し、分光光度計を用いて濁度 (*E. coli* 603: 波長 660 nm の透過率 60%, *M. luteus* ATCC 9341: 波長 650 nm の透過率 25%) を調整したものを菌液とし、検定用培地に 1% となるように接種した。

4) 濃度測定法

SBT の測定は *E. coli* 603 を接種し、且つ CPZ を最終濃度として 150 µg/ml 含有する BHIA 培地 15 ml を直径 9 cm のプラスチックシャーレに分注し固化させた平板を用い、薄層ディスク法によった。また CPZ の測定には *M. luteus* ATCC 9341 を接種した 7 ml の AM-1 培地を用いた。それぞれ 28℃ で 20~24 時間培養した。

5) 標準溶液及び希釈液

SBT 及び CPZ 標準溶液は 0.1 M リン酸塩緩衝液 pH 7.0 (0.1 MPB (pH 7.0) と略す) またはコントロールヒト血清 (日本生物材料センター) を用い調製した。尿試料は 0.1 MPB (pH 7.0) を用いて、血清試料はコントロールヒト血清を用いて希釈した。組織試料はその全量に 3 倍容の 0.1 MPB (pH 7.0) を加えハサミを用いて細切したのち、氷冷下でホモナイズし、遠心分離後その上清を測定に供した。

3. GC 及び GC-MS 法を用いた SBT の定量法

SBT の GC 又は GC-MS 法の詳細を Fig. 2 及び 3 に示した。

即ち、体液試料 0.1 MPB (pH 7.0) 混液または組織の 3 倍容 0.1 MPB (pH 7.0) ホモジネートの上清を用い、これら試料が高濃度の場合は 0.1 MPB (pH 7.0) を用いて適宜希釈したものを酢酸エチルまたはエーテルで洗浄したのち、水層を酸性下でエーテルまたは酢酸エチルにより抽出した。ジアゾメタン飽和エーテル溶液を用いてエステル化反応を行った後、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をベンゼンに溶解し、GC または GC-MS 法にて SBT を分析し、別に作成した検量線から SBT 濃度を算出した。

II. 結 果

1. Bioassay 法に関する検討

1) 併用薬の影響

E. coli 603 を用いたディスク法による SBT の濃度測定において、検体中に共存する CPZ の SBT 標準曲線に与える影響を検討した。その結果、SBT が直線性を示す濃度範囲 (1.6-25.6 µg/ml) において CPZ が SBT 濃度の 10 倍量存在しても SBT の標準曲線に全く影響を与えなかった (Fig. 4)。一方、*M. luteus* ATCC 9341 を用いた CPZ の濃度測定においても、Fig. 4 に示すように SBT が CPZ の 10 倍量存在しても CPZ の標準曲線 (0.4-6.4 µg/ml) に影響を及ぼさなかった。

2) SBT 検定用培地の選択

E. coli 603 を検定菌としたディスク法により 0.1 M PB (pH 7.0) 希釈液を用いて、各種検定培地の標準曲線を比較し Fig. 5 に示した。

AM-1 及び AM-11 培地では菌の生育が悪く阻止円が不鮮明であった。NA, HIA, BHIA 培地の順に測定感度の上昇がみられ、BHIA 培地が測定感度及び直線性共に最も優れていた。

3) SBT, CPZ 測定における培養温度の影響

E. coli 603 または *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌としたディスク法により、28℃ または 37℃ 培養での SBT または CPZ の標準曲線を作成した (Fig. 6)。

28℃ 培養が 37℃ に比べ SBT, CPZ 両剤に対して測定感度が優れていた。

4) SBT 測定における接種菌量の影響

E. coli 603 を検定菌とし、接種菌量を 0.5, 1 及び 2% として作成した SBT の標準曲線を Fig. 7 に示した。

阻止円は 2, 1, 0.5% の順に大きくなったが、0.5% 接種ではコロニーが疎となり阻止円がやや不鮮明であったため、接種菌量は 1% が最適であった。

5) SBT 検定用培地への CPZ 添加濃度の影響

E. coli 603 を検定菌とし、BHIA 培地へ CPZ を 50, 100, 150 及び 200 µg/ml になる様に添加し、作成した SBT の標準曲線を Fig. 8 に示した。

阻止円は、50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml の順に大きくなった。200 µg/ml 添加では CPZ による *E. coli* 603 の発育抑制のために阻止円の境界が不鮮明であったので、CPZ 添加濃度は 150 µg/ml が最適であった。

6) SBT 検定における希釈液 pH の影響

0.1 MPB pH 6.0, 7.0, 8.0 を希釈液とし作成した標準曲線を Fig. 9 に示した。

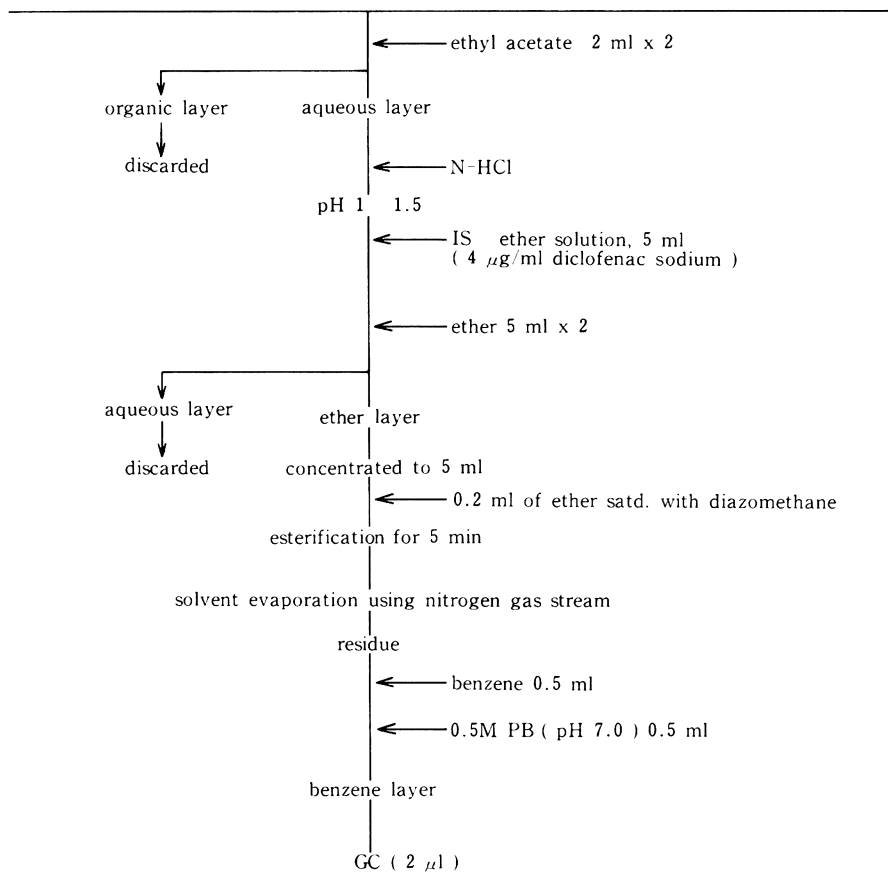
いずれの pH でも直線性は認められたが、pH 6.0 に比べて pH 7.0 及び pH 8.0 の方が低濃度域での阻止円が大きく測定感度が優れていた。

Fig. 2 Gas chromatographic determination of SBT

Extraction method :**Sample solution**

1 ml of body fluid — 0.1 M PB (pH 7.0) mixture (1 : 1) ;

1 ml of supernatant of tissue homogenate (tissue 0.1 M PB (pH 7.0), 1 : 3)

**Apparatus** Shimadzu GC-6A equipped with alkali-flame ionization detector (RbBr)**GC conditions**

Column 1% Neopentyl glycol succinate on Gas Chrom Q (60-80 mesh) ; glass column (3 mm i.d., 2 m length)

Carrier gas Pure nitrogen gas 40 ml/min

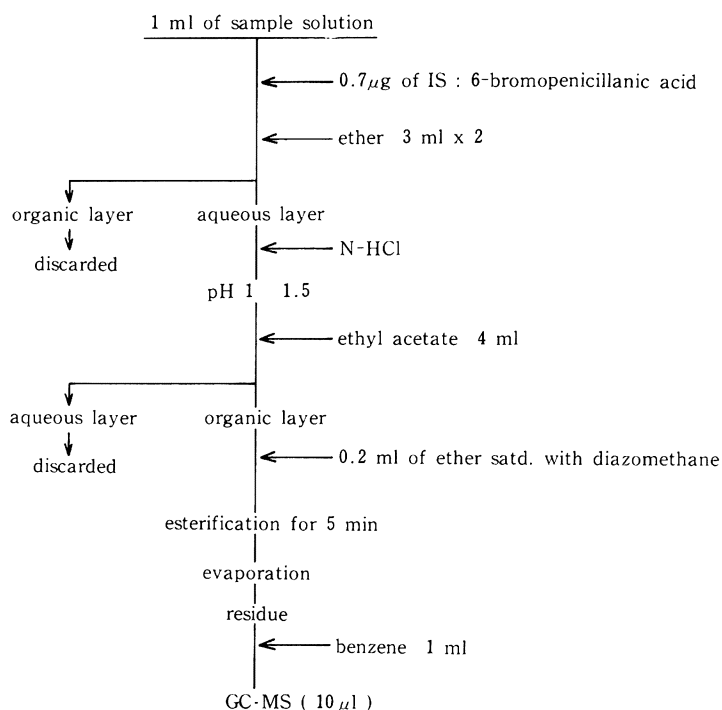
Detector gas : Hydrogen 30 ml/min, air 300 ml/min

Temperature Column oven 220°, detector and injection port 235°

Retention time : SBT 5.0 min, IS (diclofenac sodium) 6.4 min

Fig. 3 Gas chromatography-mass spectrometric determination of SBT

Extraction method :



Apparatus	: Hitachi M-80 GC-MS with M-003 Data System
GC-MS conditions	
GC; Column	: 3% Silicon OV-17 on Gas Chrom Q (80 - 100 mesh) glass column (3 mm i.d. , 1 m length)
Carrier gas	: Helium gas 30 ml/min
Temperature	: Column oven 200°, injection port 230°, separator oven 220°
CI-MS; Ion source temp.	: 140°
Ionizing voltage	: 70 eV
Accelerated voltage	: 3 kV
Electron multiplier	: 1.8 - 2 kV
Filament emission current	: 100 μA
Scan speed	: 8 sec
Reagent gas	: Isobutane
Ionizing chamber pressure	: 2×10^{-16} mmHg
Ion monitored	: SBT m/e 248, IS m/e 174
Retention time	: SBT, 2.7 min, IS (6-bromopenicillanic acid) 1.9 min

Fig. 4 Influence of co-existing compound, SBT or CPZ, on standard curve of each compound

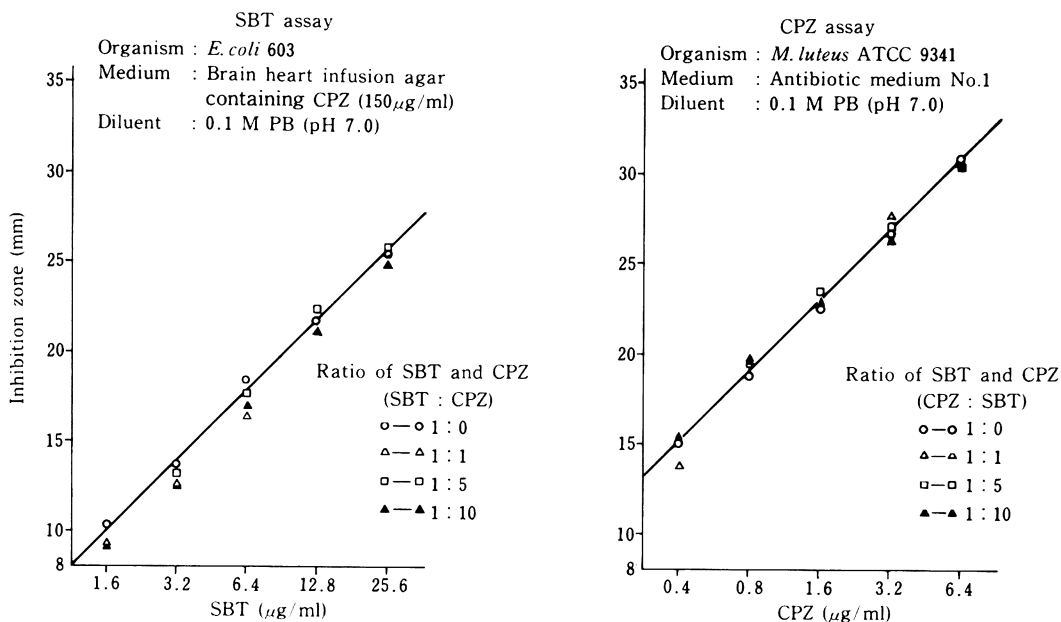
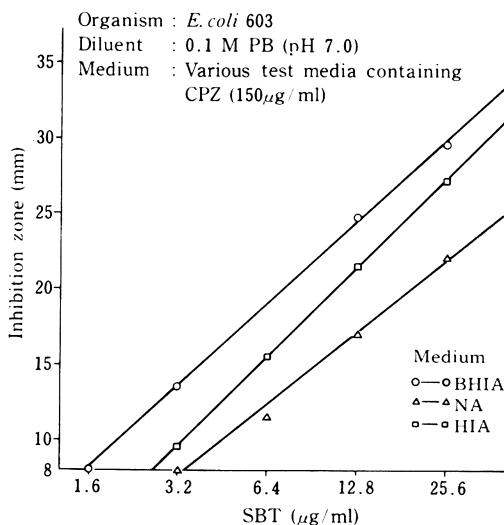


Fig. 5 Comparison of standard curves of SBT on various test media



しかし、SBT はアルカリ側で不安定であることから希釈液としては pH 7.0 が適当である。

7) SBT 及び CPZ 測定における血清の影響

E. coli 603 または *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とし、ヒト血清及び 0.1MPB (pH 7.0) で希釈した標準液を用いて作成した SBT または CPZ 標準曲線を Fig. 10 に示した。

SBT, CPZ 共にヒト血清を希釈液とした場合、0.1 M PB (pH 7.0) を希釈液とした場合よりも阻止円が小さく、その傾向は CPZ の方が大きかった。

2. GC 及び GC-MS を用いた SBT 測定法の検討

既知量の SBT 標準品を一定量の内部標準物質と共にエステル化し、作成した標準曲線並びに血清、尿及びラットの肝臓に既知量の SBT を添加した時の検量線を Fig. 11 及び Fig. 12 に示した。

標準曲線及び検量線はいずれも原点を通る良好な直線性を示した。GC 法における体液 (または組織) 中の SBT の検出感度は 0.5 μg/ml (または g) であった。また GC-MS 法における血清中 SBT の検出感度は 0.05 μg/ml であった。

3. Bioassay 法と GC 法の相関

マウス (雄, 体重 19-20g) に SBT/CPZ (1 : 1) 1000mg/kg を皮下投与した後 0.25 ~ 2 時間の血清、

Fig. 6 Effect of incubation temperature on standard curves of SBT and CPZ

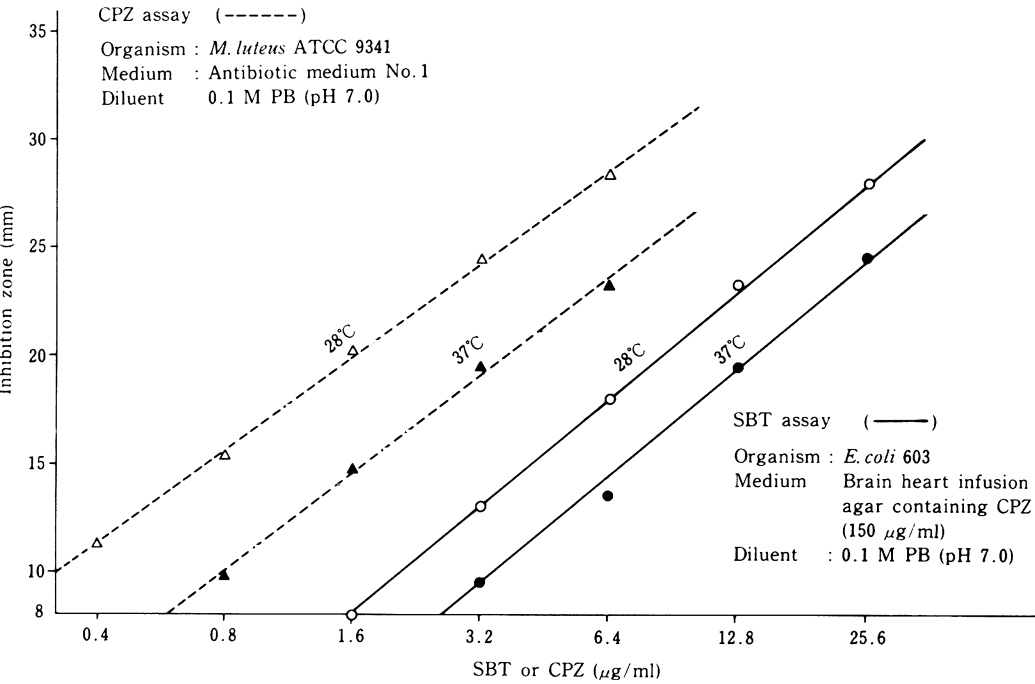


Fig. 7 Comparison of standard curves of SBT on various inoculum sizes using *E. coli* 603

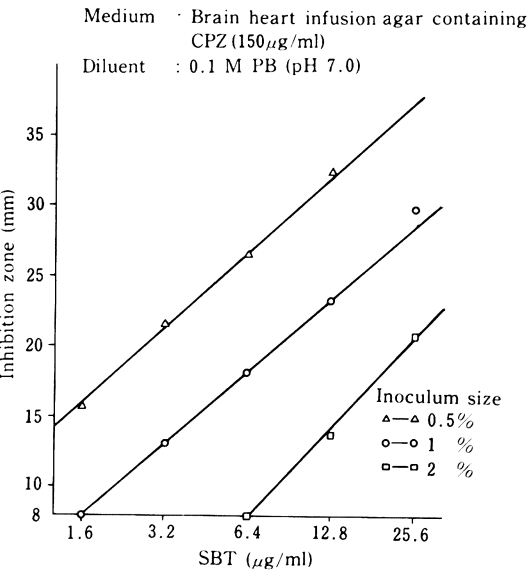


Fig. 8 Effect of CPZ concentration in test medium on standard curves of SBT

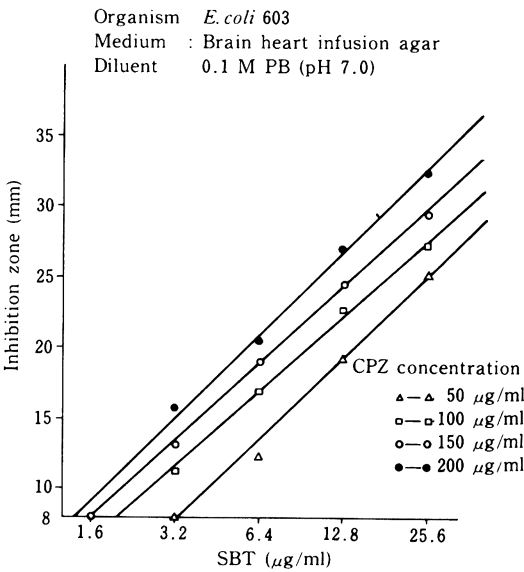


Fig. 9 Effect of diluent pH on SBT standard curves

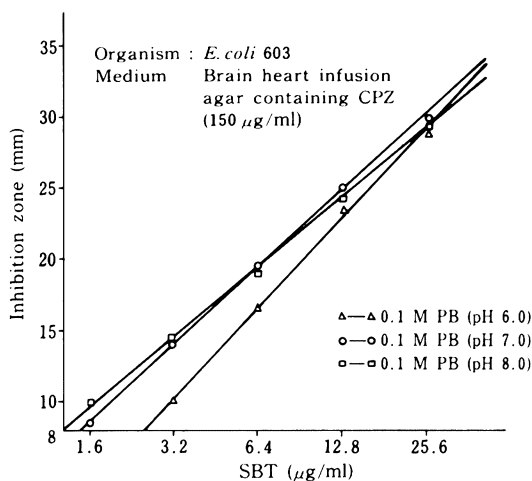
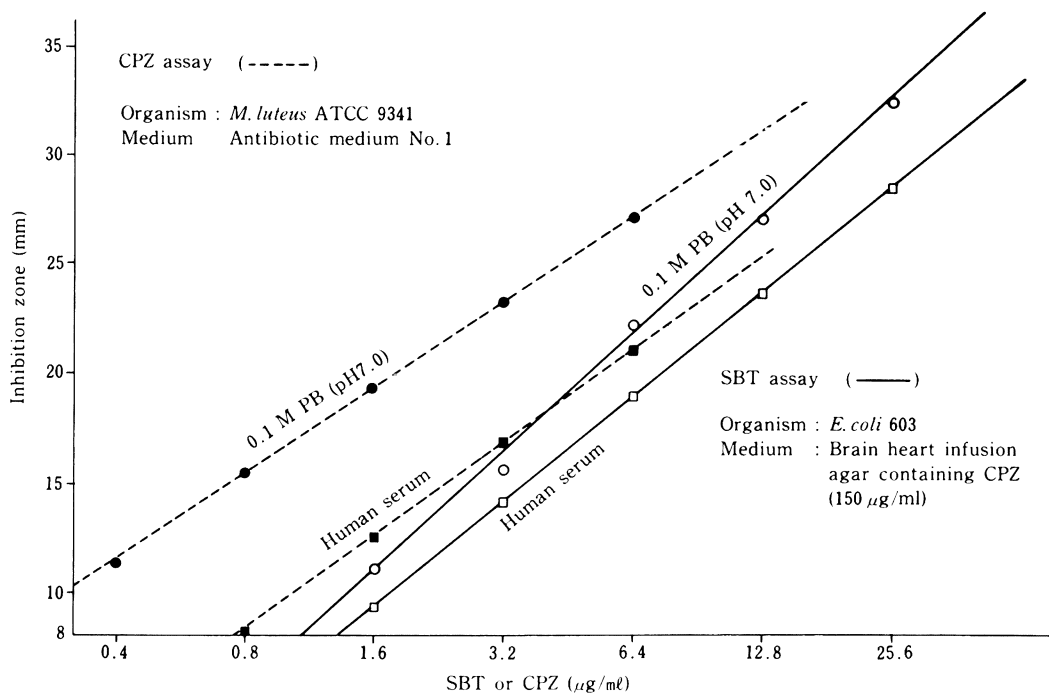


Fig. 10 Comparison of standard curves using 0.1M phosphate buffer solution (pH 7.0) and human serum as diluent



肝臓、腎臓及び肺臓試料並びに SBT/CPZ (1:1) の 1g 又は 2g を静脈内投与した患者から得た血清、喀痰、尿、虫垂、胆のう、腸壁、子宮、膣部、卵巣、卵管、睪丸等の組織試料、計59検体について bioassay 法及び GC 法により SBT 濃度を測定し、両法の相関図を Fig. 13 に示した。SBT の bioassay 法と GC 法による定量値は図中に記述した一次式に示されるように良好な相関性を示した。

4. 血清及び尿中での SBT/CPZ 安定性

ヒト血清または尿を用い SBT/CPZ 濃度としてそれぞれ30又は 1000 μg/ml の溶液を調整し、-20、5 及び 25℃での安定性について検討した。

Bioassay による測定結果は Fig. 14 に示した如く、SBT、CPZ 共に尿中では25℃ 1日で約10%、2日間の保存で約20%の力価低下が認められたが、5℃及び-20℃21日間の保存では安定であった。また血清中では両薬物共に-20℃で21日間安定であったが、5℃では14日間で約20%、25℃では2日間で約20%の力価低下が認められた。

III. 考 察

SBT/CPZ の生体内動態を明らかにするために必要な SBT 及び CPZ の分別定量法として bioassay 法、

Fig. 11 Standard and calibration curves for GC determination of SBT

- : Standard curve obtained from esterification of SBT-free acid
- : Calibration curve obtained from esterification of SBT extracted from body fluid and tissue

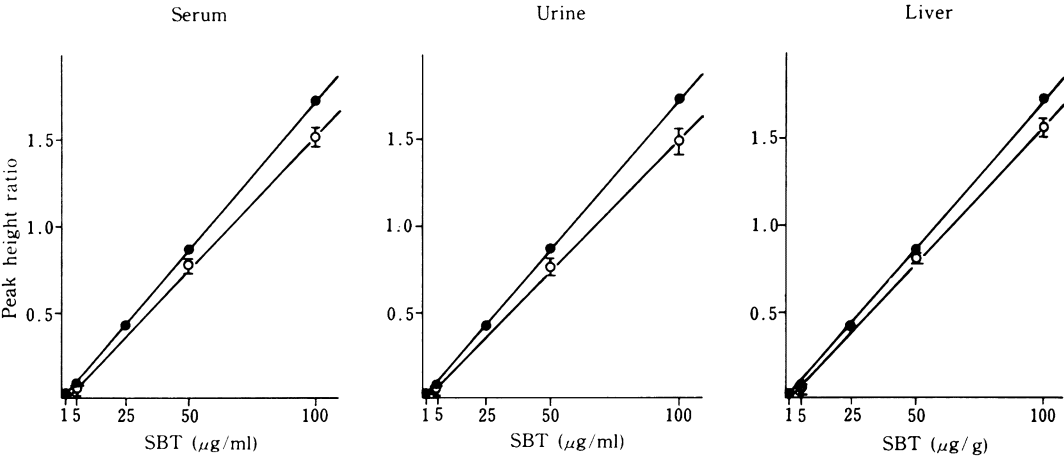


Fig. 12 Standard and calibration curves for GC-MS determination of SBT

- : Standard curve obtained from esterification of SBT free acid
- : Calibration curve obtained from esterification of SBT extracted from body-fluid and tissue

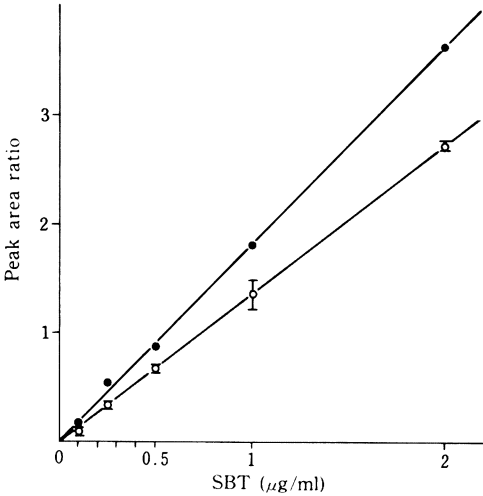


Fig. 13 Correlation between GC assay and bioassay of SBT concentrations in clinical samples

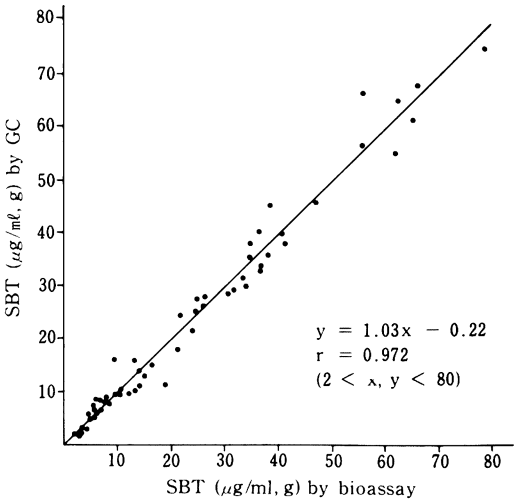
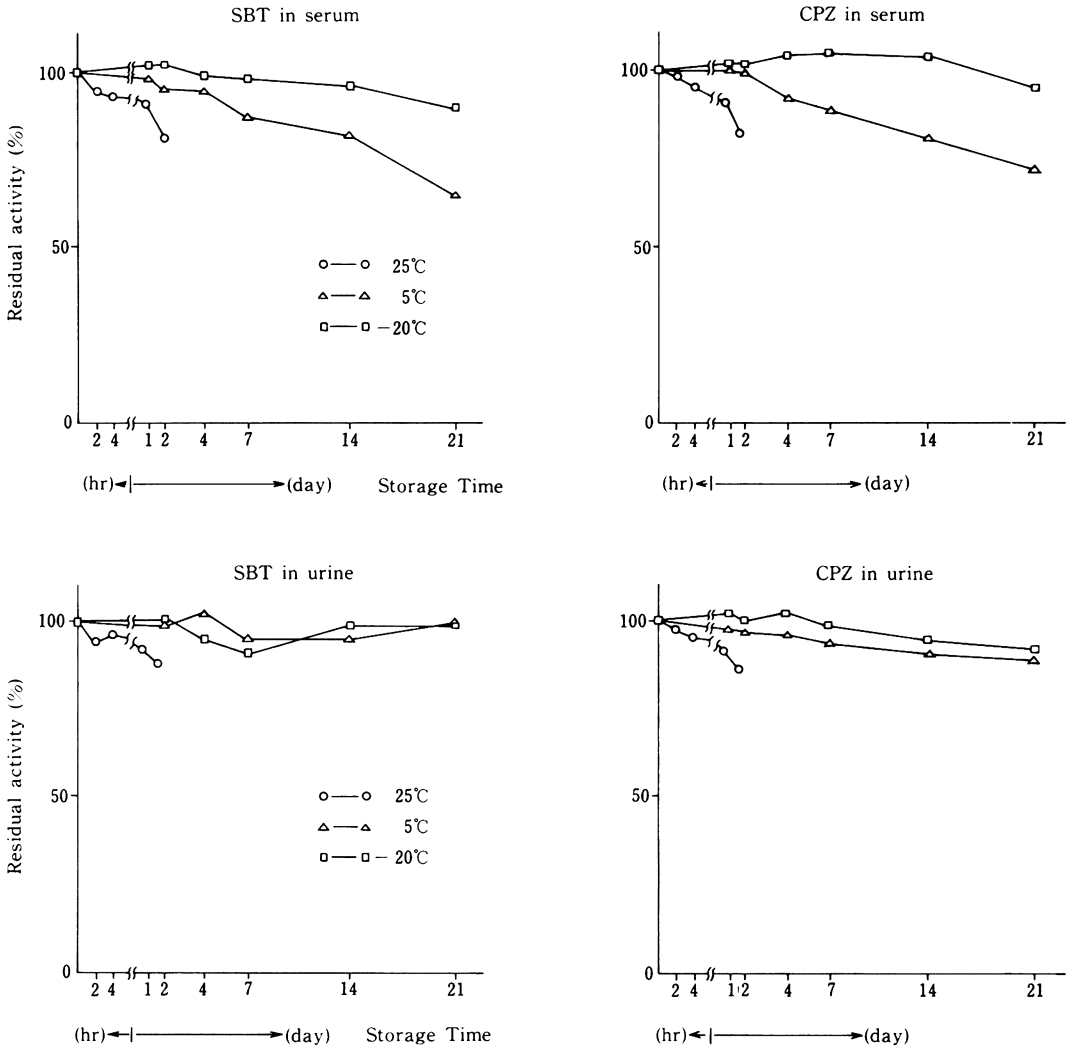


Fig. 14 Stability of SBT and CPZ in human serum and urine

Initial concentration : SBT 30 $\mu\text{g/ml}$ + CPZ 30 $\mu\text{g/ml}$ in serum
SBT 1mg/ml + CPZ 1mg/ml in urine



GC 法及び GC-MS 法を検討し、定量条件を設定した。

SBT の bioassay 法としては *Comamonas terrigena* ATCC 8461 を検定菌とする FOULDS ら³⁾の方法が報告されているが、本菌は CPZ にも感受性を示すため、CPZ 共存下では SBT を定量することはできない。著者らは CPZ 共存下で SBT の分別定量が可能な bioassay 法、GC 法及び GC-MS 法を検討し、更に、SBT 共存下での CPZ の bioassay 法に与える SBT 共存の影響についても検討を行った。

SBT はそれ自身の抗菌力が弱いため CPZ 耐性で β -lactamase 産生の *E. coli* 603 を検定菌とし、CPZ を含有する培地を用いる bioassay 法により、検定試料中の CPZ の影響を受けることなく SBT を 1.6 $\mu\text{g/ml}$ まで分別定量可能であった。CPZ の 150 $\mu\text{g/ml}$ を含有した BHIA 培地を検定用培地として用い、BHIB にて 37°C 一夜培養した菌液を 1% 接種し、28°C で 20~24 時間培養することが最適条件であった。尚、検体の希釈液 pH は 7.0 が SBT の感度、安定性に対してすぐれていた。

一方、SBT/CPZ 併用時の CPZ の bioassay 法としては、*M. luteus* ATCC 9341 を用いた従来⁴⁾の方法の条件を多少変更することによって、共存する SBT の影響を受けずに十分通用することが今回の実験で確認された。即ち、培養温度としては 28℃ がより感度を上昇させ、希釈に用いるリン酸緩衝液の pH は SBT の最適 pH である pH 7.0 を用いることによって両薬物を同一希釈液で定量に供することができた。

SBT 及び CPZ の bioassay 法において標準液を血清で調製した場合は 0.1MPB (pH 7.0) を用いた場合より阻止円が小さくなり、この血清による影響は CPZ の場合に、より顕著であった。これは CPZ 及び SBT の血清に対する蛋白結合率の差によるものと考えられ、SBT、CPZ の蛋白結合率は動物種により異なる⁵⁾ことから、血清検体は同種の動物から得たコントロール血清を用いて希釈する必要がある。

更に SBT の微量定量法としてクロマトグラフ法を検討した。即ち、SBT をジアゾメタンによりエステル化し、GC のアルカリ炎イオン化検出器で体液及び組織内測定限界濃度：0.5 µg/ml, g の SBT の測定を可能とし、さらに化学イオン化法を用いた GC-MS 法によって、血清中濃度 0.05 µg/ml の SBT の測定が可能となる条件を設定した。これら GC 法は bioassay 法に比べ測定感度が優れ、SBT を他剤と分別定量することが可能である。

検体の測定は試料採取後直ちに行うのが望ましいが、ヒト血清、尿検体は -25℃ 以下に凍結保存し 3 週間以内に測定を行えば、力価低下はないものと判断される。

文 献

- 1) ENGLISH, A. R.; J. R. RETSEMA, A. R. GIRARD, J. E. LYNCH and W. E. BARTH : CP-45,899, A beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams : Initial bacteriological characterization. *Antimicrob. Agents Chemother* 14 : 414~419, 1978.
- 2) 川崎賢二, 新美博仕, 沖 俊一, 小酒井望, 小栗豊子 : Sulbactam および Sulbactam/Cefoperazone の抗菌活性. *Chemotherapy*, 32 (S-4) : 78~96, 1984
- 3) FOULDS, G.; J. P. STANKEWICH, D. C. MARSHALL, M. M. OBRIEN, S. L. HAYES, D. J. WEIDLER and F. G. MCMAHN : Pharmacokinetics of sulbactam in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23 : 692~699, 1983.
- 4) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 渡辺泰雄 : Cefoperazone (T-1551) の体液内濃度測定法について, *Chemotherapy* 28 (S-6) : 157~162, 1980.
- 5) 加納 弘, 下岡新雄, 沖 俊一 : Sulbactam 及び Sulbactam/Cefoperazone の吸収, 分布, 代謝及び排泄. *Chemotherapy* 32 (S-4) : 121~130, 1984

ASSAY METHODS OF SULBACTAM AND CEFOPERAZONE IN BODY FLUIDS AND TISSUES

HIROSHI KANO, KANEO SEKIGUCHI, HIROSHI TATEMATSU,
KINO SHIMOOKA and TOSHIKAZU OKI

Biochemistry Laboratory, New Product Research Center, Pfizer Taito Co., Ltd.

Concentrations of sulbactam (SBT) and cefoperazone (CPZ) in body fluids and tissues following an intravenous administration of the combination of SBT/CPZ were measured by microbiological assay, gas chromatography (GC) and gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS).

CPZ could be determined by a standard agar-diffusion microbiological assay using *Micrococcus luteus* ATCC 9341 without any influence of co-existing SBT. SBT was microbiologically assayed by using a β -lactamase producing strain, *Escherichia coli* 603, in the presence of subinhibitory concentrations of CPZ (150 $\mu\text{g/ml}$ in the medium). These microbiological assay methods of SBT and CPZ revealed good sensitivity; 1.6 and 0.4 $\mu\text{g/ml}$, respectively, with wide range linearity.

In addition, low concentration of SBT in biological specimens was determined by GC and GC-MS with a fairly good detection limit of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and 0.05 $\mu\text{g/ml}$ in the serum, respectively. The concentration of SBT in biological specimens determined by the GC method showed a good correlation with those obtained by microbiological assay method.

SBT and CPZ were stable in human serum and urine at -20°C over a period of 21 days.