

高速液体クロマトグラフィーポストラベル法によるネチルマイシンの分析

—蛍光試薬に *o*-フタルアルデヒド/ β -メルカプトプロピオン酸を用いた分析—

大月秀夫・上 洋司・村川英雄・藤本 尚

エッセクス日本株式会社品質管理部

(昭和 61 年 1 月 23 日受付)

アミノ配糖体系抗生物質の一種であるネチルマイシン (NTL) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ポストラベル法による高感度かつ安定な定量を目的として、蛍光試薬に *o*-フタルアルデヒド (OPA)/ β -メルカプトプロピオン酸 (MP) を用いる方法について検討した。

OPA/MP を用いた場合、従来より繁用されている OPA/2-メルカプトエタノール (ME) に比べ、蛍光試薬および蛍光試薬-NTL 反応生成体の安定性が優れていた。更に OPA/ME に比べ、反応温度、時間などの測定条件や蛍光試薬の使用可能期間に関し精密な設定を必要とせず、オートサンプラーによる長時間にわたる分析においても扱いやすいという利点があった。また、蛍光強度は OPA/ME の約 2 倍であるため、血漿中 NTL の検出限界の増大を認めた (OPA/MP ; 0.2 μ g/ml, OPA/ME ; 0.5 μ g/ml)。更に、SLFIA 法 (検出限界 1 μ g/ml) と比較すると、やや長い分析時間を要するが、低濃度域での正確な分析が可能となった。

また、NTL を健康人 7 名に筋注し、血清中の NTL 濃度を OPA/MP または OPA/ME を蛍光試薬とする HPLC ポストラベル法および SLFIA 法で測定した。HPLC ポストラベル法による測定値は SLFIA 法に比べやや低値であったが、OPA/MP および OPA/ME を用いた HPLC ポストラベル法間の測定値は良く一致した。

アミノ配糖体系抗生物質の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による血中濃度測定には *o*-フタルアルデヒド (OPA) と 2-メルカプトエタノール (ME) を蛍光ラベル化剤とするポストラベル法が繁用されている¹⁻⁵⁾。

この方法は、第 1 級アミンを有する化合物の高感度で特異性の高い分析法として有用である反面、チオール化合物として ME を用いる方法は、蛍光試薬自体あるいは蛍光試薬と第 1 級アミンとの反応生成物が不安定であるという欠点がある¹⁰⁻¹⁵⁾。

このため、著者らはアミノ配糖体系抗生物質の高感度かつ安定な分析法を確立する目的で、ME に代わるチオール化合物として β -メルカプトプロピオン酸 (MP) に着目し検討を行なっている^{16,17)}。今回、HPLC ポストラベル法に OPA/MP を用いて、アミノ配糖体系抗生物質の一種であるネチルマイシン (NTL) の血中濃度測定に応用したところ、良好な結果が得られたので報告する。

I. 方 法

1. 試薬

無水硫酸ナトリウム (蛍光分析用, 和光), *o*-フタル

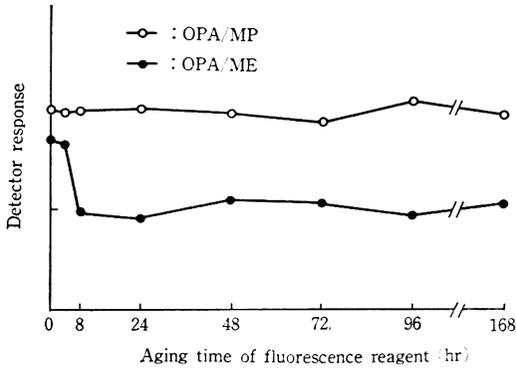
アルデヒド (OPA) (蛍光分析用, 半井), 2-メルカプトエタノール (ME) (生化学用, 和光), β -メルカプトプロピオン酸 (MP) (特級, 半井), 0.4 M ホウ酸緩衝液 (ホウ酸 24.7 g/L, KOH にて pH を調整した), 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (日本ウォーターズ, PIC B-7TM), ネチルマイシン (NTL) 定量用 SLFIA キット (マイルス・三共, エームス TDA ネチルマイシンTM)。NTL はアメリカ・シェリング社より入手した。

2. 蛍光強度の測定および HPLC 測定条件

1) 移動相および蛍光試薬の調製: 移動相には 0.32 M 硫酸ナトリウムおよび 0.005 M 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (PIC B-7) を含む水溶液をミリポアフィルター (HA, 0.45 μ m) で濾過後使用した。蛍光試薬は OPA 600 mg をメタノール 10 ml に溶解し、ME 2 ml (29.5 mmole) または MP 2.5 ml (29.5 mmole) を加え攪拌した後、0.4 M ホウ酸緩衝液を加え 1 L とし、ミリポアフィルター (HA, 0.45 μ m) で濾過後使用した。なお、ホウ酸緩衝液については、pH の影響に関する検討以外は ANHALT ら³⁾に準じ pH 10.4 (ホウ酸 24.7 g, KOH 21.3 g/L) のものを用いた。

2) 蛍光強度の測定: 移動相と OPA/MP または

Fig. 1 Stability of fluorescence reagent (OPA/MP or OPA/ME): Decline of the fluorescence intensity of OPA/MP or OPA/ME derivatives of netilmicin in the mixture of mobil phase and fluorescence reagent (3 : 1)



OPA/ME を HPLC での流速の割合である 3 : 1 に混合し、これに NTL を 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた後、蛍光分光光度計 (日立, 650-10 型) を用いて蛍光強度を測定した (励起波長 340 nm, 検出波長 440 nm, スリット幅 5 nm)。

3) HPLC 測定条件: 日本ウォーターズ製 HPLC 装置 (ポンプ 510 型, 蛍光検出器 420 型, 試料注入装置 833 型), カラム (μ Bondapak C_{18} , 3.9 mmI. D. \times 300 mm, 日本ウォーターズ) を用い, カラム温度: 室温 (約 25°C), 移動相流速: 0.9 ml/min, 蛍光試薬流速: 0.3 ml/min, 励起波長: 340 nm, 検出波長: 440 nm で測定した。

4) 健康人への投与・採血: 健康な男子 7 名 (年齢: 22~41 歳, 体重 59~82 kg) を対象として, NTL 100 mg を上腕三頭筋に 1 回投与した。採取した血液は, 常法に従って血清を分離した後試験に供するまで -20°C にて保存した。なお, 投与および採血は, 京都地域医療学際研究所附属病院にて実施した。

5) 血漿および血清検体の前処理: CM セフアデックスTM(C-25)を用いた ANHALT³⁾の方法に従い行った。

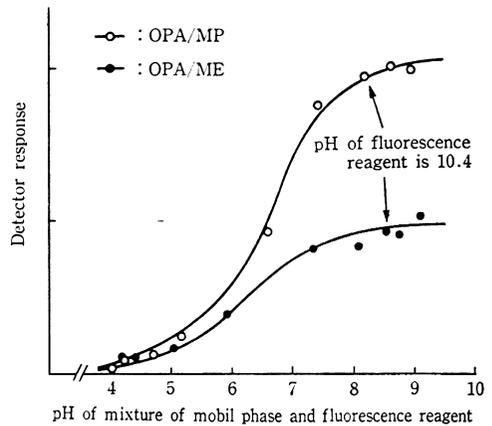
6) SLFIA 測定法: エームス TDA ネットルマイシン使用説明書に従った。

II. 結 果

1. 蛍光強度の変化

1) 蛍光試薬の安定性: 調製直後から 168 時間まで経過した OPA/MP または OPA/ME のそれぞれを, NTL を添加した移動相と混合しその蛍光強度を測定した (Fig. 1)。OPA/MP は調製後 168 時間まで安定であったが, OPA/ME は調製後 8 時間で蛍光強度が半減した後, 168 時間までほぼ安定であった。したがって, 以

Fig. 2 Effect of pH in the mixture of mobil phase and fluorescence reagent (3 : 1) on the fluorescence intensity of OPA/MP or OPA/ME derivatives of netilmicin



下の実験において, OPA/ME は調製後 1 日を経たものを使用した。

2) pH の影響: NTL を添加した移動相と pH 7~12 のホウ酸緩衝液を用いて調製した OPA/MP または OPA/ME とを混合し, その蛍光強度を測定した (Fig. 2)。OPA/MP および OPA/ME 共に pH の上昇に従って蛍光強度は増加し, pH 8 以上でほぼ一定となった。ANHALT³⁾が用いている pH 10.4 のホウ酸緩衝液により調製した蛍光試薬と移動相の混合液の pH は, 約 8~9 を示した。この pH 領域での蛍光強度はいずれの蛍光試薬でも安定であったため, HPLC 分析にはこの緩衝液を用いることとした。

3) 蛍光試薬-NTL 反応生成体の安定性: NTL を添加した移動相と OPA/MP または OPA/ME とを混合し, その蛍光強度の経時変化 (0~120 分) を測定した。混合 2 時間後の蛍光強度は, OPA/MP の場合には混合直後の約 80% に, OPA/ME の場合には約 60% にそれぞれ減少し, OPA/MP の方が減少率が小さく, より安定であることを示した。

4) 反応温度および反応時間の影響: 0.8 m または 5 m の長さの反応コイルを用い, 反応温度を 25~55°C の間で変化させて, 得られる蛍光試薬-NTL 反応生成体の蛍光強度を測定した (Fig. 3)。OPA/MP は反応温度による影響をほとんど受けなかったが, OPA/ME では反応温度による蛍光強度の低下傾向が認められた。しかし反応時間 (反応コイルの長さ) による影響は両者ともほとんど認められなかった。

2. ヒト血漿を試料として用いた時の測定精度

ヒト血漿に各濃度の NTL を添加した試料につき,

Fig. 3 Effect of the reaction temperature and the reaction coil length on HPLC assay of netilmicin.

[Condition : Flow rate of mobil phase ; 0.9 ml/min, Flow rate of fluorescence reagent (OPA/MP or OPA/ME) ; 0.3 ml/min, 2 μ g of netilmicin charged]

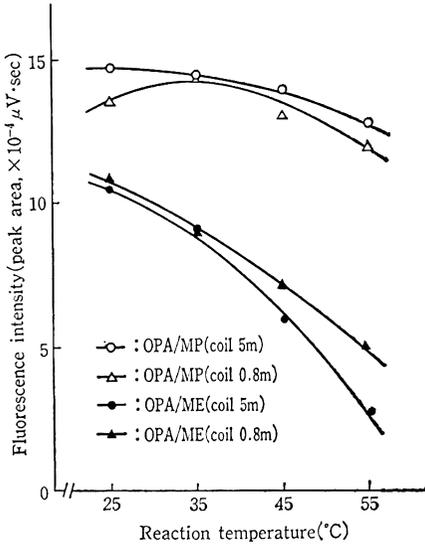
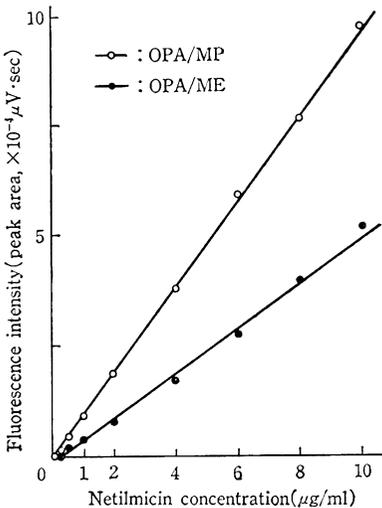


Fig. 4 Calibration curves for HPLC assay of netilmicin in plasma



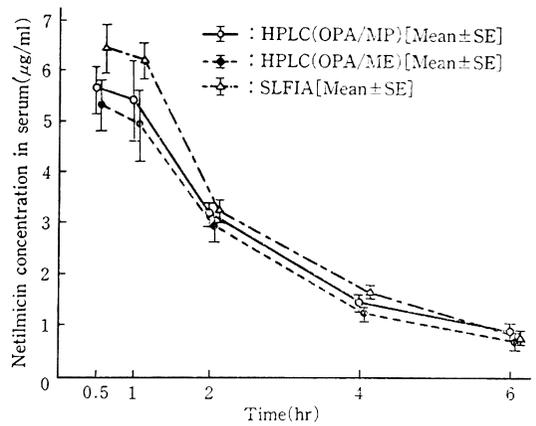
OPA/MP または OPA/ME を用いた HPLC 分析を行ない、その精度を比較した。

1) 検量線 : 血漿中に NTL の 0~10 μ g/ml を含む試料を用いて作成した検量線を Fig. 4 に示す。いずれの蛍光試薬を用いても良好な直線性を示したが、直線の傾きは OPA/MP の方が約 2 倍大きく、感度の上昇を示し

Table 1 Comparison of HPLC(OPA/MP or OPA/ME) and SLFIA for the determination of netilmicin in plasma

Method	HPLC				SLFIA	
	OPA/MP		OPA/ME			
Concentration (μ g/ml)	1.0	8.0	1.0	8.0	1.0	8.0
R.S.D. % (n=10)	3.7	2.4	3.2	3.7	14.0	3.7
Limit of detection (μ g/ml)	0.2		0.5		1.0	
Sample volume (μ l)	400		400		20	

Fig. 5 Serum concentrations of netilmicin in seven healthy adult volunteers after 100 mg intramuscular injection



た。

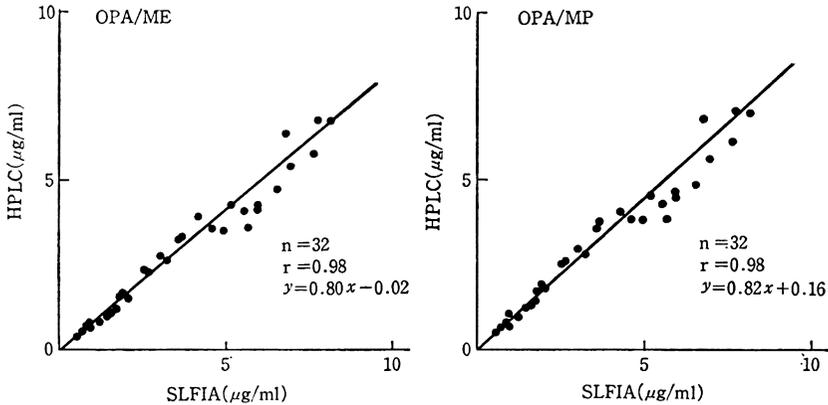
2) 相対標準偏差および検出限界 : HPLC 法 (OPA/MP または OPA/ME) および SLFIA 法による血漿中 NTL の分析結果を Table 1 に示す。HPLC 法による相対標準偏差は、OPA/MP を用いた場合 3.7% (1.0 μ g/ml) および 2.4% (8.0 μ g/ml), また OPA/ME を用いた場合 3.2% (1.0 μ g/ml) および 3.7% (8.0 μ g/ml) となり、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、SLFIA 法と比較すると、いずれの蛍光試薬を用いた HPLC 法も低濃度から高濃度にわたり精度良く測定することができた。また、検出限界は OPA/ME の 0.5 μ g/ml, SLFIA 法の 1.0 μ g/ml に対し、OPA/MP は 0.2 μ g/ml と低く、より低濃度での測定が可能であった。

3. SLFIA 法と HPLC 法 (OPA/MP または OPA/ME) との相関

健康人 7 名に NTL 100 mg をそれぞれ投与・採取した血清試料につき、NTL 濃度を HPLC 法 (OPA/MP または OPA/ME) および SLFIA 法により測定した。

1) 血清中 NTL 濃度の推移 : 試料中の NTL 濃度の経時的な推移を Fig. 5 に示す。HPLC 法に比べ SLFIA 法はやや高い値を示したが、HPLC 法の間では

Fig. 6 Correlation between HPLC assay [OPA/ME (left) and OPA/MP (right) used as the fluorescence reagent respectively] and SLFIA [substrate-labeled fluorescent immunoassay] for netilmicin in serum



ほとんど差が認められなかった。

2) SLFIA法とHPLC法の相関: SLFIA法とHPLC法の相関図をFig.6に示す。SLFIA法に対してHPLC法は、OPA/MPまたはOPA/MEのいずれを用いても高い相関性(ともに $r=0.98$)を示した。回帰式は、 $y=0.82x+0.16$ (OPA/MP), $y=0.80x-0.02$ (OPA/ME)であり、SLFIA法の方が全般にやや高い値を示す傾向がみられたが、HPLC法の間にはほとんど差が認められなかった。

III. 考 察

蛍光検出法を用いたHPLCによってアミノ配糖体系抗生物質を測定する際にOPAを用いると、アミノ基を蛍光ラベルするためにチオール化合物の存在が必要とされている。従来、チオール化合物としてはMEが、その簡便性および適用性の広さから繁用されてきたが、蛍光試薬としてのOPA/MEの不安定性、あるいは第1級アミンとの反応生成物の蛍光強度の経時的な低下が指摘され¹⁰⁻¹⁵⁾、これが欠点となっていた。

OPA/MEを用いたアミノ基のラベル反応では、蛍光物質としてイソインドール誘導体が生成されるといわれているが¹⁶⁾、これについては、その反応機構を含め未だ確認されておらず、その不安定性の原因も明らかとなっていない。しかし、生成したイソインドール誘導体の不安定性については、チオール化合物であるMEの水酸基がイソインドール環のC-1位を求核攻撃すること¹⁹⁾、アミノ酸をラベル化する時には、アミノ酸のC-10位のカルボキシル基の電子供与性がイソインドール環の安定性に関与することなどの報告がある¹⁴⁾。またチオール化合物由来のS原子を含むアルキル基が閉環し、イソインドール環を生成する際に、その環のサイズが3員環より

も4員環である場合には、分解が生じにくいなどの報告もある²⁰⁾。

著者らは、より高感度かつ安定な分析を目的として蛍光試薬の検討を行ってきたが、今回、MEに代わりうるチオール化合物としてMPに着目し、アミノ配糖体系抗生物質であるNTLのHPLCポストラベル法による分析に用い、MEとの比較を行った。

その結果、蛍光試薬としての経時的安定性をみると、OPA/MEでは調製後8時間で蛍光強度が半減するのに比べ、OPA/MPでは調製後168時間経過しても変化が認められなかった。また、蛍光試薬とNTLの反応生成物の蛍光強度の経時変化をみても、OPA/ME(反応後2時間で約60%)に比べ、OPA/MP(反応後2時間で約80%)の方が安定であった。次に、反応時のpHおよび反応時間については、OPA/MEとOPA/MPに差は認められなかったものの、反応温度については、OPA/MEが温度上昇につれて蛍光強度が低下傾向を示すのに比べ、OPA/MPはほとんど影響を受けなかった。

以上の結果は、OPA/MPを用いて分析を行なう場合、温度、反応時間などの測定条件を精密にコントロールする必要なく、蛍光試薬の使用期間を通して安定な測定が可能となることを意味する。すなわち、絶対検量線を用いる場合でも頻繁な標準品の“はさみこみ”による補正を必要とせず、多数の検体を同時に処理する際にはOPA/MEに比べて著しく有利となる。

一方、血漿または血清の実試料を用いた測定においては、OPA/MEおよびOPA/MPともに、検量線は良好な直線性を示し、低濃度(1.0 μg/ml)および高濃度(8.0 μg/ml)における相対標準偏差もほとんど差を認めず、SLFIA法とも高い相関性を示した。更に、OPA/

ME に比べ OPA/MP は、約 2 倍の蛍光強度を示し、検出限界も向上した (OPA/ME : 0.5 $\mu\text{g/ml}$, OPA/MP : 0.2 $\mu\text{g/ml}$)。

アミノ配糖体系抗生物質は、血中有効濃度域が、副作用の発現する中毒濃度域と接近しており、高感度で精度の良い血中濃度のモニタリングが重要視されているが、今回の検討により、NTL については、チオール化合物として MP を用いることによって、より高感度かつ安定に多数検体の測定が可能となり、所期の目的を達した。更に、この方法は他のアミノ配糖体系抗生物質についても充分応用可能であると思われる。

文 献

- 1) MAYS, D. L.; R. J. VAN APELDOORN & R. G. LAUBACK : High-performance liquid chromatographic determination of kanamycin. *J. Chromatogr.* 120 : 93~102, 1976
- 2) ANHALT, J. P. : Assay of gentamicin in serum by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11 : 651~655, 1977
- 3) ANHALT, J. P. & S. D. BROWN : High-performance liquid chromatographic assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *Clin. Chem.* 24 : 1940~1947, 1978
- 4) 渡部 誠, 近藤恭子, 真下啓明, 川本健志, 島津邦彦 : 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。 *Chemotherapy* 30 : 21~23, 1982
- 5) 藤本 尚, 松島宏親 : 高速液体クロマトグラフィーによる血漿中ネチルマイシンの分析。 *薬剤学* 41 : 172~176, 1981
- 6) 篠崎公一, 佐々木康人, 高橋 悟, 土居真理, 田中美雄, 増原慶壮, 荒井 栄, 染谷一彦 : 高速液体クロマトグラフィーによる血中アミノ糖系抗生物質測定法。 *臨床化学* 11 : 132~137, 1982
- 7) KUBO, H.; T. KINOSHITA, Y. KOBAYASHI & K. TOKUNAGA : Micro determination of gentamicin in serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 227 : 224~248, 1982
- 8) KUBO, H.; Y. KOBAYASHI, T. KINOSHITA & T. NISHIKAWA : Micro determination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography. *BUNSEKI KAGAKU* 31 : E 263~E 268, 1982
- 9) KAWAMOTO, T.; I. MASHIMO, S. YAMAUCHI & M. WATANABE : Determination of sisomicin, netilmicin, astromicin and micromycin in serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 305 : 373~379, 1984
- 10) CRONIN, J. R. & P. E. HARE : Chromatographic analysis of amino acids and primary amines with *o*-phthalaldehyde detection. *Anal. Biochem.* 81 : 151~156, 1977
- 11) SIMONS, JR. S. S. & D. F. JOHNSON : Reaction of *o*-phthalaldehyde and thiols with primary amines : Fluorescence properties of 1-alkylisoindoles. *Anal. Biochem.* 90 : 705~725, 1978
- 12) CHEN, R. F.; C. SCOTT & E. TREPAN : Fluorescence properties of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids. *Biochemica et Biophysica Acta.* 576 : 440~455, 1979
- 13) CRONIN, J. R.; S. PIZZARELLO & W. E. GNDY : Amino acid analysis with *o*-phthalaldehyde detection : Effects of reaction temperature and thiol on fluorescence yields. *Anal. Biochem.* 93 : 174~179, 1979
- 14) KUCERA, P. & H. UMAGAT : Design of a post-column fluorescence derivatization system for use with microbore columns. *J. Chromatogr.* 255 : 563~579, 1983
- 15) COOPER, J. D. H.; G. OGDEN, J. MCINTOSH & D. C. TURNELL : The stability of the *o*-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids : An investigation using high-pressure liquid chromatography with a pre-column derivatization technique. *Anal. Biochem.* 142 : 98~102, 1984
- 16) 越出邦和, 田和理市, 広瀬信吾, 藤本 尚 : アミノグリコシド系抗生物質の *o*-フタルアルデヒドによる HPLC プレラベル法に対する基礎的検討。 *日本薬学会第 105 年会講演要旨集* : 374, 1984
- 17) KOSHIDE, K.; R. TAWA, S. HIROSE & T. FUJIMOTO : Liquid chromatographic determination of sisomicin in plasma, with fluorometric pre-column derivatization. *Clin. Chem.* 31 : 1921~1922, 1985
- 18) SIMONS, JR. S. S. & D. F. JOHNSON : Reaction of *o*-phthalaldehyde and thiols with primary amines : Formation of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles. *J. Org. Chem.* 43 : 2886~2891, 1978
- 19) SKAADEN, T. & T. GREIBROKK : Determination of polyamines by pre-column derivatization with *o*-phthalaldehyde and ethanthiol in combination with reversed phase HPLC. *J. Chromatogr.* 247 : 111~122, 1982
- 20) STOBAUGH, J. F.; A. J. REPTA, L. A. STERNSON & K. W. GARREN : Factors affecting the stability of fluorescent isoindoles derived from reaction of *o*-phthalaldehyde and hydroxyalkylthiols with primary amines. *Anal. Biochem.* 135 : 495~504, 1983

DETERMINATION OF NETILMICIN BY HIGH-PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
FLUORESCENT DETECTION :
USE OF *o*-PHTHALALDEHYDE AND β -MERCAPTOPROPIONIC
ACID AS POST-COLUMN DERIVATIZATION

HIDEO OTSUKI, HIROSHI KAMI, HIDEO MURAKAWA and TAKASHI FUJIMOTO
Quality Control Division, Essex Nippon Kabushiki Kaisha

The netilmicin (NTL), which is an aminoglycoside antibiotic, was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde and β -mercaptopropionic acid (OPA/MP) for the sensitive and stable analysis.

The OPA/MP gave the good stability for a long time more than OPA and 2-mercaptoethanol (ME) (OPA/ME), and also its fluorescent derivative of NTL was stable. The reaction of OPA/MP and NTL was almost independent on both the reaction temperature and the time. So, the OPA/MP was the more useful reagent for HPLC analysis using auto-sampler. The fluorescent intensity of the derivative of NTL with OPA/MP was about twice as much as that of the OPA/ME [the limits of detection in human plasma were 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (OPA/MP) and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (OPA/ME), respectively].

For an application to the clinical sample, the serum concentrations after intramuscular administration of NTL in man were measured by the three method (HPLC with OPA/MP, HPLC with OPA/ME and SLFIA). The good correlation between both HPLC methods and SLFIA method was obtained, and the SLFIA method gave a little higher results. The results of both HPLC methods were almost the same. In the view of the stability and the sensitivity, therefore, the use of OPA/MP in HPLC analysis of the aminoglycoside antibiotics may be recommended than the OPA/ME.