

HBK の体液内濃度測定法

II. 高速液体クロマトグラフ法

小宮 泉・三富奈由・西尾元宏
明治製菓株式会社・薬理安全性研究所

ラベル試薬として *o*-phthalaldehyde を用いたポストカラム高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により、血清中 (または血漿中)、尿中および胆汁中 HBK 濃度測定法について検討した。

前処理として、CM-Sephadex カラムを用いて HBK を生体成分から分離し、ion-pair を用いた逆相系クロマトグラフ法で定量した。その際 Dibekacin を内部標準として用いた。本 HPLC 定量法の精度は、変動係数としてヒト血清中 HBK 濃度測定法の場合 2.7~3.8%、ヒト尿中濃度測定法の場合 1.0~1.7% と良好であった。ヒトに HBK を静脈内投与した時の血清中濃度と尿中濃度を HPLC 法および Bioassay 法で測定した所、両者は良く相関した。

HBK は広範囲の抗菌スペクトルを持つ、新規アミノ配糖体抗生物質である。アミノ配糖体抗生物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による、血清または血漿中薬物濃度の測定法は種々報告されている¹⁻⁴⁾。今回著者らは、J.P. ANHALT の Gentamicin 定量法¹⁾に変更を加え、ポストラベル HPLC 法による HBK の体液内濃度測定法を検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤および試薬

HBK および Dibekacin (DKB) は明治製菓株式会社で合成されたものを用いた。その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 前処理

ヒトの血清または尿試料 0.4 ml に内部標準として DKB の M/15-phosphate buffer (pH 8.0) 溶液 (血清の場合は 5 μ g/ml, 尿の場合は 50 μ g/ml) 0.4 ml を加え、よく攪はんした後、そのうちの 0.6 ml を bed volume 1 ml の CM-Sephadex (C-25) カラムにかけた。

その後、カラムを 0.2 M Na_2SO_4 2 ml で洗浄し、さらに 0.01 N NaOH を含む 0.2 M Na_2SO_4 0.5 ml で洗浄後、同液 2.5 ml で溶出した。溶出液に 1 N HCl 0.025 ml を加えた後、蒸発乾固し、残渣を 0.4 ml の蒸留水にとかし、その 10 μ l を HPLC に注入した。

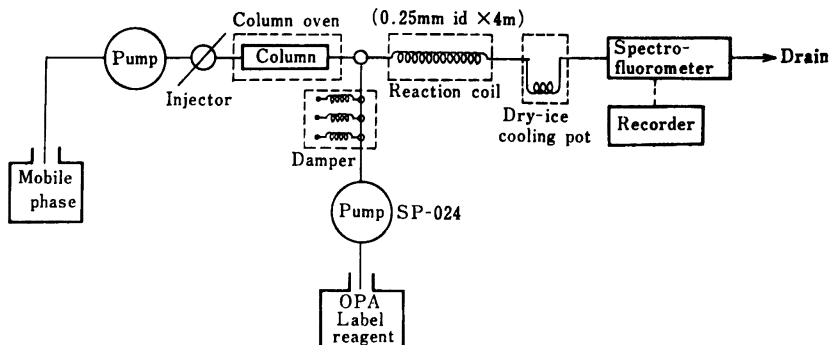
ラットの血漿または尿試料は、それぞれの 0.15 ml を使い、内部標準溶液 (DKB 溶液) で 2 倍に稀釈した後、ほぼヒトの試料と同様に処理した。一方ラットの胆汁は、胆汁成分をとり除くため、試料をのせた CM-Sephadex カラムを 0.2 M Na_2SO_4 2 ml で洗浄し、さらに 1% メタノールを含む 0.2 M Na_2SO_4 1 ml で洗浄し、その後は、ヒトの試料と同様に処理した。

なお、CM-Sephadex は、0.2 M Na_2SO_4 溶液中で膨潤させ、小型のガラスカラムに充填して用いた。

3. 測定方法

Fig. 1 にポストラベル法による HBK 定量の概略を示した。HPLC は Tri Rotar SR 2 (日本分光)、反応槽は 4 m のステンレスチューブコイルを内蔵した ASB-200

Fig. 1 Flow diagram of the HPLC system



(80°C に設定, 日本分光) を用いた。なお蛍光感度を増大させるため, 反応槽を通過したのち, 通過液をドライアイス上で冷却した。また, HPLC 測定条件は以下の通りであった。

カラム: TSK gel ODS 120 A (東洋曹達工業), 5 μ または 10 μ , 4 ϕ x 250 mm
 プレカラム: TSK gel ODS 120 A, 5 μ または 10 μ , 4 ϕ x 50 mm

Fig. 2 Chromatograms of control human serum (A) and serum containing 10 μ g/ml of HBK (B)

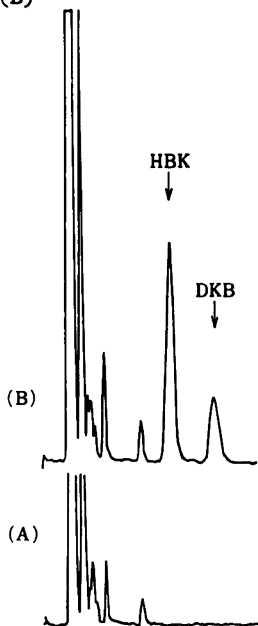


Fig. 3 Chromatograms of control human urine (A) and urine containing 100 μ g/ml of HBK (B)

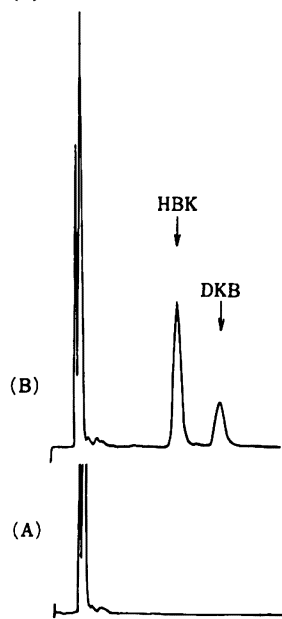


Fig. 4 Chromatograms of control rat plasma (A) and plasma containing 20 μ g/ml of HBK (B)

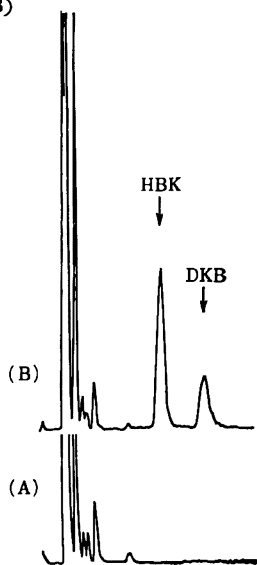


Fig. 5 Chromatograms of control rat urine (A) and urine containing 20 μ g/ml of HBK (B)

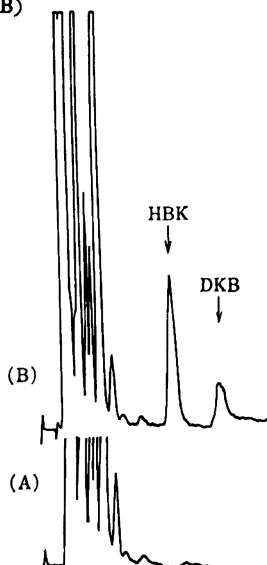
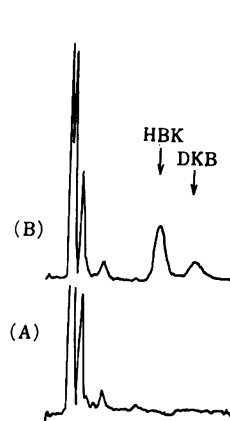


Fig. 6 Chromatograms of control rat bile (A) and bile containing 10 μ g/ml of HBK (B)



移動相：1 l 中に Na_2SO_4 28.41 g, PIC reagent B-7 (Waters Associates) 25 ml および pH 10.00 Titrisol buffer (E. Merck) 20 ml を含む水溶液

移動相流速：1 ml/min

ラベル (*o*-phthalaldehyde, OPA) 試薬：1 l 中に Fluescin (E. Merck) 20 ml, 2-mercaptoethanol 4 ml および pH 10.00 Titrisol buffer 200 ml を含む水溶液
ラベル試液流速：1 ml/min

検出器：FP-110 Spectrofluorometer (日本分光), Hg ランプ, Ex: 350 nm, Em: 440 nm

レコーダー：C-R 1 B Chromatopac (島津製作所)

なお, HBK の濃度はすべて力価換算して表示した。

II. 結 果

ヒト血清または尿中の HBK, および DKB (内部標準) の HPLC チャートを Fig. 2 および 3 に示した。同様にラット血漿, 尿および胆汁のチャートを Fig. 4~6 に示した。いずれの場合も, 生体成分の妨害は少なく, 安定して定量されることが示された。ヒト血清または尿

中の HBK の検量線を Fig. 7 に, ラット血漿, 尿および胆汁中の検量線を Fig. 8 に示した。いずれも原点を通る良好な直線を示した。

本測定法による精度を検討するため, ヒト血清中または尿中に一定量の HBK を溶解した後, 前述の方法により, HBK 濃度の測定を 4 回くり返して実施した。その結果を Table 1 に示した。いずれの場合もかたよりは小さく, また変動係数も, 血清の場合 2.7~3.8%, 尿の場合 1.0~1.7% と良好であった。

健康成人に HBK を点滴静注した際⁷⁾の血清中および尿中の HBK 濃度を一部測定し, 前報⁸⁾に示した Bio-assay 法の結果と比較した (Fig. 9)。血清中濃度の場合には, 切片は 0 に近く, また傾きはほぼ 1 を示し, 両測定値はほぼ 1:1 の対応を示した。また, 尿中濃度の場合にも, 傾きが 0.83 と若干 1 を下回るものの, 両測定値間の相関は良好であった。

III. 考 察

ヒトまたはラットの血清 (または血漿) 中 HBK 濃度

Fig. 7 Standard curves for HBK in human serum (A) and urine (B)

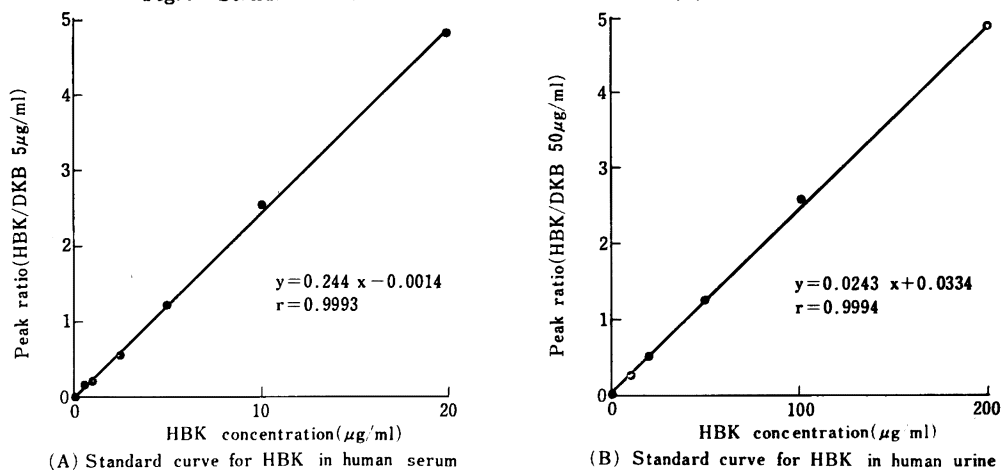


Fig. 8 Standard curves for HBK in rat plasma (A), urine (B), and bile (C)

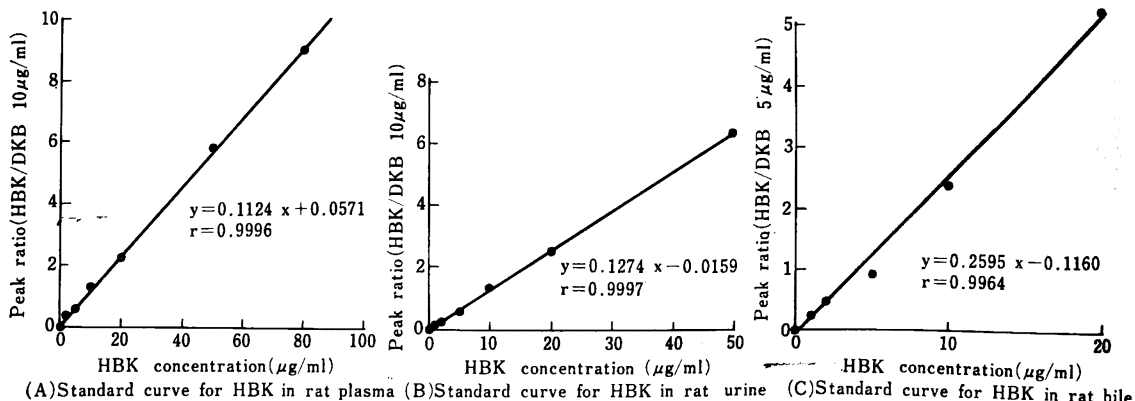
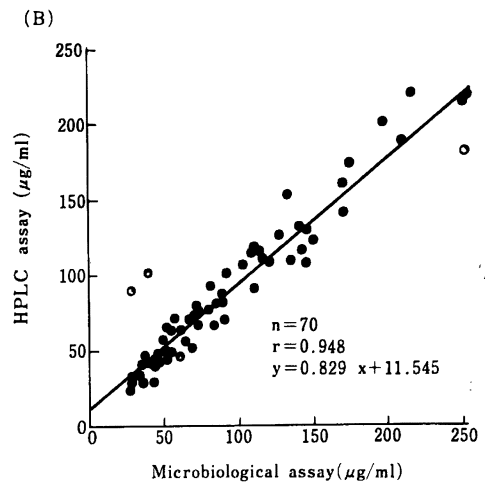
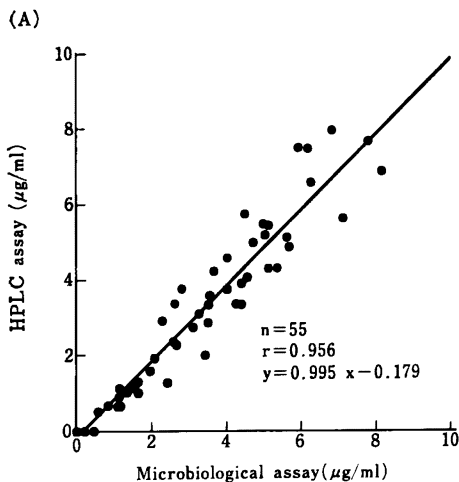


Table 1 Coefficient of variation (c.v.) for HPLC determination of HBK in human serum (A) and urine (B)

| (A) | | (B) | |
|--|-----------------|--|-----------------|
| HBK concn. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | HBK concn. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | |
| added | found | added | found |
| 4 | 3.81 | 75 | 75.4 |
| | 3.87 | | 72.5 |
| | 3.65 | | 73.1 |
| | 4.00 | | 74.0 |
| mean \pm S.D. | 3.83 \pm 0.15 | mean \pm S.D. | 73.8 \pm 1.3 |
| 8 | 8.00 | 150 | 147.2 |
| | 7.87 | | 148.1 |
| | 7.82 | | 150.5 |
| | 8.30 | | 149.8 |
| mean \pm S.D. | 8.00 \pm 0.22 | mean \pm S.D. | 148.9 \pm 1.5 |
| c. v. (%) | | c. v. (%) | |
| 3.8 | | 1.7 | |
| 2.7 | | 1.0 | |

Fig. 9 Correlation of the HPLC assay of HBK in human serum (A) and in human urine (B) with the microbiological assay



および尿中 HBK 濃度は DKB を内部標準として, J. P. ANHALT の Gentamicin の HPLC 測定法¹⁾を一部改良した方法で精度良く測定されることが明らかとなった。しかし, ラット胆汁中の濃度は上記の血清または尿中 HBK 濃度測定時と同様の前処理方法では, 胆汁中成分が混入し, 良好なクロマトグラムが得られなかった。そこで, 試料をのせた CM-Sephadex を洗浄する際, 血清(または尿)の前処理方法に加え, 1% メタノールを含む 0.2 M Na_2SO_4 1 ml で洗浄することにより, この妨害成分を除去した。

本測定方法の検出感度は, 血清中濃度の場合, 約 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 尿中, 胆汁中濃度の場合, 約 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また精度は, 変動係数で 1.0~3.8% (Table 1) であり体液内濃度測定法として, 本法は比較的簡便で有用な方法であることが示された。

なお, ヒト血清中および尿中濃度の Bioassay 法との比較においても相関係数がそれぞれ 0.956 ($n=55$) および 0.948 ($n=70$) (Fig. 9) であり, 良好な相関性を示した。

文 献

- 1) ANHALT, J. P.; Assay of gentamicin in serum by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 11 : 651~655, 1977
- 2) MAITRA, S. K.; T. T. YOSHIKAWA, J. L. HANSEN, I. NILSSON-EHLE, W. J. PALIN, M. C. SCHOTZ & L. B. GUZE : Serum gentamicin assay by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 23 : 2275~2278, 1977
- 3) PENG, G. W.; G. G. JACKSON & W. L. CHIOU : High-pressure liquid chromatographic assay of netilmicin in plasma. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 12 : 707~709, 1977
- 4) MAITRA, S. K.; T. T. YOSHIKAWA, C. M. STEYN, L. B. GUZE & M. C. SCHOTZ : Amikacin assay in serum by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 14 : 880~885, 1978
- 5) BARENDT, D. M.; J. S. F. VAN DER SANDT & A. HULSHOFF : Microdetermination of gentamicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatography* 182 : 201~210, 1980
- 6) BARENDT, D. M.; C. L. ZWAAN & A. HULSHOFF : Improved microdetermination of gentamicin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatography* 222 : 316~323, 1981
- 7) HBK phase I Chemotherapy に投稿準備中
- 8) 新開祥彦, 石渡信由, 藤田正敏 : HBK の体液内濃度測定法, I. 微生物学的定量法。Chemotherapy

ASSAY METHOD OF HBK IN BIOLOGICAL BODY FLUIDS

II. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY METHOD

IZUMI KOMIYA, NAYU MITOMI and MOTOHIRO NISHIO

Pharmacology & Toxicology Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

A procedure for the high-performance liquid chromatographic (HPLC) determination of HBK in serum (or plasma) urine, and bile is described using post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde. The technique involves extraction of HBK from biological samples by using a CM-Sephadex column and analysis by reverse-phase, ion-pair chromatography. Dibekacin is used as an internal standard. The accuracy of this HPLC assay is 2.7-3.8% in human serum and 1.0-1.7% in human urine. The HPLC assay of HBK in human serum and human urine correlates well with the microbiological assay.