

高速液体クロマトグラフ法による Cefuroxime (CXM) の体液内濃度の測定

年光芳信・木南純二・萬宝国久・沖山雅彦・奥村和夫

新日本実業株式会社東京研究所

Cefuroxime axetil (CXM-AX, SN 407) の抗菌活性体である Cefuroxime (CXM) の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による 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。

クロマトグラム上で CXM と生体ブランクは分離し、それぞれ良好な検量線が得られ、血清および血漿で 85~87%、尿および胆汁で 96~100% の回収率が認められた。また、検出限界は血漿および血清で 0.2 µg/ml であった。

CXM はヒトおよびラットの体液中において -20°C 以下に凍結保存すれば少なくとも 14 日間 は安定であった。

Cefuroxime axetil (CXM-AX) は英国 Glaxo 社で開発された Cefuroxime (CXM) のアセトキシエチルエステル体である。CXM-AX は経口投与後、腸管粘膜からの吸収過程で脱エステル化され、広い抗菌力を発揮する CXM に変換されるプロドラッグである (Fig. 1)。

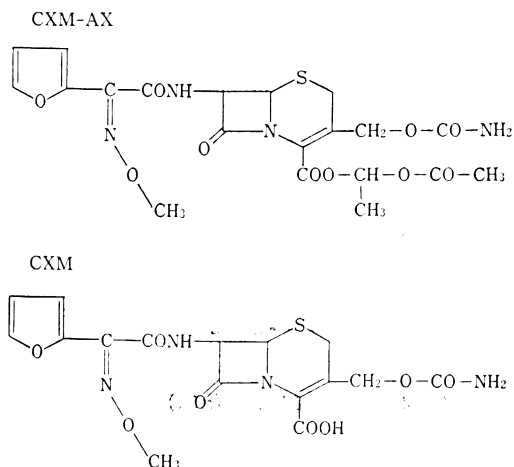
微生物学的定量法による CXM の体液内濃度測定法はすでに報告されているが、本報では CXM-AX の吸収および排泄を調べるために、HPLC 法による CXM の体液内濃度測定法ならびに体液中での安定性について検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

CXM (Glaxo 社)、Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品) をそ

Fig. 1 Chemical structures of CXM-AX and CXM



れぞれ用い、濃度はすべて力価で表示した。

2. 試薬および試料

2.1. 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、その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。

2.2. 試料

健康成人男子より血漿および尿、SD 系雄性ラットより血清、尿および胆汁を、それぞれ採取した。

3. 測定機器

高速液体クロマトグラフは日立 635 型液体クロマトグラフ (635-0900 型多波長 UV モニターおよび応用分光 UVI LOG-5 III 型) を用い、横河ヒューレット・パッカーカード 3390 A 型レポート・インテグレーターにより定量した。

4. 前処理および測定条件

4.1. 血漿および血清

0.2 ml の試料に内部標準物質 CEZ 4 µg を含む 0.56 N 過塩素酸溶液 0.8 ml を加え攪拌および遠心分離後、上清を HPLC に注入し、ピーク高比から内部標準法により CXM 濃度を測定した。

4.2. 尿および胆汁

リン酸緩衝液 (pH 6.0) で適宜希釈したヒト尿 1 ml に内部標準物質 CEZ 20 µg を添加し、ピーク高比から内部標準法により CXM 濃度を測定した。また、ラット尿および胆汁は適宜希釈し、CXM のピーク面積から絶対検量線法によりそれぞれ測定した。なお、HPLC の測定条件は Table 1 に示した。

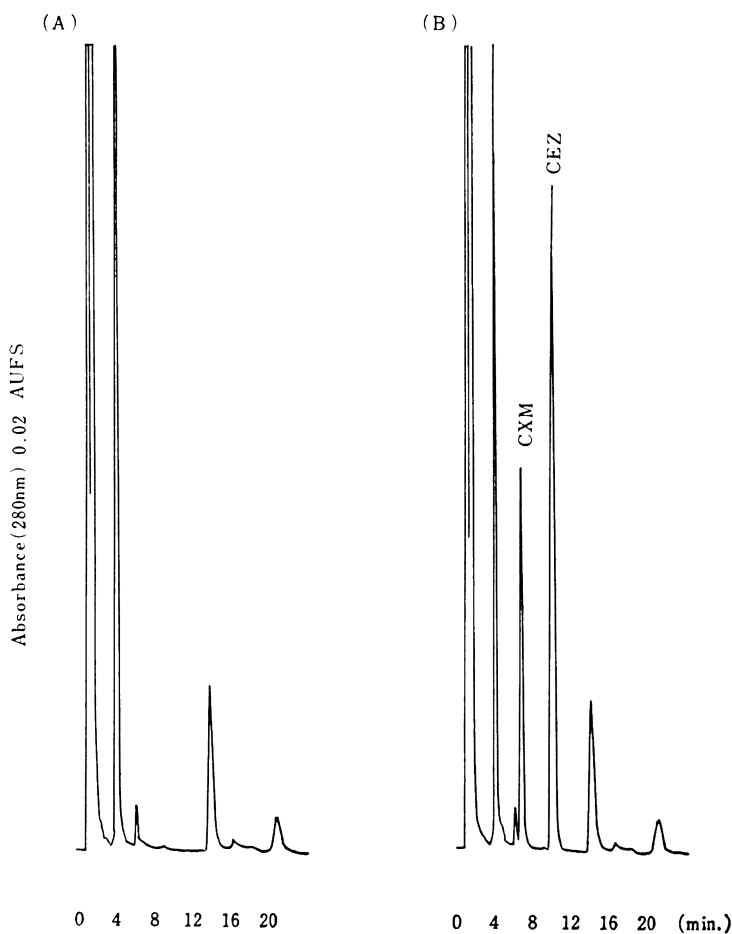
5. 体液中 CXM の安定性

既知濃度の CXM をヒトまたはラットの体液試料に

Table 1 HPLC conditions

	Human		Rat		
	Plasma	Urine	Serum	Urine	Bile
Column	Lichrosorb RP-18 (5 μ m, Merck), 4 mm i.d. \times 150 mm				
Column temp.	Ambient				
Mobile phase	M/15 KH ₂ PO ₄ : CH ₃ OH =83 : 17	M/20 phosphate buffer (pH 7.0) : CH ₃ OH =835 : 165	M/15 KH ₂ PO ₄ : CH ₃ OH =83 : 17	M/15 KH ₂ PO ₄ : CH ₃ CN =91 : 9	
Flow rate	1.1 ml/min.	1.0 ml/min.			
Detection	280 nm				
Sensitivity	0.02 a.u.f.s.				
Injection vol.	100 μ l	10 μ l	100 μ l	20 μ l	

Fig. 2 HPL chromatograms of (A) control human plasma and (B) plasma containing CXM and CEZ



それぞれ添加し、室温 (25°C)、冷蔵庫 (4°C) およびディープフリーザー (-20°C および -80°C) に保存し、経時的に残存 CXM を HPLC により測定した。なお、ラット尿および胆汁は採取条件に合わせ、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で希釈した試料を用いた。

II. 結果

1. クロマトグラフィー

Fig. 2 にヒト血漿, Fig. 3 にヒト尿に CXM をそれぞれ添加した時のクロマトグラムを示したが, CXM および CEZ 間の分離は良く, また, 生体由来ピークとの分離も良好であった。

2. 検量線

CXM をヒト血漿に 0.5~15 $\mu\text{g/ml}$, 尿に 10~1,000 $\mu\text{g/ml}$, また, ラット血清に 1~20 $\mu\text{g/ml}$, 尿に 10~150 $\mu\text{g/ml}$, 胆汁に 25~375 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でそれぞれ添加した時, いずれも原点を通るきわめて良好な直線性が認められた (Fig. 4, 5)。また, 検出限界はヒト血漿および尿においてはそれぞれ 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, ラット血清, 尿および胆汁においてはそれぞれ 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3. 回収率

Table 2 に体液からの添加回収率を示した。血漿および血清では 85~87%, 尿および胆汁では 96~100% で, 高く一定した回収率が認められた。

4. 体液中 CXM の安定性

体液中での CXM の安定性を Table 3, 4 に示した。血漿, 血清および尿においては -20°C 以下, 14 日間の保存で CXM の分解はほとんど認められず安定であった。また, 胆汁中では血清および尿中にくらべ室温下において不安定であるが, リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で希

Fig. 3 HPL chromatograms of (A) control human urine and (B) urine containing CXM and CEZ

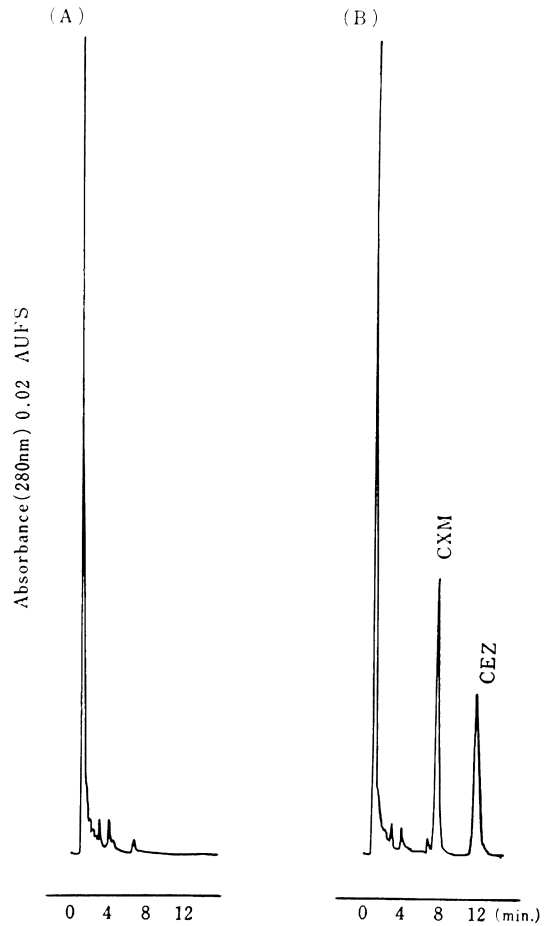


Fig. 4 Standard curves for CXM in human plasma and urine

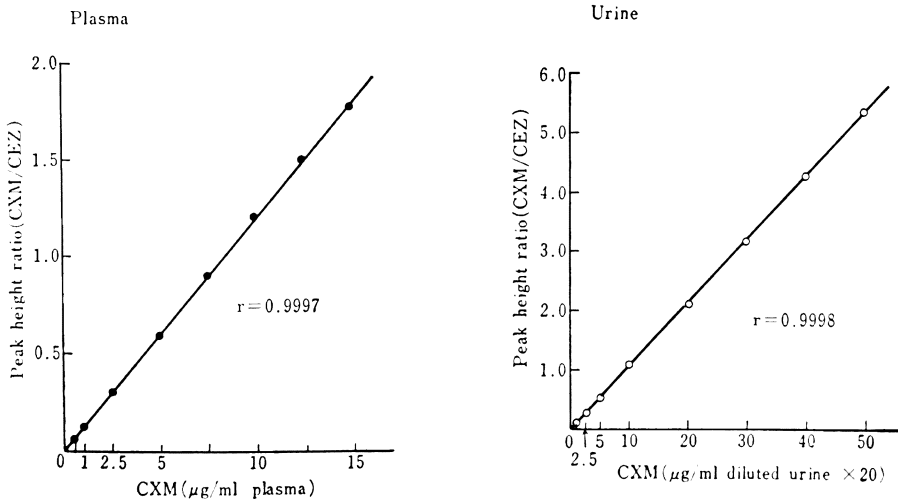


Fig. 5 Standard curves for CXM in rat serum, urine and bile

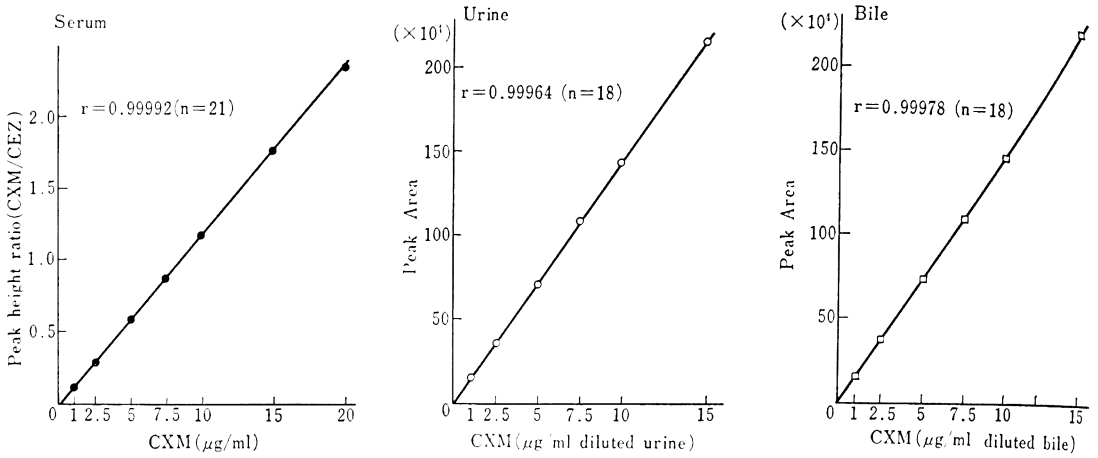


Table 2 Recovery of CXM in body fluids

		Added (μg ml)	Recovery (%)
Human	Plasma	5	87.3
		10	86.1
	Urine	200	100.2
		600	100.4
Rat	Serum	5	84.6
		10	87.1
	Urine	50	95.8
		100	96.9
	Bile	125	100.9
		250	99.5

n = 4

積し -20°C で保存すれば少なくとも 14 日間は安定であった。

III. 考 察

HPLC 法による CXM の体内濃度測定法について、今回、HEKSTER らの方法²⁾に準じて、血清および血漿中 CXM 濃度の微量定量法の確立を主眼とし検討した結果、良好な直線性および定量精度をもつ定量法が得られた。

さらに、血清、血漿および尿における CXM の安定性について検討した結果、 -20°C 以下で 14 日間の保存においてほとんど分解を認めず、また、胆汁中では pH の影響で、そのままでは血清や尿にくらべ不安定であったが、氷冷下で採取した後、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で希釈し -20°C 以下で保存すれば、少なくとも 14 日間

Table 3 Stability of CXM in human plasma and urine

Plasma				
	Room temp.	4°C	-20°C	-80°C
3 hrs.	104.0±2.5	98.9±0.3	—	—
6 hrs.	96.6±1.0	98.7±1.1	—	—
24 hrs.	86.2±1.1	98.5±1.4	101.6±0.5	103.0±2.2
4 days	—	98.5±0.5	107.1±0.9	102.8±0.7
7 days	—	—	97.5±0.1	101.5±0.6
14 days	—	—	100.8±1.8	102.1±1.9

Urine				
	Room temp.	4°C	-20°C	-80°C
3 hrs.	98.5±0.2	101.8±0.3	—	—
6 hrs.	99.0±0.2	101.1±0.2	—	—
24 hrs.	90.8±0.8	99.3±0.5	99.6±0.4	101.1±0.3
4 days	—	97.9±0.2	100.2±0.2	100.5±0.5
7 days	—	—	101.6±0.2	100.6±0.2
14 days	—	—	97.3±0.3	97.1±0.4

Mean ± S.E., n = 3

Table 4 Stability of CXM in rat serum, urine and bile

Serum				
	Room temp.	4 °C	-20 °C	-80 °C
6 hrs.	90.3±1.2	100.2±0.6	—	—
24 hrs.	69.7±0.5	100.5±0.4	99.6±0.3	99.5±0.8
3 days	—	99.0±1.1	100.4±0.4	99.9±0.3
7 days	—	—	101.2±0.4	99.6±2.0
14 days	—	—	100.3±0.6	99.9±0.6

Urine diluted with M/15 phosphate buffer (pH 6.0)				
	Room temp.	4 °C	-20 °C	-80 °C
6 hrs.	98.4±1.1	100.1±0.1	—	—
24 hrs.	86.2±0.8	99.4±0.3	100.4±1.0	100.6±0.2
3 days	—	100.3±0.4	99.3±0.3	98.7±0.3
7 days	—	—	96.4±0.2	97.1±0.1
14 days	—	—	96.6±0.6	97.4±0.6

Bile and bile diluted with M/15 phosphate buffer (pH 6.0)				
	Room temp.	4 °C	-20 °C	-80 °C
3 hrs.	(84.1±1.6)	(99.9±0.4)	—	—
6 hrs.	91.9±1.8 (75.7±1.2)	97.6±0.4 (95.8±1.1)	—	—
24 hrs.	74.3±0.5 (45.4±0.8)	99.4±0.6 (96.4±0.9)	99.0±0.0 (97.6±1.9)	99.7±0.8 (96.9±1.2)
3 days	—	98.8±0.7	101.4±1.1	101.9±0.6
4 days	—	—	(98.1±0.5)	(101.1±0.6)
7 days	—	—	102.9±0.1	100.3±0.8
14 days	—	—	99.5±1.3	100.8±0.4

Mean ± S.E., n=3

Figures in parenthesis indicate % of residual CXM in non-treated bile.

は定量的に全く問題がないことが確認された。

文 献

- 1) 奥村和夫, 達彦二, 福田一郎, 武田憲三, 小林順子, 加藤日出子: Cefuroxime の吸収, 体内分布, 代謝および排泄について。Chemotherapy 27 (S-6): 104~110, 1979

- 2) HEKSTER, Y. A.; A. M. BAARS & T. B. VREE: Comparison of high performance liquid chromatography and microbiological assay in the determination of plasma cefuroxime concentrations in rabbit. J. Antimicrob. Chemother. 6: 65~71, 1980

DETERMINATION OF CEFUROXIME (CXM) CONCENTRATIONS
IN BODY FLUIDS BY HIGH-PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY

YOSHINOBU TOSHIMITSU, JUNJI KINAMI, KUNIHISA MANBO,
MASAHIKO OKIYAMA and KAZUO OKUMURA
Tokyo Research Laboratories, Shin Nihon Jitsugyo Co., Ltd.

High-performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitative determination was studied on cefuroxime (CXM), the parent drug of cefuroxime axetil (CXM-AX). Also, the stability of CXM in body fluids was examined.

CXM was well separated from other endogenous compounds which were present in body fluids. When 0.5–15 $\mu\text{g/ml}$ of CXM was added to human plasma, 10–1,000 $\mu\text{g/ml}$ to human urine, 1–20 $\mu\text{g/ml}$ to rat serum, 10–150 $\mu\text{g/ml}$ to rat urine and 25–375 $\mu\text{g/ml}$ to rat bile, good calibration curves were obtained in all the cases.

The recoveries of CXM from serum and plasma were 85–87%, and those from urine and bile were 96–100%. The limit of detection was 0.2 $\mu\text{g/ml}$ for CXM both in human plasma and in rat serum.

CXM in body fluids was stable at least for two weeks if it was kept at -20°C or below.