

高速液体クロマトグラフィーによる Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) およびその代謝物のヒト体液内濃度測定法

小中隆盛・橋本広志・西村理恵子・来間和男・平内三政
塩野義製薬株式会社研究所

ヒト血漿中の 6315-S (Flomoxef) およびその代謝物である 6315-S oxide と 1-(2-hydroxyethyl)-1*H*-tetrazole-5-thiol (HTT) の濃度測定のために高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、6315-S と HTT それぞれ単独測定法と 3 者同時測定法の 3 方法を設定した。いずれの方法においても血漿はメタノール除蛋白法によって処理し、上清は水冷下 1 時間以内に HPLC に注入し、妨害ピークがなく、分離のよいクロマトグラムが得られた。6315-S, HTT および 6315-S oxide の測定限界はそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、6315-S と HTT に関し、単独法と同時定量法との間に差はなく、両者とも良好な直線性を示す検量線が得られた。なお、実検体においては 6315-S oxide はいずれの場合も測定限界以下の濃度であった。

ヒト尿中の 6315-S と HTT の同時測定法と 6315-S oxide の単独測定法を設定した。解凍後の尿試料は水冷下 4 時間以内に濾過後、直接 HPLC に注入を行ない、妨害ピークがなく分離のよいクロマトグラムが得られた。測定限界は 6315-S が 2 $\mu\text{g/ml}$, HTT が 2 $\mu\text{g/ml}$, 6315-S oxide が 0.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、また、それぞれについて良好な直線性を示す検量線が得られた。

6315-S (Flomoxef: FMOX) は、塩野義製薬研究所で合成、スクリーニングされた新しい注射用 oxacephem 系抗生物質で、既に市販されている Latamoxef (シオマリン[®], 略号: LMOX) と同一の 1-oxacephem 骨格を有する (Fig. 1)。

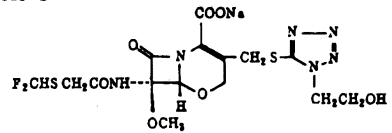
6315-S は LMOX のもつグラム陰性菌と嫌気性菌への強い抗菌力を保持しながら、多くの第三代系抗生物質の弱点であるグラム陽性菌への弱い抗菌力とアルコールとの相互作用 (disulfiram 様作用) を改良した抗生物質として選択されたものである¹⁾。

6315-S は生体に投与されると、一部体内で代謝を受けて、6315-S の 7 位側鎖の硫黄原子が酸化された構造 (-S \rightarrow O) をもつ化合物 (Fig. 1, 略号: 6315-S oxide) を生成し、このものは 6315-S に比し半分以下の弱い抗菌力を示すことが知られている²⁾。また、他の代謝物として 3 位の側鎖が切断された 1-(2-hydroxyethyl)-1*H*-tetrazole-5-thiol (略号: HTT, Fig. 1) が知られている³⁾。

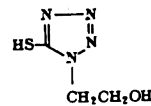
今回、ボランティアによる第 1 相試験に際し、血中ならびに尿中の 6315-S, 6315-S oxide および HTT の濃度を測定するため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による検討を行ない、有用な測定法を設定したので報告する。

Fig. 1 Chemical structure of 6315-S and its related compounds

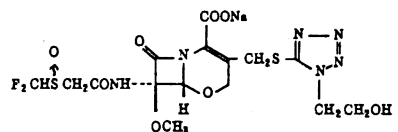
(I) 6315-S



(II) HTT



(III) 6315-S oxide



I. 実験材料と装置

1. 使用薬剤

6315-S は塩野義製薬研究所製分析標準品 Lot No F050NN を、6315-S oxide は同じく分析標準品 Lot No F002NN を用いた。また、HTT は東洋化成製造品 Lot No 307-01 を使用した。なお、濃度に関する値は 6315-S は力価換算、6315-S oxide は遊離酸換算、HTT は重量により表したが、いずれも $\mu\text{g/ml}$ で表示した。

2. 試薬

テトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロキシド (略号: TBA) 10%水溶液は和光純薬製を、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (略号: HDTMA) は関東化学製を、移動相有機溶媒のメタノールならびにアセトニトリルはいずれも関東化学製 HPLC 用を、その他の試薬は関東化学製試薬特級を用いた。また、コントロール血清として Flow Lab. 血清を、精製水は逆浸透水を NANOpure Barnstead 純水製造装置で処理したものをを用いた。

3. 装置

1) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)

ポンプ: Altex Model 100A 型および Waters 6000A
または島津 LC-3A

インジェクター: Rheodyne 7120 型または 7125 型

検出器: 島津 SPD 2A 型または島津 UVD 2 型

積分記録計: 島津クロマトパック C-R 2 AX 型または C-R1A

2) 攪拌器: Vortex-Genie K-550-G

3) 遠心分離器: Eppendorf 5412 型

4) フィルター: エキクロディスク (0.45 μm)

II. 定量方法

1. 血漿中 6315-S, HTT および 6315-S oxide の定量法

1) HPLC 条件

(1) 6315-S の定量法 (定量法 A)

カラム: Nucleosil 10C₁₈(M. Nagel)(40mm i.d. × 30 cm)

移動相: 0.005M TBA 含有0.06Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) / アセトニトリル (80/20)

流速: 1.5 ml/min

カラム温度: 室温

検出波長: UV 254 nm

(2) HTT の定量法 (定量法 B)

カラム: Nucleosil 5C₁₈(M. Nagel)(4.6mm i.d. ×

15 cm)

移動相: 0.005M TBA 含有0.06Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) / メタノール (85/15)

流速: 1.0 ml/min

カラム温度: 室温

検出波長: UV 254 nm

(3) 6315-S, HTT および 6315-S oxide の同時定量法 (定量法 C)

カラム: LiChrosorb RP-8 (7 μm)(Merck)(4.0 mm i.d. × 25 cm)

移動相: 0.005 M HDTMA 含有 0.06 M リン酸緩衝液 (pH6.0) / メタノール / アセトニトリル (65/27/8)

流速: 1.0 ml/min

カラム温度: 30°C

検出波長: UV 254 nm

2) 操作

6315-S 標準品および HTT 標準品を精製水に溶かし、前者は 20~1,000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲の 3 点、後者は 5~20 $\mu\text{g/ml}$ の範囲の 3 点濃度の水溶液を調製する。つぎに Flow Lab. 血清またはボランティアのコントロール血漿 0.5ml を遠沈管にとり、それに上記水溶液をそれぞれ 50 μl 添加して標準溶液とする。ただし、定量法 C においては 1 個の遠沈管に両者の水溶液を同時に 50 μl ずつ加えて 3 点濃度の標準溶液を調整する。この標準溶液にそれぞれメタノールを 1 ml 加え、Vortex ミキサーで 5 分間攪拌し、その後 10,000 RPM で 1 分間遠心分離し、そのまま遠沈管を氷冷し、1 時間以内にその上清 10 μl を HPLC に注入する。得られたクロマトグラムの 6315-S または HTT のピーク面積を縦軸に、血漿 1 ml 当りの量を横軸にとって最小二乗法により検量線を作成する。

つぎに、血漿検体 0.5 ml を遠沈管にとり、それに精製水 50 μl (定量法 C では 100 μl) とメタノールと 1 ml を加え、上記と同様に除蛋白を行なって氷冷し、1 時間以内に上清 10 μl を HPLC に注入する。得られたクロマトグラムの 6315-S または HTT のピーク面積より上記検量線によって濃度を算出する。なお、6315-S oxide については定量法 C により定量可能であるが、実検体についてはいずれの場合も測定限界以下であった。

2. 尿中 6315-S, HTT および 6315-S oxide の定量法

1) HPLC 条件

(1) 6315-S と HTT の同時定量法 (定量法 D)

カラム: LiChrosorb RP-18 (7 μm)(Merck)(4.0

mm i.d.×25cm)

移動相：0.005 M HDTMA 含有 0.06 M リン酸緩衝液 (pH6.0) / メタノール / アセトニトリル (68/25/7)

流速：1.0 ml/min

カラム温度：30℃

検出波長：UV 254 nm

(2) 6315-S oxide の定量法 (定量法E)

カラム：RESOLVE 5 μ Spherical C-18 (Waters) (3.9 mm i.d.×15 cm)

移動相：0.005M TBA 含有0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 5.5) / アセトニトリル (87/13)

流速：1.0 ml/min

カラム温度：室温

検出波長：UV 270 nm

2) 操作

6315-S, HTT および 6315-S oxide の標準品を精製水に溶かして、それぞれ 50~500 μ g/ml, 5~20 μ g/ml, および 2~20 μ g/ml の範囲の 3 点濃度の標準水溶液を調製する。これら溶液それぞれ 5 μ l を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのそれぞれのピーク高さ (6315-S oxide はピーク面積) を縦軸に、それぞれの濃度を横軸にとって最小二乗法により検量線を作成する。

つぎに、尿検体はエキクロディスクで濾過し、濾液の 5 μ l を直接 HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのそれぞれのピーク高さ (6315-S oxide はピーク面積) より上記検量線を用いてそれぞれの濃度を算出し、それに尿量を乗じて排泄量を求める。

Ⅲ. 実験結果および考察

1. HPLC

1) 血漿中の 6315-S, HTT および 6315-S oxide の HPLC

血漿中の 6315-S の濃度測定において HPLC に注入する前に、検体を前処理する必要があるが、このものはクロロホルム、エーテルなどの非極性溶媒には極めて難溶であるため通常の溶媒抽出は不能で、除蛋白操作で処理することにした。除蛋白剤としてトリクロロ酢酸や過塩素酸などの強酸を用いると、6315-S が分解する恐れがあるため、有機溶媒を用いることにしたが、エタノールおよびアセトニトリルによる除蛋白を実施したところ、クロマトグラムの 6315-S のピーク形の対称性が不良であった。しかし、メタノールによる除蛋白においては良好なピーク形が得られたため、これを使用するこ

ととした。

つぎに、HPLC の条件設定のため、まず 6315-S のみの定量を目的として検討した結果、尿中の LMOX の定量法¹⁾と同様にイオンペアーダクロマトグラフィーが適していることが分かり、定量法Aの条件を設定した。得られたクロマトグラムは Fig.2-(a)に見られるように 6315-S の溶出時間はほぼ 10 分で、その位置には妨害ピークは見られなかった。この場合、測定限界は S/N が 3 で 0.5 μ g/ml であった。

つぎに、HTT のみの定量を目的として設定した定量法Bにおいては HTT の溶出時間はほぼ 9.5 分で、その位置に妨害ピークは見られず、測定限界は S/N が 3 で 0.5 μ g/ml であった (Fig.2-(b))。

以上の定量法のうち、A法では HTT および 6315-S oxide は溶出が早過ぎ、B法では 6315-S は遅過ぎて、いずれもイソクラチック法では同時定量に適していないことが分かったため、3者の同時定量法を目的として種々検討を行なった結果、移動相に 3 液混合液を使用することにより定量法Cを設定することができた。この条件において 6315-S, HTT および 6315-S oxide の溶出時間はそれぞれほぼ 15 分、10 分、8 分であり、測定限界は S/N が 3 でそれぞれ 0.5 μ g/ml, 0.1 μ g/ml および 0.1 μ g/ml であった。Fig.2-(c)に実際に 6315-S を投与されたボランティア血漿のクロマトグラムを示す。3者の位置には何ら妨害ピークは見られなかった。なお、6315-S oxide はいずれの検体にあっても検出限界以下であった。

以上の 3 方法のうち、6315-S について定量法Aと定量法Cとの比較をボランティア実検体を用いて行なったところ、相関係数 0.9981 (n=23) が得られ、また、HTT について定量法Bと定量法Cとの比較を同様にして行なったところ、相関係数 0.9914 (n=8) が得られ、いずれも良好な相関を示した。したがって大部分の測定には定量法Cが採用されたが、この方法により作成された 6315-S および HTT の検量線は Fig. 3 の例に示すようにいずれも良好な直線が得られた。

つぎに、検量線作成のための標準溶液に Flow Lab. 血清を使用した場合とボランティア血漿を使用した場合の比較を Fig. 4 に示す。これより見て双方に大差なく、検量線用としてどちらを使用してもよいことが分かった。

2) 尿中の 6315-S, HTT および 6315-S oxide の HPLC

尿中の 3 物質の測定法については 2 方法を設定したが、いずれも抽出操作は行なわず、エキクロディスクで

Fig. 2 Typical chromatograms of human plasma containing 6315-S and its metabolites
 (a) for 6315-S by method A ; (b) for HTT by method B ;
 (c) for 6315-S, HTT and 6315-S oxide by method C

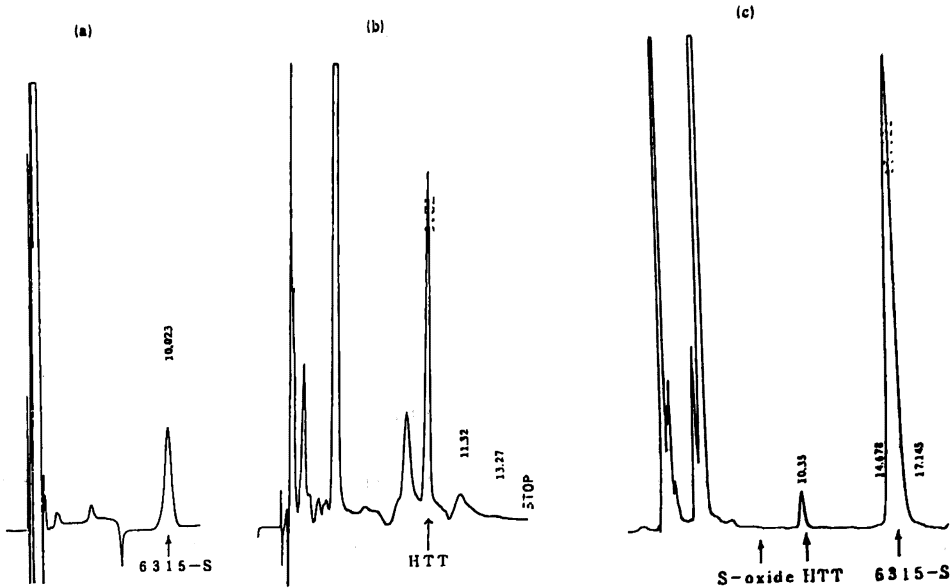
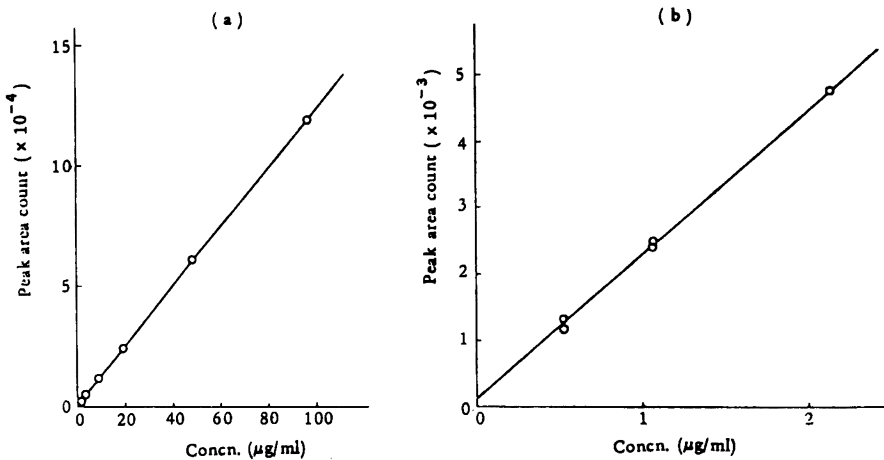


Fig. 3 Calibration curves of 6315-S in human plasma
 (a) for 6315-S ; (b) for HTT

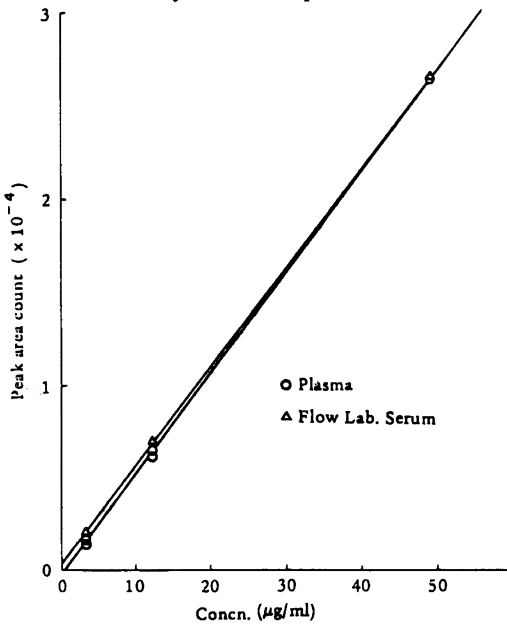


濾過後、直接 HPLC に注入を行なった。

まず、定量法Dにおいて 6315-S と HTT の保持時間はそれぞれほぼ 17 分と 13 分であり、これらのいずれの位置にも妨害ピークは見当らず、また、測定限界は S/N が 3 において前者も後者も 2 µg/ml であった。実際に

6315-S を投与されたボランティアの尿のクロマトグラムを Fig. 5-(a) に示す。なお、この条件において 6315-S oxide の保持時間はほぼ 7 分であり、尿中成分のピークと重なるため、このものについては定量法Dを採用することができない。

Fig. 4 Comparison of calibration curves of 6315-S by Flow Lab. serum and by volunteer plasma



つぎに、定量法Eによる6315-S oxideの保持時間はほぼ7.5分であり、Fig.5-(b)に示すようによく分離したクロマトグラムが得られ、妨害ピークは認められなかった。また、測定限界はS/Nが3において0.5 µg/mlであった。なお、この条件において6315-Sの保持時間はほぼ24分であり定量可能であるが、分析時間が長すぎるため実際にはほとんどこの方法は採用されなかった。

以上の定量法においてはいずれも検量線の作成には標準品の水溶液を分析を行なうごとに調製し、3点検量線を作成したが、Fig. 6の例に見られるようにいずれも良好な直線を示した。実検体において検量線の上限濃度以上の場合は精製水で適宜希釈して再測定を行なった。

2. 試料の安定性

1) 血漿中の6315-Sの安定性

上述の定量法による測定において、血漿中の6315-Sの安定性については微生物学的測定法により-20℃保存で14日まではほぼ安定であることが確かめられているため⁵⁾。実検体の測定においては採血直後遠心分離した血漿は直ちに-20℃で冷凍保存し、14日以内に測定を行なうこととした。

Fig. 5 Typical chromatograms of human urine containing 6315-S and its metabolites

(a) for 6315-S and HTT by method D ; (b) for 6315-S oxide by method E

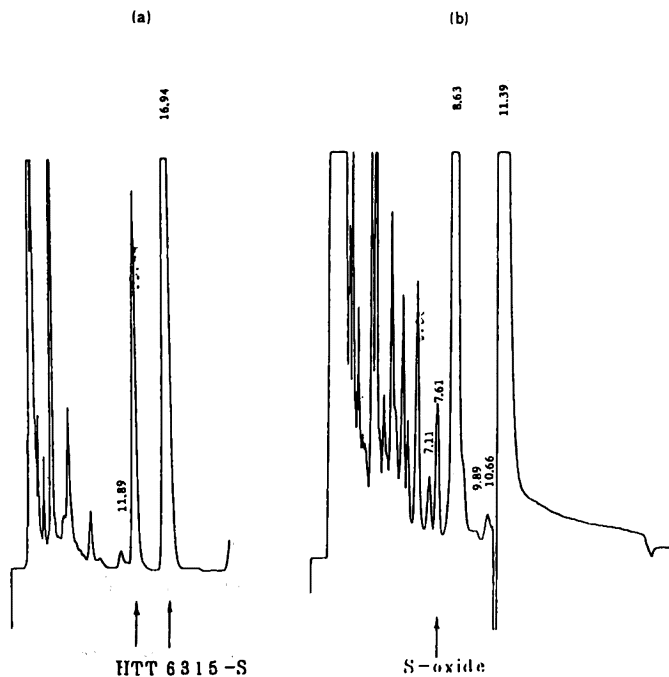


Fig. 6 Calibration curves of 6315-S and its metabolites
(a) for 6315-S ; (b) for HTT ; (c) for 6315-S oxide

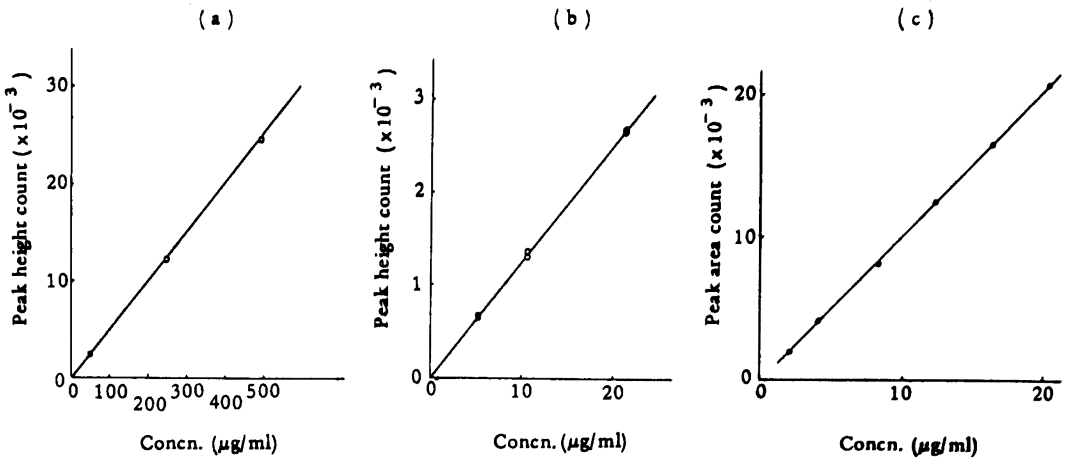


Table 1 Stability of 6315-S in supernatant after protein precipitation

Flow Lab. serum (pH 7.0, 45.5 $\mu\text{g/ml}$)

Temp.	Init.	1 hr	2.5 hr	4 hr
Room temp.	100	91.7	91.5	85.8
2°C	100	98.7	96.9	95.2

Volunteer plasma (pH 7.5, 11 $\mu\text{g/ml}$)

Temp.	Init.	1 hr	2 hr	3 hr	3.5 hr
2°C	100	98.2	96.6	95.0	94.7

Table 2 Stability of 6315-S in human urine at room temperature

	No.1 6315-S 3.33mg/ml	No.2 6315-S 0.33mg/ml
Init.	100	100
1 hr	99.99	99.40
2 hr	99.91	99.65
3 hr	99.52	99.19
4 hr	99.65	99.23
5 hr	98.14	98.86

* Urine pH 6.0

つぎに、血漿の除蛋白後の上清中の 6315-S の安定性を見るため、Flow Lab. 血清およびボランティア血漿の上清について、室温および氷冷下における 6315-S の経時変化を定量法 A により測定した結果、Table 1 に示すように両者に大差なく、いずれの場合も氷冷下 1 時間以内に HPLC に注入することにした。なお、水-メタノール混液 (1:2) 中では氷冷下 6 時間後 98.4% の残存率であった。また、Flow Lab. 血清に 6315-S を添加した 50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の試料を直ちに除蛋白したものと室温で 1 時間放置して除蛋白したものとを比較したところ、後者は前者の約 98% で大差なかった。なお、この場合の回収率はほぼ定量的であった。

2) 尿中の 6315-S および 6315-S oxide の安定性
尿中における 6315-S の安定性に関し、-20°C 凍結尿

については微生物学的測定法により約 14 日間は安定であることが認められたため⁵⁾、この期間内に測定を行なうことにしたが、解凍後、室温における安定性を見るため、2 種類の濃度の尿試料を調製し、6315-S の残存率を追跡したところ、Table 2 に示されているように 4 時間までは 1% 以内の分解率であるが、5 時間になると 1% を越すようになる。したがって検体は解凍後、氷冷下に置き、なるべく早く処理することにした。

なお、尿中および水中の 6315-S oxide の安定性についても定量法 E により検討した結果、氷冷下では水中、尿中いずれの場合も少なくとも 10 時間は変化なく、室温においては 10 時間後、残存率は水中で約 95%、尿中で約 91% であった。したがって試料は解凍後氷冷下に置き、なるべく早く処理することにした。

3. HPLC と微生物学的測定法との比較³⁾

上述の方法により第1相試験におけるボランティアの血漿中と尿中の6315-Sの濃度の測定を行なったが³⁾。同時に行なった微生物学的測定法との相関を求めたところ、血漿に関し、 $Y=0.97+0.90X$ (Y: HPLC, $\mu\text{g/ml}$, X: bioassay, $\mu\text{g/ml}$, $r=0.964$, $n=414$) を得、良好な相関が見られた。また、尿中に関しても $Y=52.5+1.01X$ (Y: HPLC, $\mu\text{g/ml}$, X: bioassay, $\mu\text{g/ml}$, $r=0.985$, $n=603$) となり、良好な相関が得られた。

(実験期間 1983年6月~9月)

文 献

- 1) TSUJI, T ; Y. SATOH, M. NARISADA, Y. HAMASHIMA & T. YOSHIDA : Synthesis and antibacterial activity of 6315-S, a new member of the oxacephem antibiotic. *J. Antibiot.* 38 (4) : 466~476, 1985
- 2) 木村靖雄, 中清水 弘, 中野雅夫, 大坪 龍, 松原尚志, 吉田 正 : Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の各種動物における体内動態。 *Chemotherapy* 35 (S-1) : 161~175, 1987
- 3) 溝尻顯爾, 岡部 博, 田中日出男, 菅野浩一 : 6315-S (Flomoxef) のラットにおける体内動態 (第1報) ¹⁴C-6315-S の静脈内投与後の血中濃度, 尿, 糞, 胆汁中排泄および全身オートラジオグラフィ。 *Chemotherapy* 35 (S-1) : 176~186, 1987
- 4) KONAKA R. ; K. KURUMA ; R. NISHIMURA, Y. KIMURA & T. YOSHIDA : High-performance liquid chromatographic analysis of a new- β -lactam antibiotic, 6059-S (MOXALACTAM). *J. Chromatography.* 225 : 169~178, 1981
- 5) 木村靖雄, 中野雅夫, 吉田 正 : 微生物学的定量法による Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の体液内濃度測定法に関する検討。 *Chemotherapy* 35 (S-1) : 129~136, 1987
- 6) 安永幸二郎, 岡本綾子, 前原敬悟, 間瀬勘史, 飯田 夕, 吉岡 宗ほか : 6315-S (Flomoxef) の臨床第一相試験。 *Chemotherapy* 35 (S-1) : 494~517, 1987

ASSAYS OF 6315-S (FLOMOXEF)
AND ITS METABOLITES IN BODY FLUIDS
BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

RYUSEI KONAKA, HIROSHI HASHIMOTO, RIEKO NISHIMURA,
KAZUO KURUMA and KAZUMASA HIRAUCHI
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

We performed three assays for individual determination of 6315-S (flomoxef) and its metabolite, 1-(2-hydroxyethyl)-1*H*-tetrazole-5-thiol (HTT), and simultaneous determination of 6315-S, HTT and another metabolite, 6315-S oxide, in human plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC).

In each method, after protein precipitation with methanol, the clear supernatant was stored in an ice bath and then placed on HPLC within 1 h. Well resolved chromatograms without superposition of any endogenous components were obtained. Detection limits of 6315-S, HTT and 6315-S oxide were 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ plasma, respectively. Correlations between the individual assays and a simultaneous assay of 6315-S and HTT were satisfactory, and excellent linear calibration curves were obtained for both compounds. Concentrations of 6315-S oxide in plasma from volunteers to whom 6315-S had been administered were below the detection limit.

We also carried out two assays for simultaneous determination of 6315-S and HTT, and individual determination of 6315-S oxide in human urine.

In each method, after defreezing, the urine samples were stored in an ice bath until filtered and placed on HPLC within 4 h. Thoroughly resolved chromatograms were obtained in both assays. Detection limits of 6315-S, HTT and 6315-S oxide were 2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ urine, respectively. Good linear calibration curves were obtained for those also.