

TE-031 の体内濃度測定法に関する研究 (第3報)

HPLC 法による体内代謝物濃度の測定

大竹 盾夫・小 椋 薫・岩立 周子・諏訪 俊男

大正製薬株式会社総合研究所*

(昭和63年7月26日受付)

ヒト血清, 尿, 糞中の TE-031 および代謝物 (M-1, M-4, M-5, M-6, M-7) の濃度測定法を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により検討し次の結果を得た。TE-031, M-4, M-5, M-6, M-7 は電気化学検出器 (ECD) 付き HPLC 法で, M-1 は 7-nitrobenzofurazan 誘導体として蛍光検出器付き HPLC 法で測定法を確立した。TE-031 および各代謝物の検量線は良好な直線性を示し, 各 HPLC 法の測定感度は, TE-031 および各代謝物のいずれも血清では 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, 尿および糞ホモジネートでは 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。

Key words: TE-031, 代謝物, HPLC 分析, 体内濃度

TE-031 (6-O-methylerythromycin A) は新規マクロライド系抗生物質である。ヒトに TE-031 を経口投与後の尿中には未変化体の他に代謝物として *N*-demethyl TE-031 (M-1), decladinosyl TE-031 (M-4), (14*R*)-14-hydroxy TE-031 (M-5), (14*S*)-14-hydroxy TE-031 (M-6), 構造未定の代謝物 (M-7), decladinosyl-(14*R*)-14-hydroxy TE-031 (M-8) が見出されている¹⁾。これらの代謝物のうち, TE-031 とほぼ同等の抗菌活性を有する²⁾ 主代謝物 M-5 と TE-031 の HPLC 法による同時定量法については前報で報告した³⁾。

今回, TE-031 および M-5 に加えて M-1, M-4, M-6, M-7 のヒト体液 (血清, 尿, 糞) 中濃度測定法を HPLC 法で確立したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬物および試薬

TE-031 および各代謝物 (Fig. 1) は大正製薬株式会社総合研究所で調製した。代謝物のうち M-5, M-6, M-7 はヒトに TE-031 を投与後の尿より単離精製し標品として用いた。

内部標準物質 (I.S.) は TE-031 および M-4, M-5, M-6, M-7 測定用として erythromycin B (Abbott 社製) を M-1 測定用としては erythromycin B より *N*-demethyl-6-O-methylerythromycin B を合成して用いた。

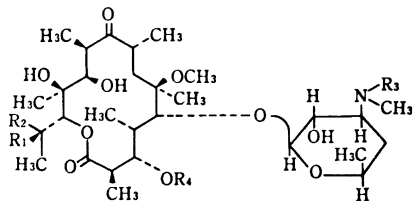
酢酸エチルは 残留農薬試験用, ヘキサンは 蛍光分析

用, アセトニトリルおよびメタノールは液体クロマトグラフ用, 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) は同仁化学製, その他試薬はすべて試薬特級を用いた。

2. HPLC 測定条件

1) TE-031 および M-4, M-5, M-6, M-7

HPLC は LC-6A 型 (島津製作所) を用い, カラムは NUCLEOSIL C 18 5 μm , 4 mm i. d. \times 150 mm (センチュウ科学バックドカラム), カラム温度 35°C, ECD は



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
TE-031	H	H	Me	cladinose
M-1	H	H	H	cladinose
M-4	H	H	Me	H
M-5	OH	H	Me	cladinose
M-6	H	OH	Me	cladinose
M-7	unidentified			

Fig. 1. Structures of TE-031 and its metabolites

Coulochem 5100 A 型 (Environmental Sciences Associates) を使用し、電位は analytical cell 5010 型 cell I 0.65 V, cell II 0.90 V, guard cell 5020 型 0.95 V に設定し cell II で検出した。

移動相はアセトニトリル/0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5)/メタノール (35:52:13) を用い、流速は 0.7 ml/min とした。なお、移動相の有機溶媒は 0.5 μ m、緩衝液は 0.22 μ m のメンブランフィルターをあらかじめ通過させたものを混合して使用した。

2) M-1

HPLC は 638 型 (日立製作所) を使用し、カラムは COSMOSIL C 8 5 μ m, 4.6 mm, i. d. \times 150 mm (半井化学バックドカラム), カラム温度 40°C, 検出器は 650-40 型蛍光分光光度計 (日立製作所) Em: 470 nm, Ex: 530 nm, 移動相はアセトニトリル/精製水/リン酸を、血清中濃度測定用として (520:480:1), 尿および糞中濃度測定用として (600:400:1) の比率で混合した。流速は血清, 尿および糞のいずれも 1.2 ml/min とした。

3) 記録計

各 HPLC 法の記録計はクロマトデータシステム 86 (日本クロマト工業) を接続した PC-9801 Vm 型パーソ

ナルコンピュータ (日本電気) により記録した。

3. 前処理

1) 検体の調製

血清は肘静脈より採血し 3,000 rpm, 20 分の遠心分離後, 上清を分取した。尿は自然排泄したものを、

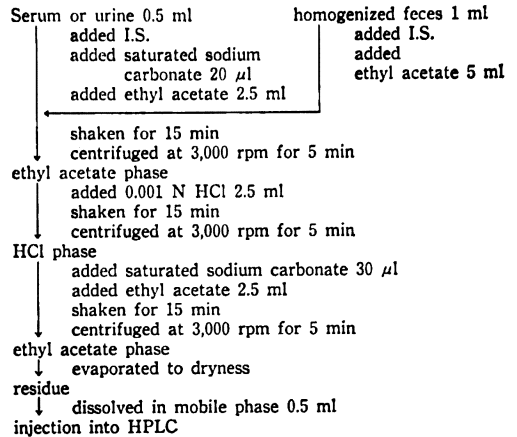


Chart 1. Pretreatment method for TE-031 and M-4, 5, 6, 7 in serum, urine and feces

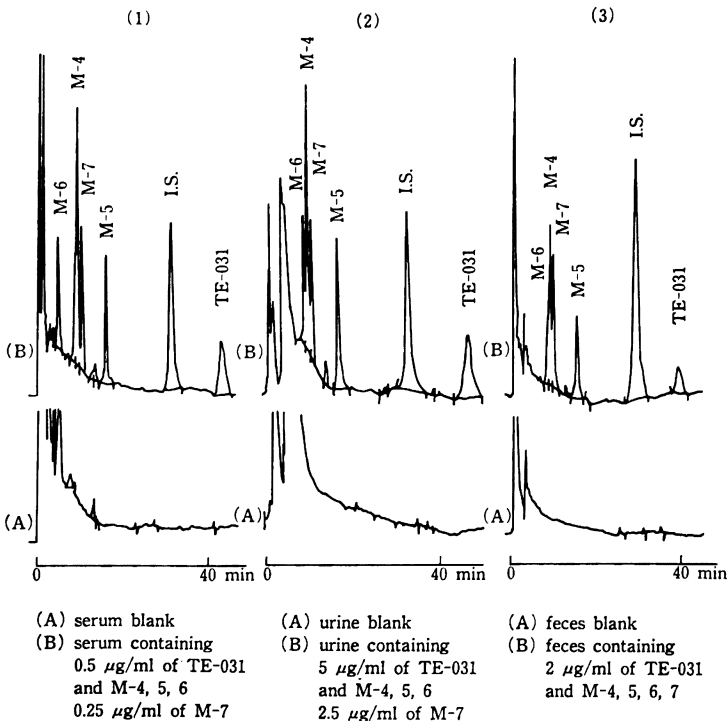


Fig. 2. Chromatograms of TE-031 and M-4, 5, 6, 7 in human serum (1), urine (2) and feces (3)

糞は約4倍量の50 mM トリス緩衝液 (pH 8.4) を加え、ミキサーで5分間均質化し糞ホモジネートとした。

血清、尿、糞ホモジネートは検討に供するまで -20 °C で保存した。

2) 前処理法および検量線の作成

ヒト血清または尿 0.5 ml, 糞ホモジネート 1 ml に TE-031 または各代謝物の標準溶液および I.S. の標準溶液を加え、Chart 1 または Chart 2 に従って処理し HPLC に注入した。

検量線は得られた I.S. とのピーク高さ比より作成した。

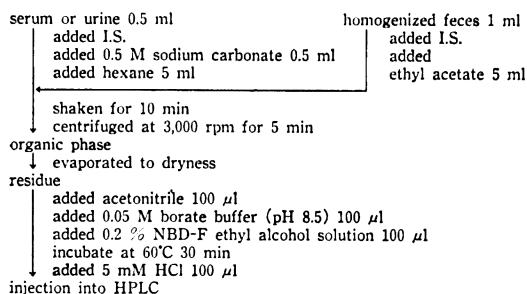


Chart 2. Pretreatment method for M-1 in serum, urine and feces

II. 結 果

1. HPLC クロマトグラム

1) TE-031 および M-4, M-5, M-6, M-7

ヒト血清、尿または糞ホモジネートに TE-031, M-4, M-5, M-6, M-7 および I.S. の一定量を添加し、Chart 1 に従い処理した HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示す。

M-6, M-4, M-7 の分離はやや不十分であったが、M-5, I.S. および TE-031 は良好に分離し、M-6, M-4, M-7, M-5, I.S., TE-031 の順で溶出した。

保持時間はそれぞれ約 9.0, 9.5, 10.5, 15, 29, 42 分であり、血清、尿、糞に由来する生体成分の各ピークへの妨害はほとんど認められなかった。

2) M-1

ヒト血清、尿または糞ホモジネートに M-1 および I.S. の一定量を添加し、Chart 2 に従いヘキサン (血清および尿)、酢酸エチル (糞) 抽出後、NBD-F で NBD 誘導体化したクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

各クロマトグラムとも M-1 および I.S. の分離は良好であり、血清、尿、糞に由来する生体成分の各ピークへの妨害もほとんど認められなかった。M-1 および I.S. の保持時間は血清でそれぞれ約 22 分および約 30 分、尿、糞では約 10 分および約 12 分であった。

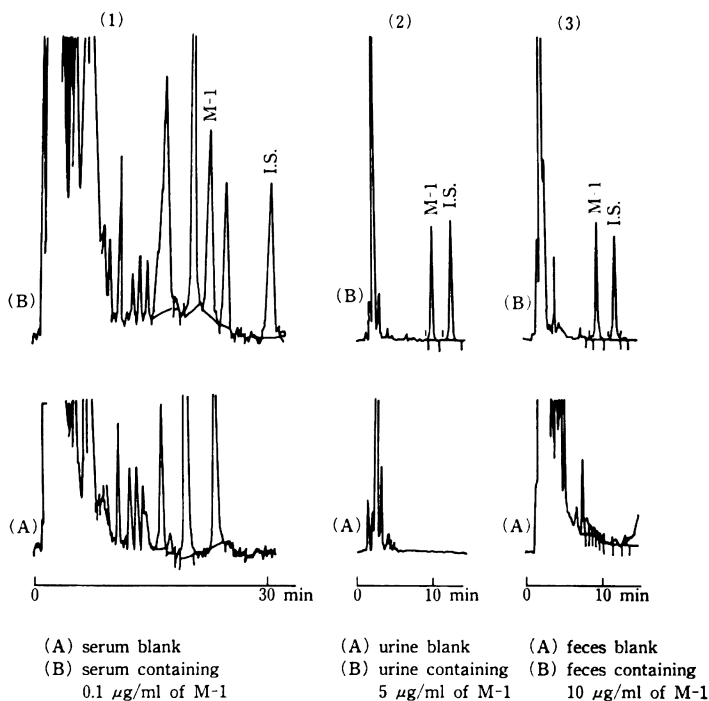


Fig. 3. Chromatograms of M-1 in human serum (1), urine (2) and feces (3)

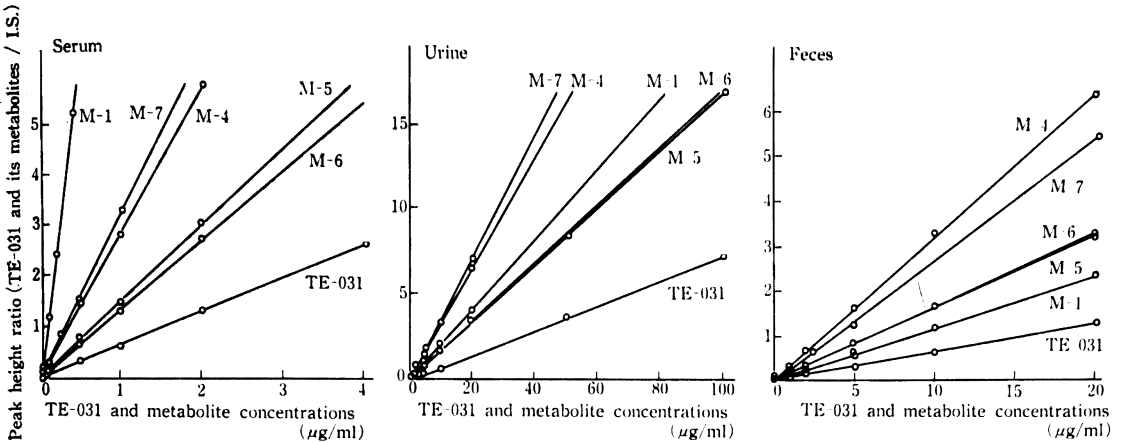


Fig. 4. Calibration curves of TE-031 and its metabolites in human serum, urine and feces

2. 検量線

既知濃度の TE-031 および各代謝物を血清, 尿および糞ホモジネートに添加後, 前処理操作を行なった後 HPLC で測定し求めた検量線を Fig. 4 に示す。

血清では TE-031 で 0.05~4.0, M-4, M-5, M-6 で 0.05~2.0, M-7 で 0.05~1.0, M-1 で 0.01~0.4 µg/ml, 尿では TE-031 で 1~100, M-5 で 0.5~100, M-1, M-4, M-6, M-7 で 0.5~20 µg/ml, 糞ホモジネートでは TE-031 および各代謝物とも 1~20 µg/ml の範囲で良好な直線が得られた。

また, 変動係数も低濃度を除き 10% 以下の再現性を示した。

III. 考察

新規マクロライド系抗生物質 TE-031 および活性主代謝物 M-5 の同時定量法については前報⁹⁾で報告したが, 今回その他の代謝物の定量法を血清, 尿, 糞について検討した。

なお, 先に安達ら¹⁾が行なったヒト尿中代謝物の検討では, 動物では比較的多く認められた⁴⁾ *N,N*-didemethyl TE-031 (M-2), TE-031 *N*-oxide (M-3) は検出されず, また, M-8 は極めて微量であり, 標品として用いる量を得ることが困難であったため測定の対象より除外した。

TE-031 および M-4, M-5, M-6, M-7 は電気化学的に活性であり, 前報の HPLC-ECD 法の条件で, 移動相の組成比, カラム温度を若干変更することにより, それぞれの分離定量が可能であった。

今回, 確立した条件において M-4, M-6, M-7 の分離はやや不十分であった。これら 3 種の代謝物の分離は移動相中の有機溶媒の組成比率を減少させることにより良好に分離することが判明したが, 有機溶媒を減少させ

ると TE-031 の保持時間の遅延および測定感度の低下が認められた。また, M-4, M-6, M-7 と TE-031, M-5 の分別定量は, HPLC への注入を二度行なうことになり, 同一クロマトグラム上での比較ができず, さらに HPLC 条件の変更によるベースラインの安定性等の問題点がある。

以上のことから電気化学的活性物質の TE-031, M-4, M-5, M-6, M-7 の分離定量法として測定感度および同時定量性に重点をおき, 今回の測定条件を設定した。

この測定条件下における TE-031 および M-4, M-5, M-6, M-7 の検出感度は, 血清では 0.05 µg/ml, 尿では TE-031 は 1 µg/ml, M-4, M-5, M-6, M-7 で 0.5 µg/ml, 糞ホモジネートでは 1 µg/ml であった。

M-1 は TE-031 の脱 methyl 体であるが, ECD による電気化学的活性が弱いことからエリスロマイシン系化合物の電気化学的活性部位は *N*-dimethyl 基に基づくものと考えられる。このため M-1 を TE-031 および M-4, M-5, M-6, M-7 と同時定量することは困難であり, 別途誘導体化による定量法の検討を行なった。

誘導体化試薬として M-1 が 2 級アミンであることに着目しアミンの誘導体化試薬を検討した結果, WATANABE ら¹¹⁾のアミノ酸の高感度分析に用いている NBD-F による NBD 誘導体化を行なった後, HPLC で分離し蛍光検出する方法が反応の簡便さ, 生体成分との分離, 検出感度のいずれにおいても満足するものであった。

この NBD 誘導体化法による M-1 の検出感度は血清, 尿および糞ホモジネートでそれぞれ 0.01, 0.5 および 1.0 µg/ml であった。

今回, 確立した HPLC-ECD 法による TE-031, M-4, M-5, M-6, M-7 および NBD 誘導体化法による

M-1 の HPLC-蛍光検出法は、TE-031 の体内動態を評価する上で簡便かつ有効な測定法であると考えられた。

文 献

- 1) 安達 孝, 森本繁夫, 渡辺慶昭, 曾田 馨: TE-031 のヒト尿中代謝物の単離同定。Chemotherapy 36 (S-3): 264~273, 1988
- 2) 長手尊俊, 小野武夫, 杉田和彦, 明石 敏, 森川悦子, 宮崎真奈美, 竹市千恵, 大村真文: TE-031 のヒト主要代謝物 M-5 の抗菌作用について。Chemotherapy 36 (S-3): 156~169, 1988
- 3) 大竹庸夫, 小椋 薫, 岩立周子, 諏訪俊男: TE-

031 の体液内濃度測定法に関する研究 (第 2 報), HPLC 法による体液内濃度測定。Chemotherapy 36 (S-3): 192~197, 1988

- 4) 諏訪俊男, 吉田英生, 吉富幸代, 亀井慶子: TE-031 の体内動態 (第 4 報), ラットおよびイヌにおける ^{14}C -TE-031 の代謝。Chemotherapy 36 (S-3): 227~237, 1988
- 5) WATANABE Y, IMAI K: High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazole. Anal Biochem 116: 471~472, 1981

ASSAY METHOD FOR TE-031 (A-56268) IN BODY FLUIDS (III)

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY METHOD FOR TE-031 AND ITS METABOLITES

TATEO OHTAKE, KAORU OGURA, CHIKAKO IWATATE and TOSHIO SUWA

Research Center, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd.,
1-403 Yoshinocho, Ohmiya, Saitama 330, Japan

A quantitative analysis of TE-031 (A-56268) and its metabolites in serum, urine and feces was established by high performance liquid chromatography (HPLC) with an electrochemical detector (for TE-031, M-4, M-5, M-6 and M-7) and a fluorescence detector (for the NBD-F derivative of M-1).

The detection limit of TE-031 and its metabolites in serum, urine and homogenized feces was below 0.05, 1.0 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Good linear calibration curves were also obtained for these metabolites.