

## 高速液体クロマトグラフィーによる CS-807の体内濃度測定法

関根 実・笹原邦宏・市川正人

三共株式会社 第一生産技術研究所

新経口セフェム剤 CS-807の抗菌活性体である R-3763の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による体内濃度測定法ならびに体液中での安定性について検討を加え、次の結果を得た。

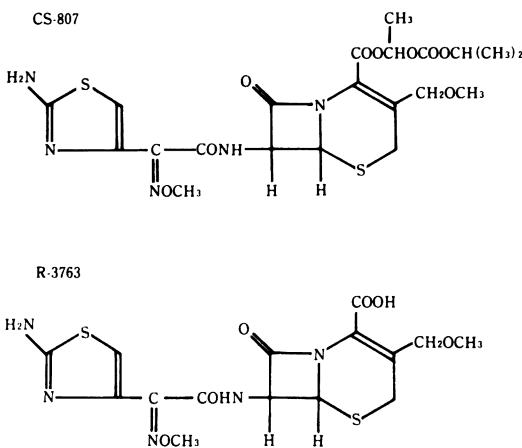
1) ヒト血清および尿中 R-3763濃度測定のために設定した本 HPLC 法は、迅速かつ簡単で、本法の測定精度、回収率及び検量線の直線性は良好であった。本法の血清中ならびに尿中の測定限界は、それぞれ0.1及び1.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2) ヒト血清ならびに尿中の R-3763は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存すれば、少なくとも血清中では14日間、尿中では21日間安定であった。

3) 第 I 相試験で CS-807を投与後に採取した血清および尿中の R-3763濃度を本 HPLC 法と Bioassay 法でそれぞれ測定した結果、両測定法間に高い相関関係が認められた。

CS-807は、三共株式会社・化学研究所で合成されたエステル型新経口セフェム剤<sup>1)</sup>、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、広い抗菌活性を持つ親化合物 R-3763になり、体内に移行するプロドラッグである。(Fig. 1)

Fig. 1 Chemical structure of CS-807 and R-3763



本法では、CS-807の生体内挙動を研究するために、R-3763の HPLC 法による体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

R-3763ならびに Cefmetazole sodium (CMZ) は三共株式会社で合成されたものを使用し、濃度はすべて力価で表示した。

#### 2. 試薬および試料

##### (1) 試薬

水は脱イオン後蒸留したものを、アセトニトリル、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) 試料

検量線作製用試料 — 血清および尿は健康成人男子より採取した。

Bioassay 法との対比用試料 — 第 I 相試験<sup>2)</sup>での CS-807を服用した被験者から採取した血清および尿を使用した。

#### 3. 高速液体クロマトグラフ装置

高速液体クロマトグラフは島津高速液体クロマトグラフ LC-6A システム、つまりポンプ：島津製 LC-6A 型、オートサンプラー：島津製 SIL-6A 型、紫外外部波長可変検出器：島津製 SPD-6A 型、データ処理装置：島津製 CR-3A 型を使用した。

#### 4. 前処理

##### (1) 血清および血漿

0.1mlの試料に 1/15M リン酸緩衝液 (pH6.4) 0.1

ml, 内部標準物質 CMZ 溶液  $20\mu\text{g/ml}$ , 1/15M リン酸緩衝液 (pH6.4) を加えよく混合した。これに 6% トリクロロ酢酸/メタノール溶液を  $0.1\text{ml}$  添加し, Vortex mixer でよく混和後, 10分間氷冷中で放置し, その後  $3,000\text{rpm}$  で10分間遠心分離した。上清  $10\sim 20\mu\text{l}$  を HPLC に注入し, ピーク高比による内部標準検量線法で測定した。

## (2) 尿

ヒト尿を 1/15M リン酸緩衝液 (pH6.4) で適宜希釈後,  $10\sim 20\mu\text{l}$  注入しピーク高さによる絶対検量線法で測定した。

## 5. HPLC の測定条件

血清および尿試料についての HPLC の測定条件を Table 1 に示す。なお, 血清および尿試料を測定する場合, 測定障害ピークが同一保持時間に出現した時には, 移動相の組成比を変化させることにより解決できる。

## 6. Bioassay 法による測定

血清中および尿中の R-3763 の微生物学的測定法は, 試験菌として *Escherichia coli* NIHJ を用いる二層カップ法, または薄層ディスク法で, その概要を Table 2 に示す。

## 7. 体液中の R-3763 の安定性

既知濃度の R-3763 をヒトの血清および尿に添加し,

デープリーザー ( $-20^\circ\text{C}$ ) に保存し, 経時的に残存 R-3763 を HPLC により測定した。

## II. 結 果

### 1. クロマトグラフィー

ヒト血清および尿に R-3763 を添加した時のクロマトグラムを Fig. 2, Fig. 3 にそれぞれ示す。R-3763 と生体成分由来の定量障害ピークとの分離は良好であった。

### 2. 検量線

ヒト血清 ( $1.0\text{ml}$ ) に R-3763 を  $0.625\sim 20\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように添加しよく混和後, 本測定法に従って操作した時, 原点を通るきわめて良好な直線性を示した (Fig. 4)。同様に, ヒト尿 ( $1.0\text{ml}$ ) に R-3763 を  $6.25\sim 100\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように添加しよく混和後, 本測定法に従って操作した時は, 原点を通るきわめて良好な直線性を示した (Fig. 5)。

### 3. 精度

ヒト血清 ( $1.0\text{ml}$ ) に R-3763 を  $2.5\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように添加した試料を 5 本作製し, 本測定法に従って操作した時に観察された精度は, 低い変動係数を示し, 本測定法は血中濃度を測定するのに十分満足するものである (Table 3)。同様に, ヒト尿 ( $1.0\text{ml}$ ) に R-3763 を  $25\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように添加した試料を 5 本作製し, 本測定法に従って操作した時に観察された精

Table 1 HPLC conditions

Specimen	(Serum (Plasma))	Urine
Column	ERC-ODS-1161 <sup>1)</sup>	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> <sup>2)</sup>
Mobile phase	CH <sub>3</sub> CN : 0.03% CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> = 7 : 93	CH <sub>3</sub> OH : 0.03% CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> = 10 : 90
Flow rate	1.0 ml/min	1.0 ml/min
Sensitivity	0.04-0.02 AUFS	0.16 AUFS
Detector	254 nm	254 nm
Injection	10-20 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Retention time	5.4 min for R-3763 10.8 min for I.S.	15.2 min for R-3763
Internal standard (I.S.)	CMZ	-
Chart speed	2.5 mm/min	2.5 mm/min

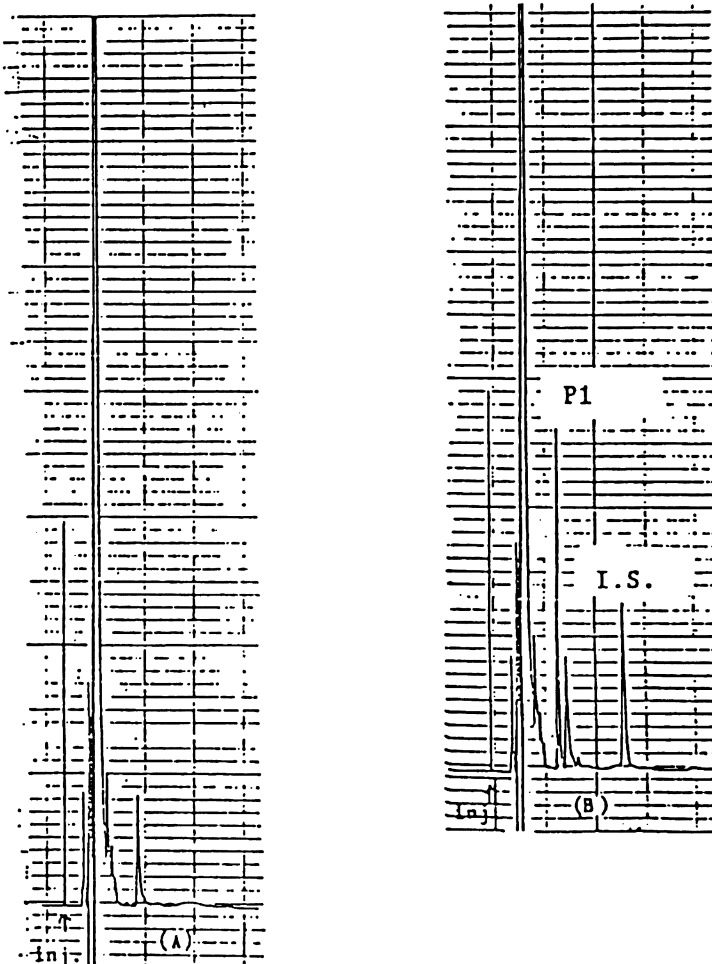
1) Erma Optical Co., Ltd.

2) Waters Associates 社

Table 2 Selective medium and cultivation conditions

Test organism	<i>Escherichia coli</i> NIHJ
Medium	Nutrient agar (pH 6.8), Difco
Inoculum size	10 <sup>7</sup> cells/ml medium
A series of the standard solutions	Serum: fresh human serum Urine: 1% phosphate buffer (pH 6.0)
Method	Two-layer cup method: base layer 20 ml seed layer 4 ml Thin-layer disk method: seed layer 8 ml (disk: $\phi$ 6 mm)
Culture conditions	37°C/18-24 h.

Fig. 2 Chromatograms of R-3763 spiked in human serum



(A) control serum (B) control serum spiked with R-3763 (P1) and CMZ (I.S.)

Fig. 3 Chromatograms of R-3763 spiked in human urine

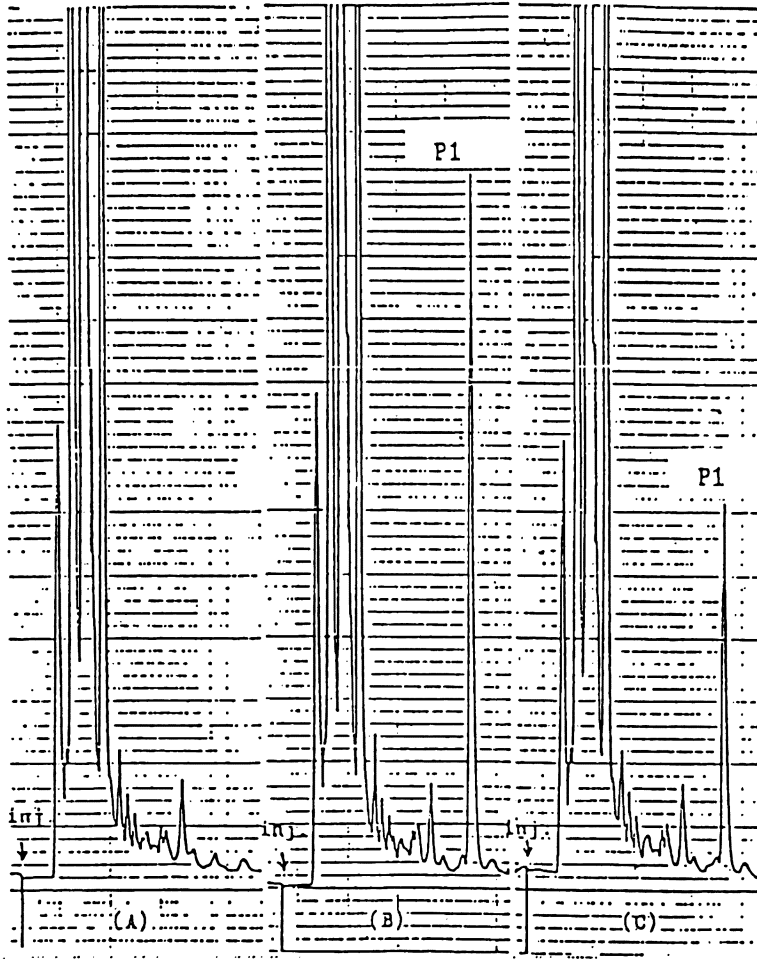
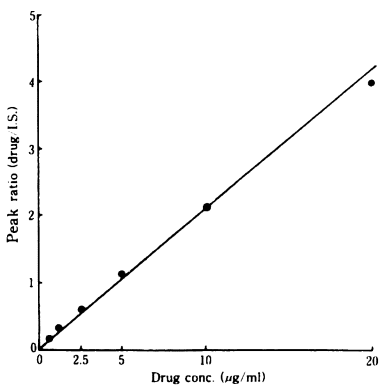
(A) control urine (B) control urine spiked with 100  $\mu\text{g/ml}$  of R-3763 (P1) (C) control urine spiked with 50  $\mu\text{g/ml}$  of R-3763

Fig. 4 A typical calibration curve of R-3763 in human serum



度は、低い変動係数を示し、本測定法は尿中濃度を測定するのに十分満足するものである (Table 3)。

#### 4. 測定限界

ヒト血清中の R-3763濃度測定の限界は、添加回収の再現性を考慮して  $0.1\mu\text{g/ml}$  と推定された。ヒト尿中の R-3763の測定限界は、希釈倍数と生体由来の測定障害ピークの出現を考慮して  $1.0\mu\text{g/ml}$  と推定された。

#### 5. HPLC法と Bioassay法との比較

CS-807を健康成人男子に単回経口投与し、投与後採取した血清および尿中の R-3763濃度をそれぞれ HPLC法および *E. coli* NIHJ株を試験菌とする Bioassay法により測定し、両測定法の相関を検討した。その結果、血清 (Fig.6) および尿 (Fig.7) と両測定

Fig. 5 A typical calibration curve of R-3763 in human urine

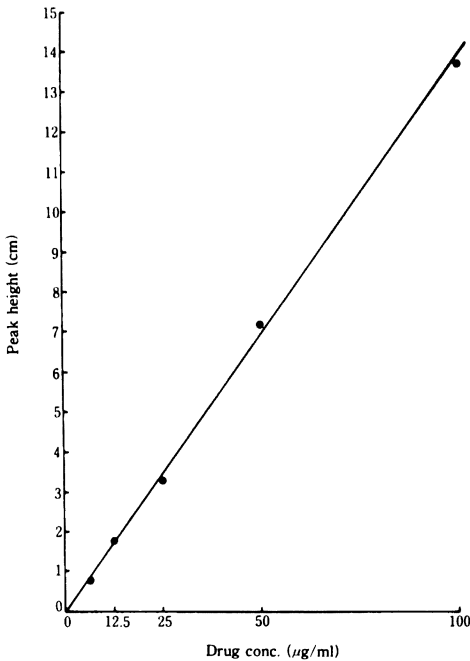
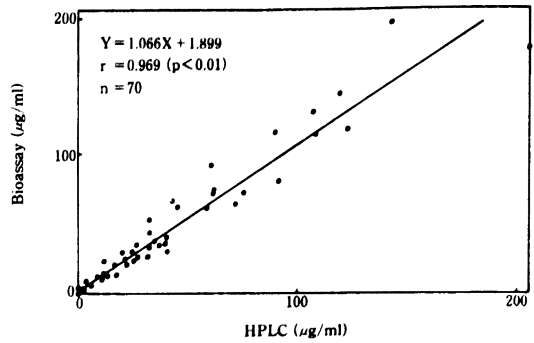


Fig. 7 Relationship between urinary concentrations measured by HPLC and bioassay method



法は 1 : 1 に対応し、良好な相関関係のあることが確認された。

6. 体液中の R-3763 の安定性

ヒト血清および尿に R-3763 を添加し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した時の経時安定性を検討した。その結果、血清では少なくとも 14 日目まで、尿では少なくとも 21 日目まで R-3763 の分解は認められず、安定であった (Fig. 8)。

Table 3 Precision of R-3763 determination<sup>1)</sup>

Specimen	R-3763 conc. added (μg/ml)	Mean conc. (μg/ml)	Variation coefficient (%)
Serum	2.5	2.4 ± 0.2 <sup>2)</sup>	6.4
Urine	25.0	24.8 ± 0.4	1.6

1) Values represent five determinations at each specimen.

2) Mean ± standard deviation.

Fig. 6 Relationship between serum concentrations measured by HPLC and bioassay method

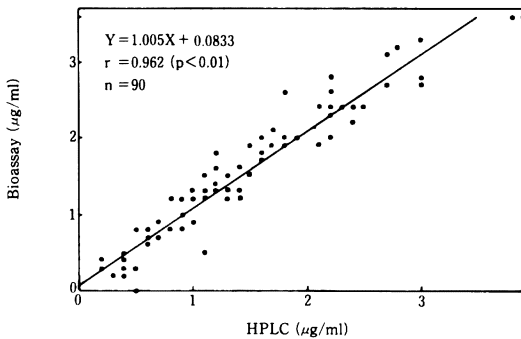
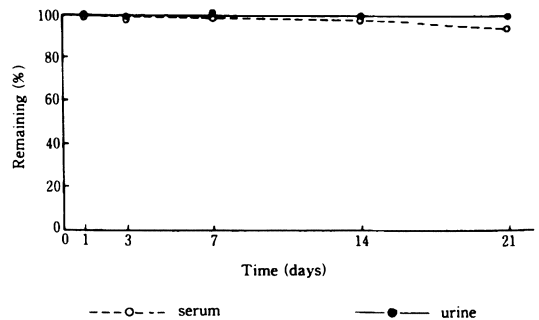


Fig. 8 Stability of R-3763 in human serum and urine at  $-20^{\circ}\text{C}$



### III. 考 察

CS-807の体内動態を研究するために、操作性の優れた HPLC 法による微量体液内濃度測定法を確立した。本法は、良好な直線性と優れた定量精度をもち、しかも Bioassay 法とも 1 : 1 で高い相関性を示すことから、基礎研究のためのみならず広く臨床におけるドラッグモニタリングの測定法としても有用であると考えられる。特に後者において、他の抗生物質が併用投与された患者の試料でも、その特異性の高さから定量障害なく測定できうる。

血清、血漿および尿における安定性についての検討結果より、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で保存すれば血液に関しては少な

くとも14日間、尿については少なくとも21日間は安定であることが確認された。

### 文 献

- 1) FUJIMOTO, K., ISHIHARA, S., YANAGISAWA, H., IDE J., NAKAYAMA, E., NAKAO H., SUGAWARA, S. and IWATA, M. : Studies on orally active cephalosporin esters. *J. Antibiotics XL* : (3) 370~384, 1987
- 2) 小林真一, 小口勝司, 内田英二, 安原一, 坂本浩二, 関根実, 笹原邦宏 : 新しい経口用セファロsporin系抗生剤 CS-807の臨床第 I 相試験. *Chemotherapy* 36 (S-1) : 200~214, 1988

## HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINING THE CS-807 CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

MINORU SEKINE, KUNIHIRO SASAHARA and MASATO ICHIKAWA

Product Development Laboratories, Sankyo Co. Ltd., Tokyo

The following results were obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) of R-3763, the active metabolite of CS-807, in human serum and urine.

- 1) We devised a fast, specific and sensitive HPLC method for determining R-3763 in human serum and urine. Deproteinized serum or diluted urine was directly injected into a reverse-phase column.
- 2) By our HPLC method, R-3763 was efficiently separated without interference from human serum and urine components ; good linear calibration curves were obtained.
- 3) Our HPLC method provided a high degree of accuracy, the determination limit in human serum and urine being  $0.1\mu\text{g/ml}$  and  $1.0\mu\text{g/ml}$ .
- 4) R-3763 concentrations in serum and urine samples collected from healthy male volunteers following CS-807 administration in Phase I studies was determined by HPLC and bioassay. A good correlation was observed between the results.
- 5) R-3763 was stable for at least 14 days in human serum and 21 days in human urine when stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .