

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

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

電気化学検出器(ECD)を用いた高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により、ヒト血清、唾液、尿中 TE-031および活性主代謝物 M-5の同時測定法について検討し、次の結果を得た。

ヒト血清、唾液、尿中の TE-031、M-5および内部標準(Erythromycin B)は本 HPLC 法で生体成分とよく分離し、いずれも良好な直線性を示す検量線が得られた。本 HPLC 法の検出限界は TE-031、M-5とも、血清、唾液で0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、尿で1.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。

TE-031投与後の血清、唾液、尿中濃度を HPLC 法および bioassay 法で測定した結果、両測定法間には高い相関性が認められた(相関係数: >0.966)。

TE-031(6-O-methylerythromycin A)は新規の半合成マクロライド系抗生物質である。ヒトに TE-031を経口投与後の血清中濃度および尿中排泄に関してはすでに bioassay 法による検討がなされているが¹⁾、採取した尿について代謝物を検索した結果、主代謝物として(14R)-14-hydroxy TE-031(M-5)が見出された²⁾。M-5は TE-031とほぼ同等の抗菌活性を有する活性代謝物であり³⁾、本剤の治療効果には未変化体のみならず M-5も大きく寄与するものと推察される。そこで今回、TE-031のヒトにおける体内動態試験の実施にあたり、体液中の未変化 TE-031および M-5を分離、定量するため高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による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. 使用薬物および試薬

TE-031および M-5(Fig. 1)は大正製薬株式会社総合研究所で調製したものをを使用した。

内部標準(I.S.)は Erythromycin B(アボット社)を用いた。

酢酸エチルは残留農薬試験用(血清、唾液)および液体クロマトグラフ用(尿)、アセトニトリル、メタノールは液体クロマトグラフ用、その他の試薬はいずれも試薬特級を用いた。

2. HPLC 測定条件

HPLC は島津製作所 LC-6 A型を用い、カラムは NUCLEOSIL C 18 5 μm , 4 mm i.d. \times 150 mm(センシュウ科学(株)製バックドカラム)、カラム温度30 $^{\circ}\text{C}$ 、検出器は Environmental Sciences Associates 製の電気化学検出器(Coulochem 5100 A型)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(5:3:2)を用い、流速は1.0 ml/min に設定した。なお、移動相の溶媒は0.5 μm 、緩衝液は0.22 μm のメンブランフィルターをあらかじめ通過させたのち混合して使用した。

記録計は島津製作所 C-R 3 A 型クロマトパックを用いチャートスピードは2.5 mm/min とした。

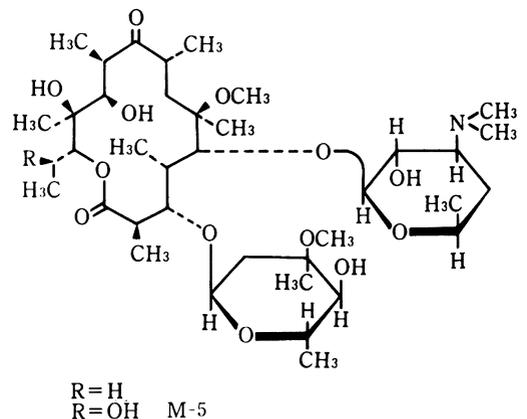
3. 前処理

ヒト血清、唾液または尿0.5 ml に I. S. の標準溶液(血清、唾液の場合は0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、尿の場合は100 $\mu\text{g/ml}$)を加え、Chart 1 または Chart 2 に従って前処理を行った。

4. 検量線の作成

血清、唾液または尿0.5 ml に TE-031 および M-5 の標準溶液(血清、唾液の場合は0.05~2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、尿の場合は1~200 $\mu\text{g/ml}$)を加え、Chart 1 または Chart 2 に従っ

Fig. 1 Chemical structures of TE-031 and M-5



て処理後 HPLC に注入し、得られた I.S. とのピーク高の比より検量線を作成した。

5. ヒト検体の HPLC 法と bioassay 法の比較

健康成人男子 8 名に TE-031, 200 mg (100 mg 錠×2) を食前 30 分に単回投与し、投与後採取した血清、唾液、尿を用いて HPLC 法および bioassay 法³⁾ で測定し、両測

Chart 1 Pretreatment method of TE-031 and M-5 in serum and saliva

Serum or saliva 0.5 ml
↓ added I. S.
↓ added saturated sodium carbonate 20 μ l
↓ added ethyl acetate 2.5 ml
↓ shaken for 15 min
↓ centrifuged at 3000 rpm for 5 min
ethyl acetate phase
↓ added 0.001N HCl 2.5 ml
↓ shaken for 15 min
↓ centrifuged at 3000 rpm for 5 min
HCl phase
↓ added saturated sodium carbonate 30 μ l
↓ added ethyl acetate 2.5 ml
↓ shaken for 15 min
↓ centrifuged at 3000 rpm for 5 min
ethyl acetate phase
↓ evaporated to dryness
residue
↓ dissolved in mobile phase 0.5 ml
injection into HPLC

Chart 2 Pretreatment method of TE-031 and M-5 in urine

Urine 0.5 ml
↓ added I. S.
↓ added ethyl acetate 5 ml
↓ shaken for 15 min
↓ centrifuged at 3000 rpm for 5 min
ethyl acetate phase
↓ evaporated to dryness
residue
↓ dissolved in mobile phase 8 ml
injection into HPLC

定法の相関を検討した。

なお、TE-031 投与後の検体測定は株式会社住化分析センター (HPLC 法) および株式会社バイオス (bioassay 法) で実施された。

II. 結 果

1. HPLC クロマトグラム

ヒト血清、唾液または尿中の TE-031, M-5 および I.S. のそれぞれ一定量を添加した際の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示した。各ピーク間の分離は極めて良好で M-5, I.S. および TE-031 の保持時間はそれぞれ約 5 分、約 7 分および約 9 分であった。

また、血清、唾液、尿に由来の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. 検量線

既知濃度の TE-031, M-5 をそれぞれヒト血清、唾液および尿に添加後、HPLC 分析を行い求めた検量線を Fig. 3 に示した。血清、唾液については TE-031, M-5 とも 0.05~2.0 μ g/ml, 尿については 1~200 μ g/ml の濃度範囲においていずれも原点を通る良好な直線性が得られた。

血清、唾液および尿の TE-031 および M-5 の各添加濃度における測定値は添加濃度とほぼ一致しており、変動係数も低濃度の場合を除き 6% 以下と良好な再現性が得られた。

3. 生体試料中での HPLC 法と bioassay 法の比較

TE-031, 200 mg を健康成人男子に単回投与し、投与後の血清、唾液、尿中の TE-031, M-5 の濃度を HPLC 法および bioassay 法で測定した。

Table 1 に血清、唾液、尿について HPLC 法により測定した TE-031, M-5 の濃度および bioassay 法による濃度を示した。

また、TE-031 と M-5 の濃度の和と bioassay 法による濃度との相関を Fig. 4 に示した。

最小二乗法で求めた相関係数は血清、唾液および尿でそれぞれ $r=0.986$, $r=0.969$, $r=0.966$ と良好な相関が得られた。また、回帰直線式の傾きは血清が 0.897, 唾液が 0.885 であり、HPLC 法より求めた TE-031 と M-5 の濃度の和と bioassay 法の値との間にほぼ 1:1 の対応が認められたが、尿の場合の傾きは 0.738 で若干低い値であった。

III. 考 察

生体液中のエリスロマイシンの HPLC 定量法は Tsuji⁴⁾ の蛍光試薬を用いた反応 HPLC 法, Chen⁵⁾, Duthu⁶⁾ の ECD-HPLC 法, Stubbs⁷⁾ の紫外外部検出器付き

HPLC 法が広く用いられている。

今回、著者らは新規のマクロライド系抗生物質 TE-031 およびその活性代謝物 M-5 の同時定量を CHEN ら、あるいは DUTHU の方法に準じた ECD-HPLC 法により確立した。

ECD-HPLC 法により生体液中の薬物を定量する際に電気化学的活性を有する内因性物質の存在が高感度分析の妨げとなるので、まず、試料中の内因性物質の除去法

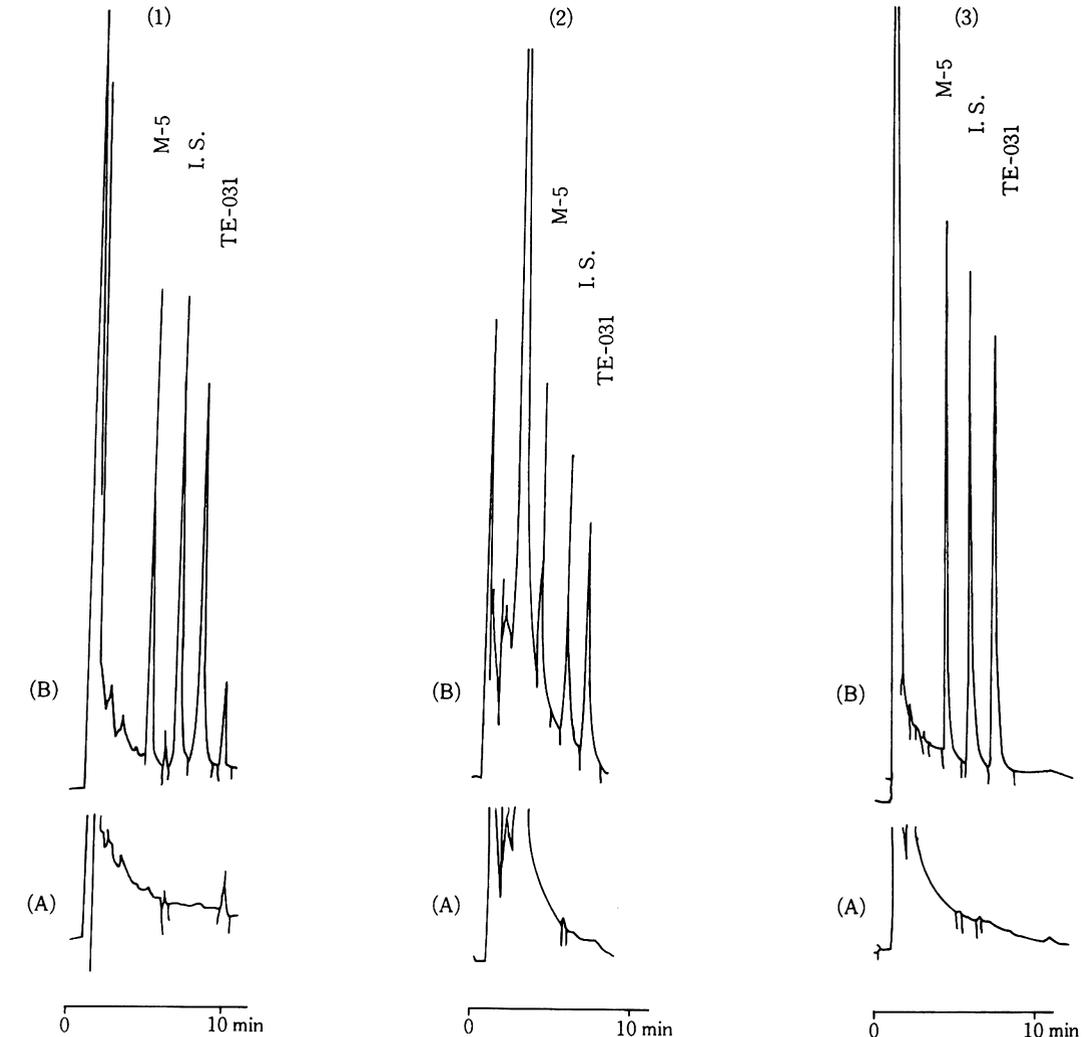
を検討した。

血清および唾液の場合、酢酸エチル抽出の希塩酸に転溶し、再度、酢酸エチルで抽出することにより内因性妨害物質をほぼ除去することが出来た。

一方、尿の場合は血清や唾液に比べ内因性物質の影響は少なく、酢酸エチル抽出のみで十分測定が可能であった。

本測定法による検出限界は TE-031, M-5 いずれの場

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



(A) Serum blank
(B) Serum containing 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of TE-031 and M-5

(A) Saliva blank
(B) Saliva containing 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of TE-031 and M-5

(A) Urine blank
(B) Urine containing 100 $\mu\text{g/ml}$ of TE-031 and M-5

Fig. 3 Calibration curves for TE-031 and M-5 in human serum, saliva and urine

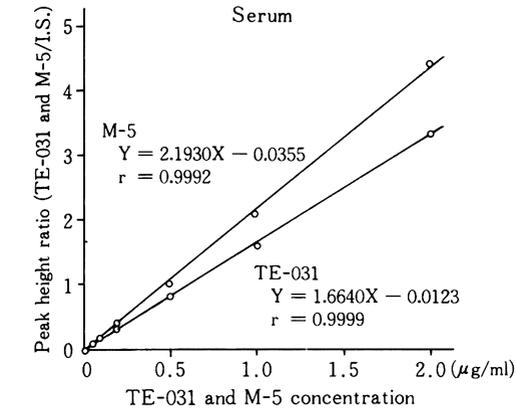


Fig. 4 Correlation between HPLC (TE-031 + M-5) and bioassay

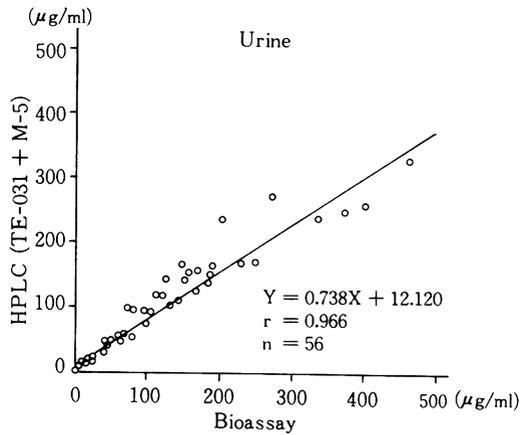
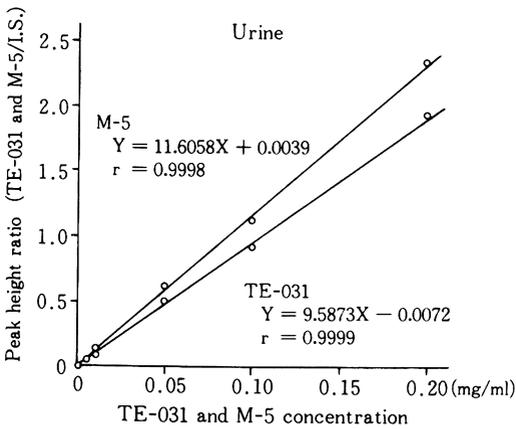
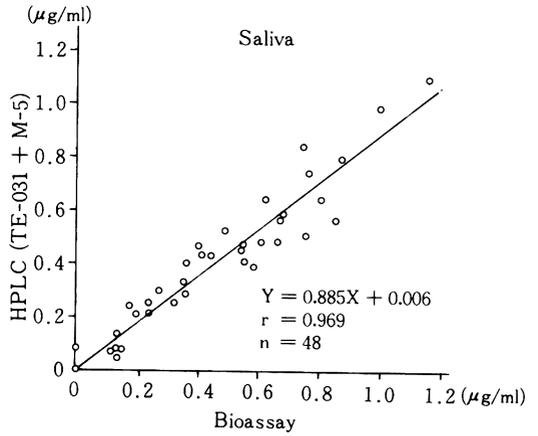
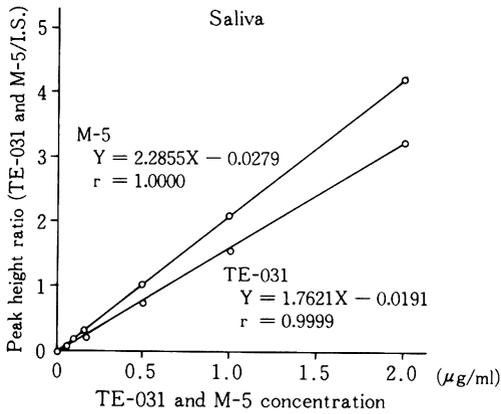
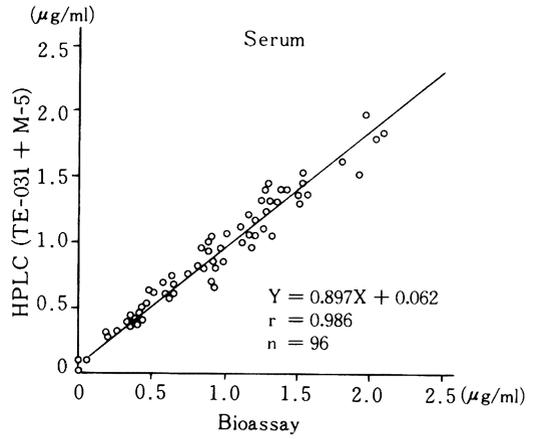


Table 1 Serum, saliva and urine concentrations measured by HPLC and bioassay
Serum ($\mu\text{g/ml}$)

Method		Time after administration (h)										
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	6.0	8.0	12.0	24.0
HPLC	TE-031	0.50	0.90	0.90	0.81	0.67	0.56	0.43	0.26	0.19	0.09	0.00
	M-5	0.33	0.46	0.48	0.47	0.43	0.39	0.35	0.28	0.23	0.13	0.05
Bioassay		0.89	1.43	1.42	1.36	1.12	1.01	0.84	0.49	0.38	0.16	0.01

Saliva ($\mu\text{g/ml}$)

Method		Time after administration (h)				
		1.0	2.0	4.0	8.0	12.0
HPLC	TE-031	0.30	0.39	0.23	0.09	0.01
	M-5	0.22	0.31	0.26	0.15	0.06
Bioassay		0.58	0.75	0.57	0.25	0.10

Urine ($\mu\text{g/ml}$)

Method		Time after administration (h)					
		0~2	2~4	4~6	6~8	8~12	12~24
HPLC	TE-031	112.86	105.90	70.18	35.61	13.96	5.59
	M-5	55.45	80.49	67.93	48.14	21.81	9.59
Bioassay		203.75	247.50	134.93	91.30	39.48	18.48

合も血清, 唾液は $0.05 \mu\text{g/ml}$, 尿は $1 \mu\text{g/ml}$ で, 検量線も良好な直線が得られた。

TE-031単回投与後の血清, 唾液および尿について, 今回設定した HPLC 法ならびに bioassay 法でそれぞれ測定を行い両測定法の相関を検討した。

その結果, 血清, 唾液および尿いずれの場合も HPLC 法で測定した TE-031 と活性代謝物 M-5 の濃度の和と bioassay 法で得られた濃度と良好な相関関係($r=0.966 \sim 0.986$)が得られた。

また, 両測定法間の回帰直線式の傾きは, 血清および唾液はそれぞれ 0.897 および 0.885 でおおむね $1:1$ の対応が認められたことから, これらの試料における抗菌活性はその大部分が未変化体および M-5 に基づくものと考えられた。

一方, 尿においては回帰直線式の傾きが 0.738 であり, HPLC 法に比べ bioassay 法の方が若干高値を示した。このことは尿中においては M-5 以外にも抗菌活性に関与する代謝物の存在を示唆しており, 今後尿中代謝物についての詳細な検討が望まれる。

以上, 今回確立した ECD-HPLC 法による体液中の TE-031 および活性代謝物 M-5 の同時定量法は比較的簡便で高感度分析が可能な方法であり, ヒト体内濃度の測定に有用であると考えられた。

文 献

- 1) 第35回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム。TE-031, 盛岡, 1987
- 2) ADACHI, T.; S. MORIMOTO, H. KONDO, T. NAGATE, Y. WATANABE & K. SOTA: 14-Hydroxy-6-O-methylerythromycins A, active metabolites of 6-O-methylerythromycin A (TE-031). J. Antibiot. Submitted publication
- 3) 長手尊俊, 杉田和彦, 宮地純子, 宮崎真奈美, 竹市千恵, 小野武夫, 大竹盾夫, 大村貞文: TE-031 の体液内濃度測定法に関する研究(第1報) bioassay 法による体液内濃度測定。Chemotherapy 投稿中
- 4) TSUJI, K.: Fluorimetric determination of erythromycin and erythromycin ethylsuccinate in serum by a high-performance liquid chromatographic post-column, onstream derivatization and extraction method. J. Chromatography 158: 337~348, 1978
- 5) CHEN, M-L. & W. L. CHIOU: Analysis of erythromycin in biological fluids by high-performance liquid chromatograph with electrochemical detection. J. Chromatography 278: 91~100, 1983

- 6) DUTHU G. S. : Assay of erythromycin from human serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Liquid Chromatography* 7 : 1023~1032, 1984
- 7) STUBBS, C. ; J. M. HAIGH & I. KANFER : Determination of erythromycin in serum and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Pharm. Sic.* 74 : 1126~1128, 1985

ASSAYS FOR TE-031(A-56268) IN BODY FLUIDS(II) HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

TATEO OHTAKE, KAORU OGURA, CHIKAKO IWATATE and TOSHIO SUWA
Research Center, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., Saitama

A quantitative analysis of TE-031 (A-56268) and its most active metabolite (M-5) in serum, saliva and urine was established by high performance liquid chromatography (HPLC) combined with an electrochemical detector.

Under HPLC conditions set for the determination of TE-031 and M-5 concentrations in human serum, saliva and urine, TE-031 and M-5 were well separated from organic components and good linear calibration curves were obtained.

The detection limit of TE-031 and M-5 in serum, saliva and urine was 0.05, 0.05 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

TE-031 and M-5 concentrations in serum, saliva and urine samples collected from healthy volunteers after TE-031 administration, were determined by HPLC and bioassay. The results obtained showed a high correlation (correlation coefficient : >0.966).