

RU 28965の体液内濃度測定法に関する研究(Ⅱ) HPLC法による測定法検討

城塚美喜雄・山本照雄・平山正史
齋藤健治・奥井 清
日本ルセル株式会社研究所

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた体液中 RU 28965及び4種の代謝物の分離・定量法を確立した。

1. 電気化学検出器(Electrochemical detector : ECD)を用いることにより、血漿又は尿中 RU 28965, RU 28111及びRU 39001の濃度を定量限界0.1 µg/mlで測定することが可能となった。
2. ECDにより検出困難な2種の代謝物 RU 44981及びRU 45179については、プレカラム誘導体化による蛍光検出法により、定量限界0.1 µg/mlで尿中濃度を測定することが可能となった。

RU 28965はフランス、ルセル・ユクラフ社において開発された新規14員環マクロライド系半合成抗生物質で、その構造はFig. 1に示した通りである。

RU 28965は動物の体内で代謝を受け、RU 28111, RU 39001, RU 44981及びRU 45179を生成することが報告されている^{1,2)}。

今回、ボランティアによる吸収、代謝及び排泄に関する試験に際し、血中及び尿中 RU 28965, RU 28111及びRU 39001の濃度を測定するために、電気化学検出器(Electrochemical detector : ECD)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による検討を行った。また、ECDによる検出が困難なRU 44981及びRU 45179については、プレカラム誘導体化による蛍光検出法を用いた尿中濃度の測定法を検討した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

RU 28965及びその代謝物であるRU 28111, RU 39001, RU 44981及びRU 45179は、フランス、ルセル・ユクラフ社より供給された分析用標準品を用いた。Fig. 2にこれらの代謝物の構造式を示した。

2. 試薬

検体の前処理で抽出溶媒として用いた酢酸エチル及び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関東化学製 HPLC用を、ゲンシクロライドは東京化成製を用い、その他の試薬はすべて特級品を用いた。

3. 装置

1) 高速液体クロマトグラフ

・ポンプ

LC-3 A(島津), 655-A(日立)又は570 B(ガスクロ工業)

・検出器:

電気化学検出器(ECD)

クーロケム 5100 A(esa)

アナリティカルセル Model 5010(esa)

ガードセル Model 5020(esa)

蛍光検出器

F-1000(日立)

・インジェクター:

ウォーターズ製710 B 又は Rheodyne 7125型

・カラム恒温槽: CTO-2 A(島津)

・データ処理装置:

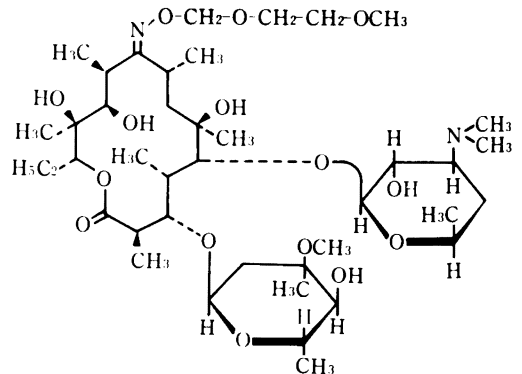
クロマトパックC-R 3 A(島津)又はクロマトコーダー-11(SIC)

2) 攪拌器: タッチミキサー MT-31(ヤマト科学)

3) 超音波洗浄器: B-12(ブランソン製)

4) 遠心分離器: H-103N₂(国産遠心器製)

Fig. 1 Chemical structure of RU 28965



II. 定量方法

1. 血漿中 RU 28965, RU 28111及びRU 39001の定量

1) HPLC 条件

- ・カラム: Nucleosil sC₁₈, 4 mm i.d.×150 mm
- ・ガードカラム: Unisil Q sC₁₈, 4 mm i.d.×10 mm
- ・移動相:
0.01 M Phosphate buffer(pH 6.0)/MeOH = 1:4
- ・カラム温度: 40℃
- ・流速: 0.8 ml/min
- ・検出条件:
ガードセル; +1.00 V
アナリティカルセル
セル I; +0.75 V(Gain 50×10)
セル II; +0.95 V(Gain 50×10)
レスポンス; 10 sec.

2) 操作

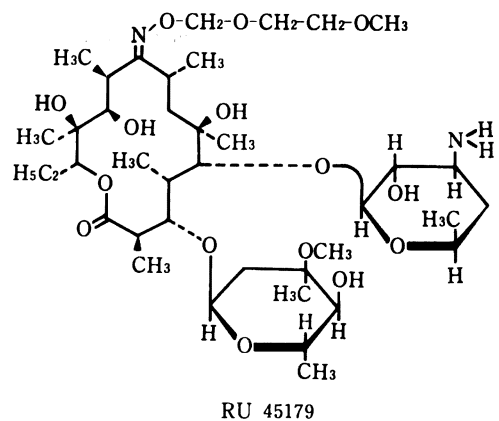
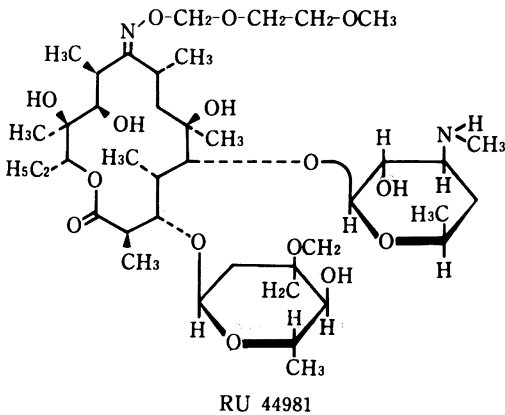
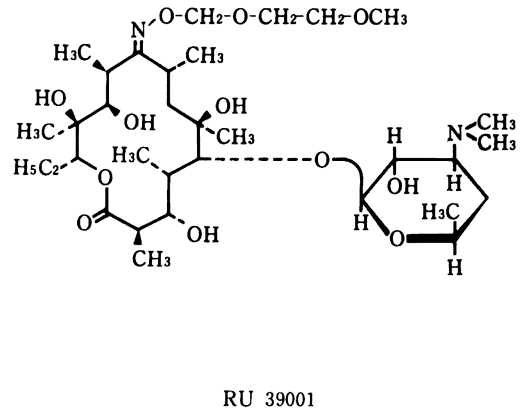
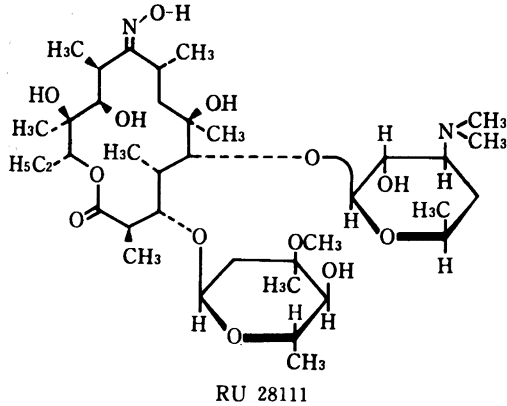
RU 28965の0.5, 5.0及び25.0 $\mu\text{g/ml}$ メタノール溶液又はRU 28965, RU 28111及びRU 39001の各1, 5及び10 $\mu\text{g/ml}$ メタノール溶液100 μl を遠沈管に採り, 窒素気流下, 室温で蒸発乾固した。これにヒト血漿200 μl を加え, 以下 Fig. 3 に従って処理した。RU 28965, RU 28111及びRU 39001の濃度に対して, 得られたピーク面積をプロットし, 検量線を作成した。血漿検体についても同様に処理し, 得られたクロマトグラムのRU 28965, RU 28111及びRU 39001のピーク面積から, 上記検量線により血漿中濃度を求めた。

2. 尿中 RU 28965, RU 28111及びRU 39001の定量

1) HPLC 条件

- ・カラム: Nucleosil sC₁₈, 4.6 mm i.d.×150 mm
- ・ガードカラム: Unisil Q sC₁₈, 4.0 mm i.d.×10 mm
- ・移動相:
0.01 M Phosphate buffer(pH 6.0)/MeOH = 1:5
- ・カラム温度: 40℃

Fig. 2 Chemical structures of RU 28111, RU 39001, RU 44981 and RU 45179



- ・流速: 0.8 ml/min
- ・検出条件:
 - ガードセル; +1.00 V
 - アナリティカルセル
 - セル I; +0.70 V (Gain 50×10)
 - セル II; +0.90 V (Gain 50×10)
 - レスポンス; 10 sec.

2) 操作

RU 28965 の 5 $\mu\text{g/ml}$ アセトニトリル溶液又は RU 28111 及び RU 39001 の各 1 $\mu\text{g/ml}$ 移動相溶液を調製した。得られたクロマトグラムより RU 28965 についてはピーク高さを、又、RU 28111 及び RU 39001 についてはピーク面積を求め、検量線を作成した。尿検体については Fig. 4 に従い処理し、得られたクロマトグラムの RU 28965, RU 28111 及び RU 39001 のピーク高さ又はピーク面積から、上記検量線により尿中濃度を求めた。

3. 尿中 RU 44981 及び RU 45179 の定量

1) HPLC 条件

- ・カラム: Unisil F 3-50 A μC_{18} , 4.6 mm i.d.×50 mm
- ・移動相:
 - 0.01 M Phosphate buffer (pH 6.0)/ CH_3CN = 38:62
- ・流速: 0.6 ml/min
- ・カラム温度: 室温
- ・検出波長: λ_{ex} 325 nm, λ_{em} 530 nm

2) 操作

RU 44981 及び RU 45179 の各 10 $\mu\text{g/ml}$ メタノール溶液 200 μl をキャップ付試験管に採り、窒素気流下、室温で蒸発乾固した。これにヒトブランク尿 0.5 ml を加え、以下 Fig. 5 に従い処理し、得られたクロマトグラムから RU 44981 及び RU 45179 のピーク面積を求め、検量線を作成した。尿検体についても同様に処理し、得られたクロマトグラムのピーク面積から、上記検量線により RU 44981 及び RU 45179 の尿中濃度を求めた。

III. 結果

1. 血漿中 RU 28965, RU 28111 及び RU 39001 の定量

血漿中 RU 28965 及びその代謝物を分離・定量する目的で、HPLC 条件及び除タンパク操作を含めた前処理法に関する検討を行った。

Fig. 6 に示したクロマトグラムのように、RU 28965, RU 28111 及び RU 39001 の保持時間はそれぞれ 11.1, 8.0, 4.5 分で、3 者の溶出位置には妨害ピークは認められなかった。

既知濃度の RU 28965, RU 28111 及び RU 39001 をヒトブランク血漿に添加し、Fig. 3 に従い処理後、回収率を求めたところ、それぞれ 82.7~86.0%, 95.6~112.0% 及び 92.1~98.7% と良好であった。又、Fig. 7 及び Fig. 8 に 3 者の検量線を示したが、いずれも良好な直線性が認められた。

Fig. 3 Pre-chromatographic treatment of plasma

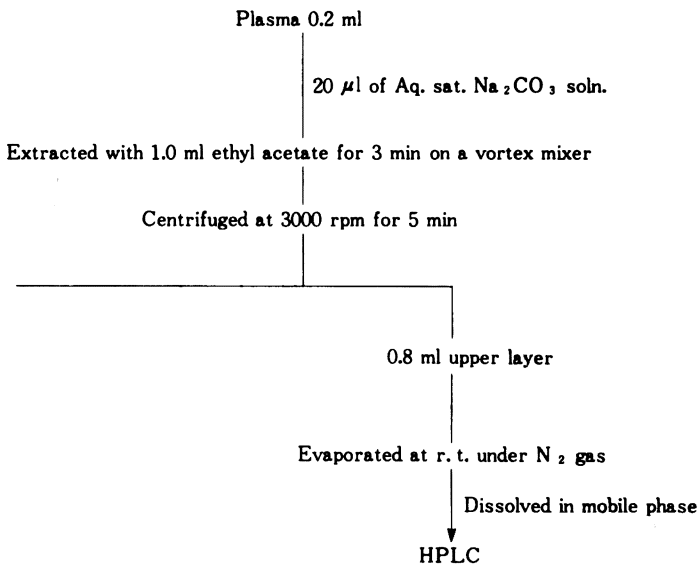


Fig. 4 Pre-chromatographic treatment of urine

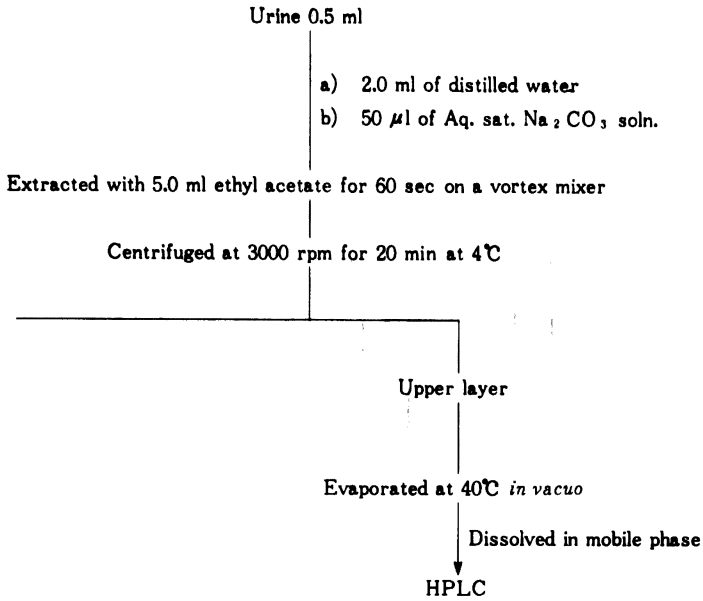


Fig. 5 Pre-chromatographic treatment of human urine for measurement of RU 44981 and RU 45179

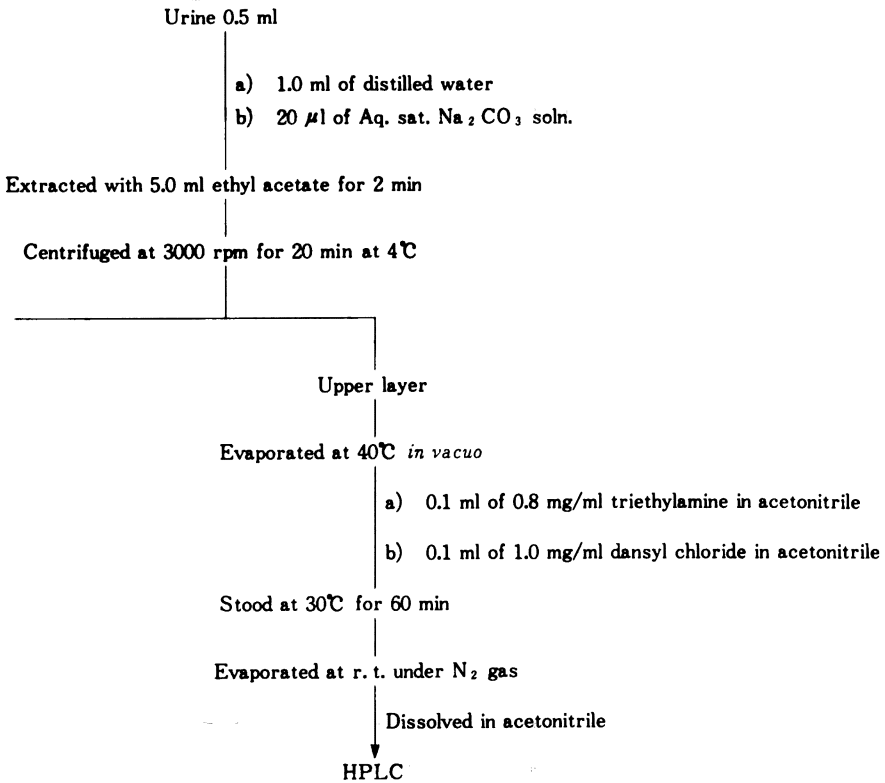


Fig. 6 Typical chromatograms of RU 28965, RU 28111 and RU 39001 spiked in human plasma

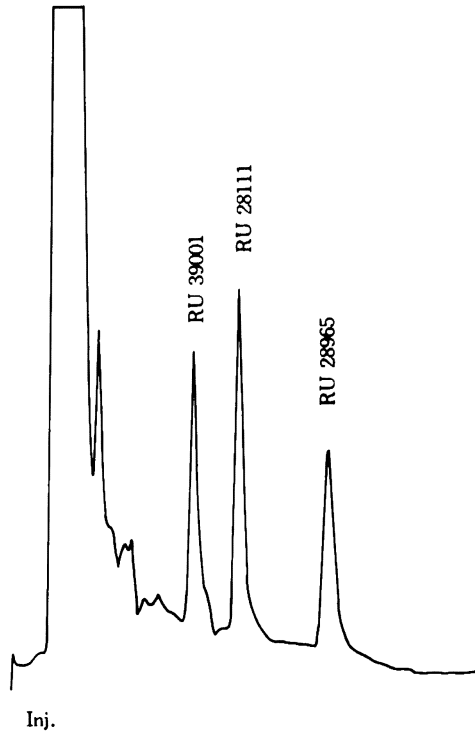
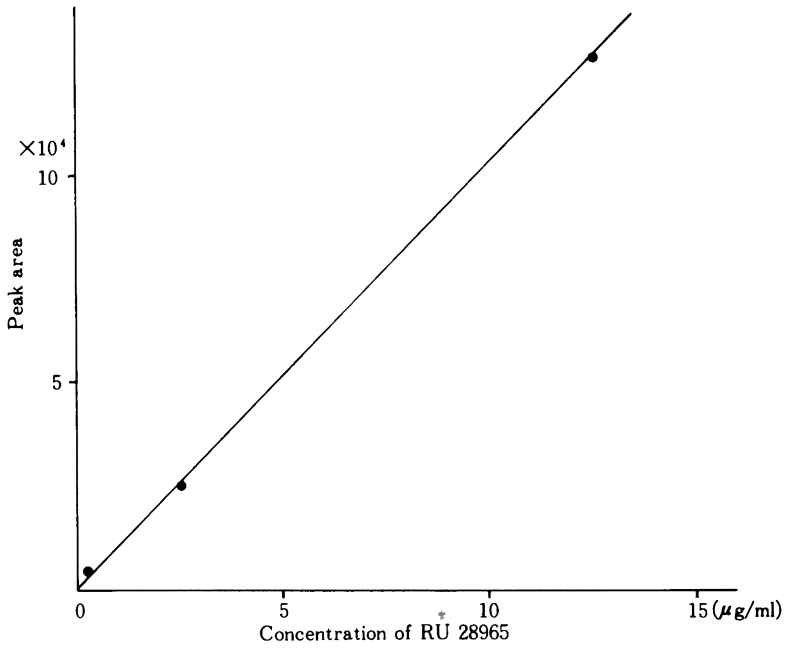


Fig. 7 Calibration curve of RU 28965 in human plasma



以上の結果より、RU 28965、RU 28111及びRU 39001の既知濃度を添加したヒトブランク血漿をFig. 3に従い処理し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成し、血漿中濃度を求めることとした。

なお、定量限界は3者とも0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

2. 尿中RU 28965、RU 28111及びRU 39001の定量
ヒト尿中のRU 28965及びその代謝物であるRU 28111及びRU 39001の同時定量を目的として、HPLC条件及び検体の前処理法について検討した。

Fig. 9にRU 28965、RU 28111及びRU 39001のヒト尿中におけるHPLCクロマトグラムを示したが、RU 28965とその代謝物との分離及び生体由来の成分との分離いずれも良好で、保持時間はそれぞれ12.4、9.7及び7.9分であった。

既知濃度のRU 28965、RU 28111及びRU 39001をヒトブランク尿に添加し、Fig. 4に従い処理後求めた回収率は3者とも良好で、又、Fig. 10及びFig. 11のようにいずれの検量線も良好な直線性を示した。

以上の結果より、RU 28965、RU 28111及びRU 39001の尿中濃度測定は、RU 28965についてはピーク高さを、又、代謝物2種についてはピーク面積を用い、作成した検量線から得られた濃度を回収率で補正せず、尿中濃度を求めることとした。

なお、定量限界は3者とも0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

3. RU 44981及びRU 45179の定量

RU 28965の代謝物のうち、N-脱メチル体であるRU 44981及びRU 45179はECDによる検出が困難であった。そこで、これら2種類の代謝物を高感度に検出、定量する目的で、ダンシルクロライドを螢光ラベル試薬として用いるプレカラム法について検討した。

RU 44981及びRU 45179のラベル体と生体成分との分離についてHPLC条件を検討したところ、Fig. 12に示したクロマトグラムのように良好な分離を得ることができた。なお、RU 44981及びRU 45179のラベル体の保持時間はそれぞれ10.6、5.5分であった。

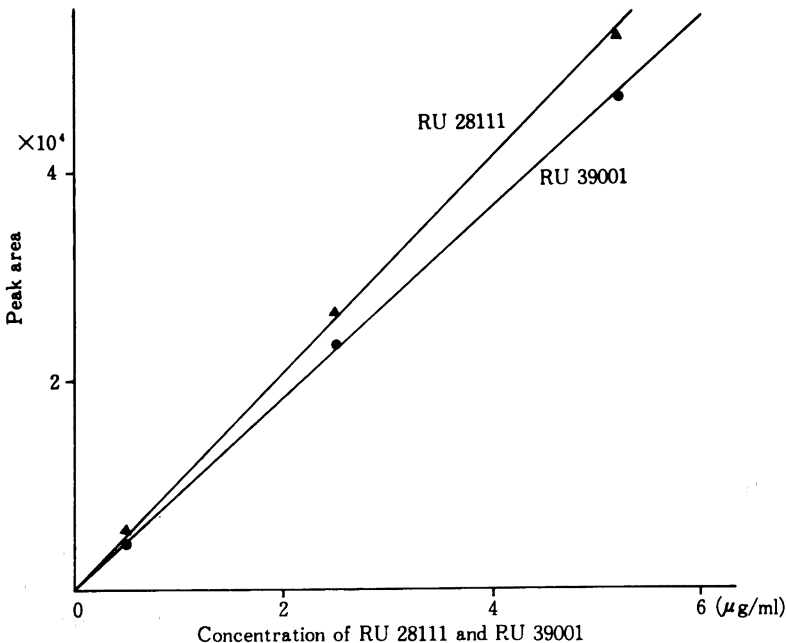
既知濃度のRU 44981及びRU 45179を添加したヒトブランク尿をFig. 5に従い処理後、回収率を求めたところ、RU 44981で85.1~88.0%、RU 45179で68.5~75.3%であった。RU 45179において回収率はやや低かったが、いずれの検量線も直線性(Fig. 13)は良好であった。

これらの結果より、既知濃度を添加したヒトブランク尿をFig. 5に従い処理後、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成し、検体の尿中濃度を求めることにした。なお、本法の定量限界はRU 44981及びRU 45179いずれにおいても0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

4. 試料の保存安定性

ヒト血漿中におけるRU 28965の安定性について検討

Fig. 8 Calibration curves of RU 28111 and RU 39001 in human plasma



した。

Table 1に所定期間経過後の血漿中濃度を示したが、 -20°C 以下で保存する限り15日間は安定であった。

V. 考 察

RU 28965はフランス、ルセル・ユクラフ社において開発され、エリスロマイシンを基本骨格に有する新規14員環マクロライド系半合成抗生物質である。

RU 28965は動物の体内でその一部が代謝を受け、RU 28111, RU 39001, RU 44981及びRU 45179を生成する

ことが報告されている^{1,2)}。

今回、著者らはポランティアによる吸収、代謝及び排泄に関する試験に先立ち、RU 28965及びその一連の代謝物の血漿中及び尿中濃度を測定する目的で、HPLC法による検討を行った。

体液中薬物濃度を測定する場合、紫外線分光光度検出器が繁用されるが、RU 28965のモル吸光係数が小さいことから、一連の代謝物も含めて微量な体液中濃度を測定することは困難であった。そこで、著者らはこれら一連の化合物の電気化学的性質³⁾に着目し、ECD(Electrochemical detector)による検出を試みた。

RU 28965, RU 28111及びRU 39001についてポラングラムを作成したところ、いずれも酸化電位側で検出されたが、 $+0.90\sim+0.95\text{ V v.s. Ag/AgCl}$ と高い印加電位を必要とした。しかしながら、ベースラインの安定性は良好で、又、カラム及び移動相の検討により、血漿又は尿由来の生体成分と良好な分離を得ることができた。一方、RU 28965が脱メチル化された代謝物であるRU 44981及びRU 45179については、ECDによる検出が困難であったため他の検出法を試みたが、これについては後段で考察する。

カラムの劣化等を最小限に抑えるためには検体の前処理が必要であるが、血漿検体では、特に除タンパクを含めた操作が必要である。そこで、アルカリ性下、酢酸エチルにより抽出する方法を基本とし、加えるべきアルカリの量及び抽出時間について検討した結果、血漿 $200\mu\text{l}$ あたり飽和炭酸ナトリウム水 $20\mu\text{l}$ を加え、酢酸エチル 1.0 ml で3分間抽出した場合、RU 28965, RU 28111及びRU 39001いずれも良好な回収率を得た。又、尿検体についても血漿とほぼ同様な前処理法で良好な回収率を得ることができた。

以上、種々の検討から設定された前処理法及びHPLC条件による血漿又は尿検体の定量限界は、RU 28965, RU 28111及びRU 39001のいずれにおいても $0.1\mu\text{g/ml}$ であった。

前述のように、RU 44981及びRU 45179についてはECDによる検出が困難であったが、これはRU 28965の電気化学的に活性な官能基と推定されるジメチルアミノ基が1級又は2級アミノ基へと体内で変換され、電子供与基であるメチル基を失った結果、酸化電位がより高くなったためと考えられる。従って、更に印加電位を高くすればこれら2種の代謝物も検出可能と考えられる。しかしながら、印加電位を高くすればベースラインの安定性に影響が現れると予想されることから、ECDによる高感度検出は困難と考え他の検出法を検討することにした。

Fig. 9 Typical chromatograms of RU 28965, RU 28111 and RU 39001 spiked in human urine

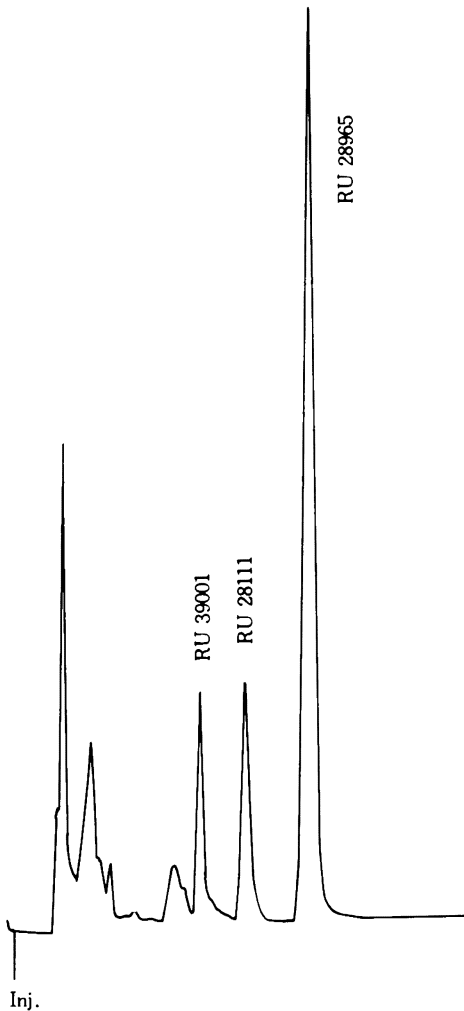


Fig. 10 Calibration curve of RU 28965 in human urine

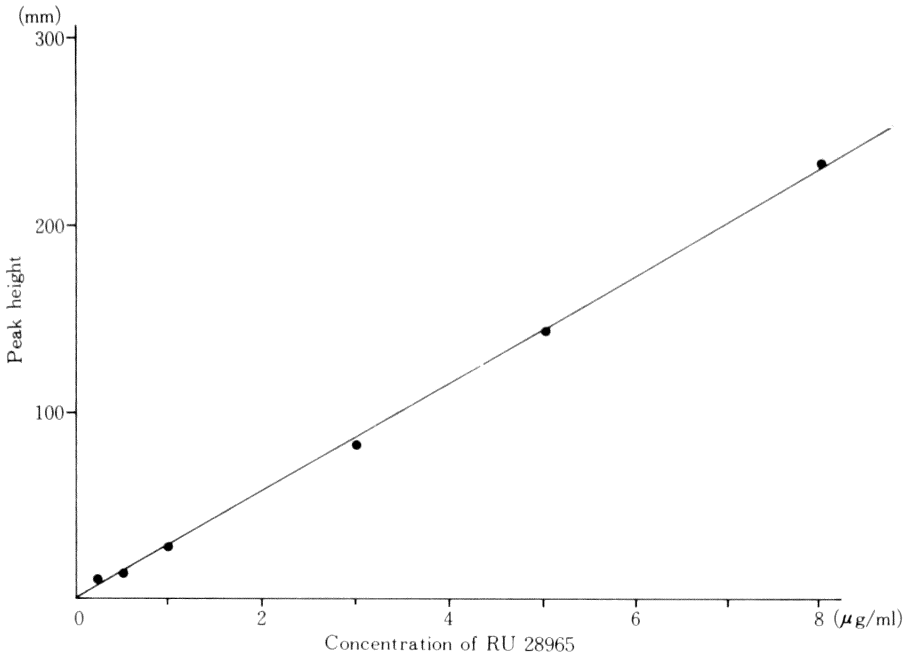


Fig. 11 Calibration curves of RU 28111 and RU 39001 in human urine

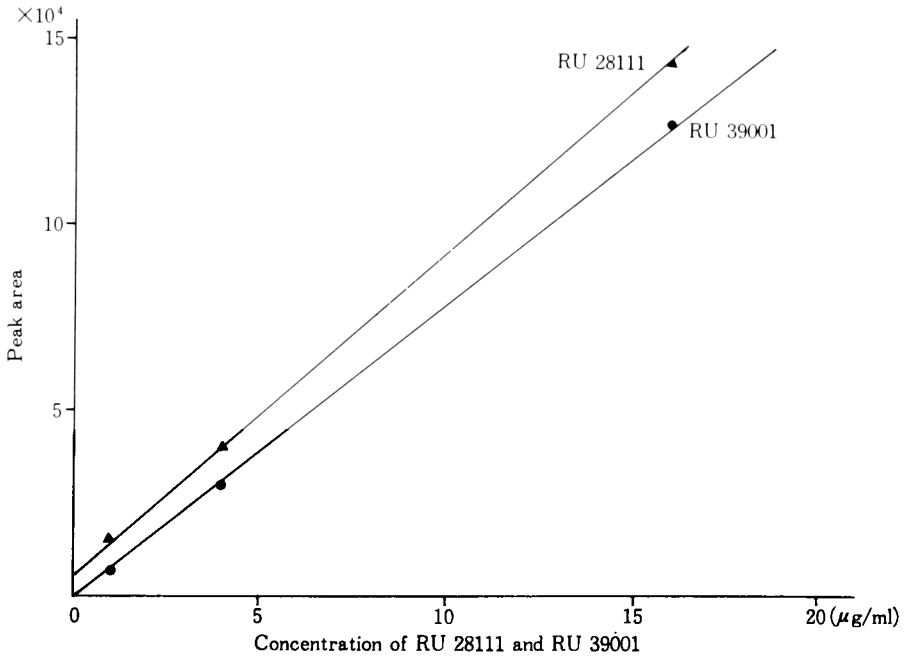
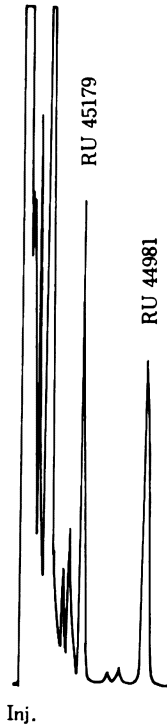


Fig. 12 Typical chromatograms of RU 44981 and RU 45179 spiked in human urine



著者らは RU 44981 及び RU 45179 の 1 級又は 2 級アミノ基に着目し、ダンシルクロライドをラベル試薬として用いる蛍光検出法について検討した。

ダンシルクロライドは含水溶媒中でも反応するが、このとき、その一部は加水分解を受け、発蛍光性のダンシルスルホン酸を与えるため、クロマトグラム上、目的とするピークが妨害されることも考えられる。従って、尿検体を Fig. 5 に従い処理し、得られた抽出残渣をラベル化反応に供することを前提として反応条件について検討した。その結果、反応の完結には尿検体 0.5 ml の抽出残渣に対し、トリエチルアミンの 0.8 mg/ml アセトニトリル溶液及びダンシルクロライドの 1.0 mg/ml アセトニトリル溶液各 100 μ l を加え、30°C で 1 時間反応させることが必要であった。

既知濃度の RU 44981 及び RU 45179 をヒトブランク尿に添加して行った回収率試験では、RU 45179 で回収率がやや低かったものの、検量線はいずれも良好な直線性を示し、更に、定量限界がいずれについても 0.1 μ g/ml であることなどから、本法は RU 44981 及び RU 45179 の尿中濃度の測定に十分実用性があると考えられた。

Fig. 13 Calibration curves of RU 44981 and RU 45179 in human urine

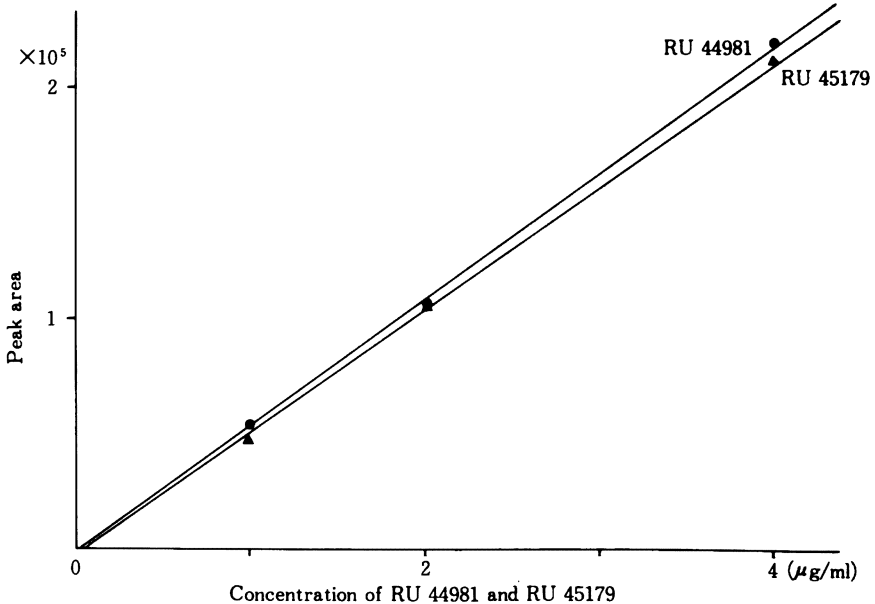


Table 1 Stability of RU 28965 in human plasma

Storage period (days)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	4	7	8	15
5 °C	1.0	1.0	0.9	—	—
-20 °C	1.0	—	—	1.0	1.0
-50 °C	1.0	—	—	1.1	1.0

— : Not tested

文 献

- 1) 江角凱夫, 神 義容, 埴 真也, 二宮真二, 林一志, 山本照雄, 平山正史, 斎藤健治, 奥井 清 : 動物における RU 28965 の吸収・分布・代謝・排泄に関する研究。Chemotherapy 投稿中
- 2) 江角凱夫, 神 義容, 山本照雄, 平山正夫, 奥井

清 : 動物における RU 28965 の吸収・分布・代謝・排泄に関する研究。社内資料

- 3) M. L. CHEN and W. L. CHIOU : Analysis of erythromycin in biological fluids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. J. Chromatogr. 278 : 91~100, 1983

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF RU 28965 AND ITS METABOLITES IN BODY FLUIDS

MIKIO SHIROTSUKA, TERUO YAMAMOTO, MASASHI HIRAYAMA, KENJI SAITOH and KIYOSHI OKUI
Nippon Roussel Laboratories

We have developed a new method for determining plasma and urinary levels of RU 28965 and its four metabolites by high-performance liquid chromatography (HPLC).

1. It was possible to measure plasma and urinary concentrations of RU 28965, RU 28111 and RU 39001 at the low detection limit of $0.1 \mu\text{g/ml}$ by HPLC monitoring with an electrochemical detector (ECD).

2. A pre-column derivatization method was applied to determine urinary concentrations of RU 44981 and RU 45179 by HPLC monitoring with a fluorescence detector. The detection limit of these metabolites in urine was also $0.1 \mu\text{g/ml}$.