

生体試料中の Cefotiam hexetil およびその代謝物の 高速液体クロマトグラフィーによる定量法

山下健治・太田竜一・山口喜久雄・青木 勇

前田憲一・畚野 剛・矢敷孝司

武田薬品工業株式会社・技術管理本部・試験分析センター*

新規経口セファロスポリン cefotiam hexetil (2HCl) (塩酸セフォチアムヘキセチル) の体内動態を知る目的で、ヒト血漿および尿中の cefotiam (親化合物) および Δ^3 -cefotiam 濃度の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による同時定量法を確立した。血漿は除蛋白後、尿は直接、0.1 M リン酸一カリウム溶液で希釈して試料とした。HPLC にはカラムにオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) を、移動相に 0.05 M リン酸緩衝液 (pH7.7) -アセトニトリル混液 (88:12, V/V) を、検出に UV 254 nm を用いた。血漿および尿中の cefotiam および Δ^3 -cefotiam の添加回収率は、ともに 94% 以上、変動係数は 5% 以下であり、検出下限は両成分とも血漿で 10 ng/ml、尿で 500 ng/ml であった。本法を臨床第一相試験に適用したところ、cefotiam hexetil (2HCl) 400 mg (力価) 投与後の血漿中 cefotiam 濃度は投与 1~2 時間後に最高値約 4 μ g/ml を示し、その後速やかに消失した。血漿中 Δ^3 -cefotiam 濃度は cefotiam 濃度の 2~3% に過ぎなかった。また投与後 24 時間までの排泄尿中には cefotiam が投与量の 37%、 Δ^3 -cefotiam が 1% 排泄された。次に、cefotiam hexetil (2HCl) の吸収機構、生物学的利用能の理解のため、ヒト血漿および糞中の cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil の HPLC による同時定量法を設定した。血漿は採取後、直ちに除蛋白処理を行い、0.1 M リン酸一カリウム溶液で希釈して、また糞は採取後、直ちに 0.1 N 塩酸抽出を行い、0.1 M リン酸一カリウム溶液で希釈して試料とした。HPLC にはカラムに ODS を、移動相に 0.1 M リン酸一カリウム溶液-アセトニトリル-酢酸混液 (72:28:1, V/V) を、検出に UV 254 nm を用いた。本法により臨床第一相試験における検体中の cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil を定量した結果、血漿および糞中にはいずれも検出されず、糞中にも cefotiam および Δ^3 -cefotiam が検出された。

Key words : Cefotiam hexetil, 代謝物, HPLC 定量法

Cefotiam hexetil (2HCl) (塩酸セフォチアムヘキセチル, CTM-HE, SCE-2174) は当社中央研究所において合成された新規エステル型経口セファロスポリンで広範囲な抗菌スペクトルを有し、強い抗菌力を示す cefotiam¹⁾ を親化合物とするプロドラッグである²⁾。このプロドラッグを各種実験動物に経口投与すると、消化管よりとり込まれ、消化管膜中でエステラーゼによりエステル部が加水分解され、主に親化合物 cefotiam として体循環血中に吸収されるが、cefotiam hexetil は中性~アルカリ性で一部 Δ^3 -cefotiam hexetil に異性化するこ

とから、血中には cefotiam の他に Δ^3 -cefotiam hexetil の加水分解物 Δ^3 -cefotiam がわずかに存在することが報告されている³⁾ (Fig. 1)。また体循環血中に吸収された cefotiam は主として尿中に排泄されることが既に明らかにされている⁴⁾。したがって、cefotiam hexetil の体内動態を理解するには血中、尿中の cefotiam、 Δ^3 -cefotiam 濃度を知る必要がある。生体試料中の cefotiam の HPLC による定量法については既に報告がある^{5)~7)} が、 Δ^3 -cefotiam との同時定量法の報告はない。また Bioassay 法では非活性の Δ^3 -cefotiam の測定は不

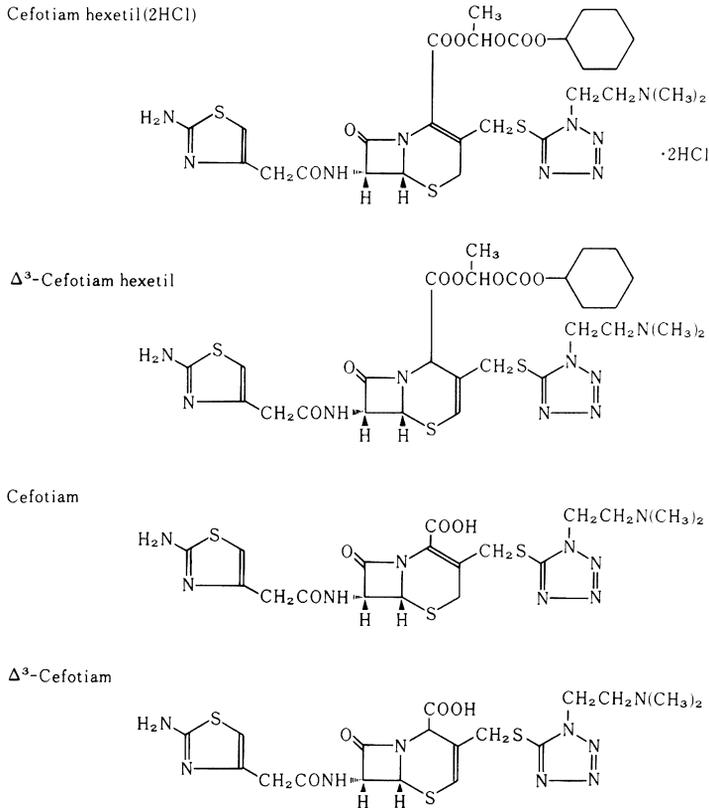


Fig. 1 Structures of cefotiam hexetil (2HCl) and its metabolites

可能である。そこで著者らはまず、血漿、尿中の cefotiam, Δ^3 -cefotiam の高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による同時定量法を確立するとともに、臨床第一相試験における検体について両成分の定量を行い、cefotiam については Bioassay 法との相関性についても検討した。

次に、このプロドラッグの吸収機構、生物学的利用能をより詳細に理解するには、cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil の血中濃度や糞中排泄量に関する情報が有用である。そこで、ヒト血漿および糞中の cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil についても HPLC による定量法を設定し、臨床第一相試験における検体について若干の検討を加えたので、その結果を併せて報告する。

実験の部

1. 試薬および試液

Cefotiam hexetil (2HCl), Δ^3 -cefotiam hexetil (2HCl), cefotiam, Δ^3 -cefotiam および内標準物質として用いた cefmenoxime (CMX) は武田薬品工業株式会社中央研究所にて合成されたものを、アセトニトリルは液体クロマトグラフ用、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

2. 検体

Cefotiam hexetil (HCl) 臨床第一相試験で得られた血漿、尿および糞を用いた。添加実験用には健康人の血漿、尿および糞を用いた。これらの検体は採取後、適当な前処理を行い、 -20°C で冷凍保存した。

3. 測定機器および測定条件

高速液体クロマトグラフィには島津製作所製 LC-6A ポンプ, SPD-6A 紫外検出器および冷却器

HPLC 条件

	Cefotiam 及び Δ^3 -cefotiam	Cefotiam hexetil 及び Δ^3 -cefotiam hexetil
カラム	YMC ODS, A-302 (150×4.6 mm I. D.; 粒径 5 μ m; 山村化学製)	YMC ODS, A-302 (150×4.6 mm I. D.; 粒径 5 μ m; 山村化学製)
カラム温度	室温 (約 25 °C)	室温 (約 25 °C)
移動相	0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.7): アセトニトリル混液 (88:12, V/V)	0.1 M リン酸一カリウム溶液: アセトニトリル: 酢酸混液 (72:28:1, V/V)
流量	1 ml/min	1 ml/min
検出	UV 254 nm	UV 254 nm

WIG-111A(イシド社製)により試料室を 4°C にコントロールした SIL-6A オートサンプラーを用い、上記の条件で測定した。

4. 試料の調製方法

4.1. Cefotiam および Δ^3 -cefotiam

(1) 血漿

血漿サンプル 0.4 ml に 1 N 塩酸 50 μ l および水 100 μ l を加えた後、内標準物質 (cefmenoxime) 0.6 μ g を含むアセトニトリル溶液 1.5 ml を加え振とう後、遠心分離することにより除蛋白した。上澄液を窒素ガス気流下、40°C にて蒸発乾固した後、0.1 M KH_2PO_4 溶液 300 μ l に再溶解し、その 100 μ l を HPLC に注入した。

(2) 尿

尿サンプル 0.5 ml を内標準物質 (p-アミノ安息香酸メチル) 180 μ g を含む 0.1 M KH_2PO_4 溶液 1.5 ml で希釈し、その 20 μ l を HPLC に注入した。

(3) 糞

後述の糞中 cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil の定量における調製法に準じた。ただし試料溶液中には内標準物質 (p-アミノ安息香酸メチル) を添加した。

4.2. Cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil

(1) 血漿

血漿サンプル 0.5 ml に 1 N 塩酸 160 μ l を含むアセトニトリル 1 ml を加えて振とう後、遠心分離して除蛋白を行い、その上澄液を 0.1 M KH_2PO_4 溶液で 3 倍に希釈して試料溶液とし、その 100 μ l を HPLC に注入した。

(2) 糞

糞サンプルの重量を量った後、1000 ml の 0.1 N

塩酸を加え、攪拌し抽出したスラリーの 1 部を遠心分離し、その上澄液を 0.1 M KH_2PO_4 溶液で 10 倍に希釈して試料溶液とした。その 100 μ l を HPLC に注入した。

5. 添加回収率の測定

5.1. Cefotiam および Δ^3 -cefotiam

既知量の cefotiam および Δ^3 -cefotiam をブランク血漿、尿および糞に添加し、上記の方法にしたがって操作し、得られたクロマトグラムにおける cefotiam および Δ^3 -cefotiam のピークについて内標準物質のピークに対する高さ比を測定した。

5.2. Cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil

既知量の cefotiam hexetil (2HCl) および Δ^3 -cefotiam hexetil (2HCl) をブランク血漿および糞に添加後、直ちに上記の調製法にしたがって操作し HPLC を行うと、cefotiam hexetil はジアステレオマーによる 2 ピークとして、 Δ^3 -cefotiam hexetil も分離は不十分ながら 2 ピークとして検出された。定量は 2 ピークの面積和で行えるが、その定量値は β ピーク高さで測定した値と良好な相関性を示したので、 β ピーク高さで行った。

6. Bioassay 法

血漿および尿中 cefotiam 濃度は奮野らの方法⁹⁾にしたがって定量した。ただしステンレスカップの代わりに寒天孔(径, 8 mm)に検液を注入する Agar well 法を用いた。

実験結果および考察

1. 血漿および尿中 cefotiam および Δ^3 -cefotiam

1.1. 試料の前処理と HPLC 条件

(1) 血漿

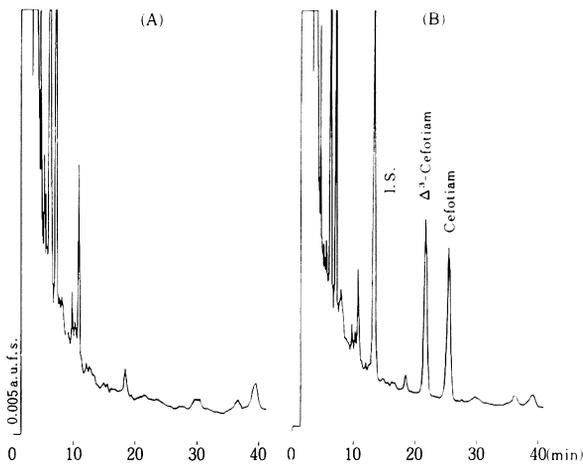


Fig. 2 Chromatograms of (A) control plasma and (B) plasma spiked with cefotiam and Δ^3 -cefotiam ($0.5 \mu\text{g/ml}$).
I. S. : Cefmenoxime

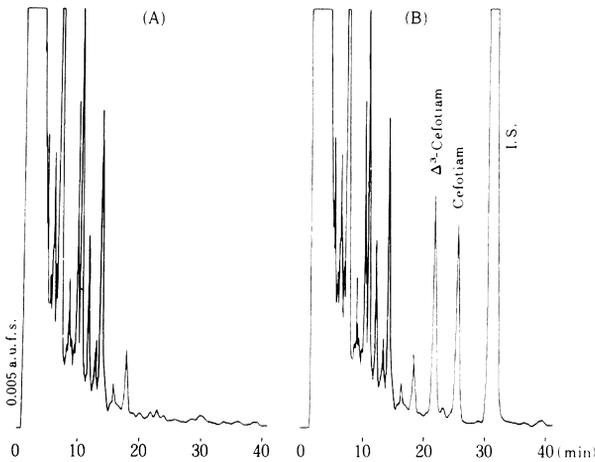


Fig. 3 Chromatograms of (A) control urine and (B) urine spiked with cefotiam and Δ^3 -cefotiam ($12.0 \mu\text{g/ml}$).
I. S. : Methyl p-aminobenzoate

Cefotiam および Δ^3 -cefotiam は親水性物質であり、有機溶媒による抽出は困難であったので、水可溶の有機溶媒による除蛋白を試みた。メタノール、アセトン、およびアセトニトリルについて検討した結果、操作性およびクロマトグラム上、妨害ピークとの分離の良好なアセトニトリルを採用した。 Δ^3 -cefotiam は cefotiam に比べ低濃度であると予想されたので、検出感度を上げるため、除蛋白後、濃縮操作を加えた。Cefotiam の $\text{pK}_{\text{a}(3)}$ は 7.0 である⁹⁾ ことから HPLC に逆相系カラムを用いる場合、移動

相の pH が高いほど cefotiam および Δ^3 -cefotiam の溶出時間は遅くなり¹⁰⁾、血漿中の妨害物質と分離しやすくなると考え、種々検討の結果、実験の部で述べた HPLC 条件を設定した。この条件下の血漿中 cefotiam および Δ^3 -cefotiam のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

(2) 尿

尿ではクロマトグラム上、妨害ピークが多く血漿試料と同一の検出感度は得られなかったが、cefotiam に関しては従来の測定例より $0.5 \mu\text{g/ml}$

Table 1 Regression data for calibration curves of cefotiam and Δ^3 -cefotiam in plasma and urine

Sample	Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Slope	Intercept	r
Plasma	Cefotiam	0.01~6.0	0.2293	0.0132	0.999
	Δ^3 -Cefotiam	0.01~0.25	3.5122	-0.0101	0.999
Urine	Cefotiam	0.5 ~500	0.0025	0.0036	0.999
	Δ^3 -Cefotiam	0.5 ~ 25	0.0686	0.0044	0.999

r : Correlation coefficient

Table 2 Recovery of cefotiam and Δ^3 -cefotiam from spiked human plasma and urine

Sample	Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	C.V. (%)	n
Plasma	Cefotiam	4.0	106.1	2.3	6
	Δ^3 -Cefotiam	0.25	94.5	5.0	6
Urine	Cefotiam	400	101.1	0.88	4
	Δ^3 -Cefotiam	20	99.6	0.33	4

C.V.: Coefficient of variation

n: Number of experiments

Table 3 Stability of cefotiam and Δ^3 -cefotiam in human plasma and urine in frozen state (-20°C)

Sample	Compound	Concentration spiked ($\mu\text{g/ml}$)	Duration of storage (month)	Residual content (%)
Plasma	Cefotiam	5.0	1	102.6
		5.0	2	105.5
	Δ^3 -Cefotiam	5.0	1	101.9
		5.0	2	104.4
Urine	Cefotiam	400	1	97.7
		400	2	98.9
		400	3	98.5
	Δ^3 -Cefotiam	20	1	99.7
		20	2	101.4
		20	3	100.0

の検出感度でも有用であると推定された。実験の部で述べた HPLC 条件下の尿中 cefotiam および Δ^3 -cefotiam のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

1. 2. 添加検量線および回収率

既知量の cefotiam および Δ^3 -cefotiam を添加した血漿および尿サンプルについて求めた添加検量線の直線回帰式を Table 1 に示す。それぞれの濃度範囲において、ほぼ原点を通る良好な直線性を示した。血漿、尿中の cefotiam および Δ^3 -cefotiam の平均回収率はともに 94% 以上で、その変動係数 (CV) は

5% 以下であった (Table 2)。なお検出下限は両成分とも、血漿では 10 ng/ml、尿では 500 ng/ml であった。

1. 3. 血漿および尿中 cefotiam および Δ^3 -cefotiam の保存安定性

既知量の cefotiam および Δ^3 -cefotiam を添加した血漿および尿サンプルについて、冷凍 (-20°C) 状態での保存安定性を調べた結果、血漿、尿中の cefotiam および Δ^3 -cefotiam はともに 2~3 か月間は安定であった (Table 3)。

1. 4. HPLC 法と Bioassay 法との相関性

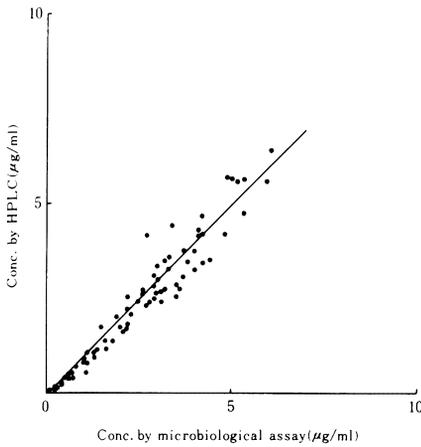


Fig. 4 Relationship between cefotiam concentrations in plasma determined by HPLC and microbiological assay. Slope = 1.016, Intercept = 0.153, $r = 0.978$, $n = 98$.

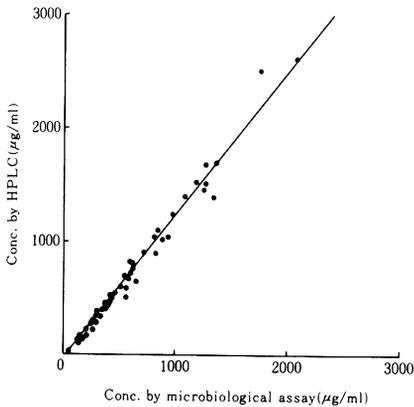


Fig. 5 Relationship between cefotiam concentrations in urine determined by HPLC and microbiological assay. Slope = 1.253, Intercept = -33.56, $r = 0.992$, $n = 108$.

臨床第一相試験で得られた血漿および尿について cefotiam 濃度を HPLC 法と Bioassay 法で定量し、両定量値を比較した。Fig. 4, Fig. 5 に示すように両定量値間には良好な相関性が認められた。

1.5. 臨床第一相試験における血漿および尿中 cefotiam および Δ^3 -cefotiam

Cefotiam hexetil (2HCl) 400 mg (力価) を健康人 10 人に経口投与後の血漿中濃度曲線を Fig. 6 に示す。Cefotiam および Δ^3 -cefotiam は類似した血漿中濃度推移を示し、投与後 1~2 時間で最高濃度に達し、その後速やかに消失した。 Δ^3 -Cefotiam 濃度

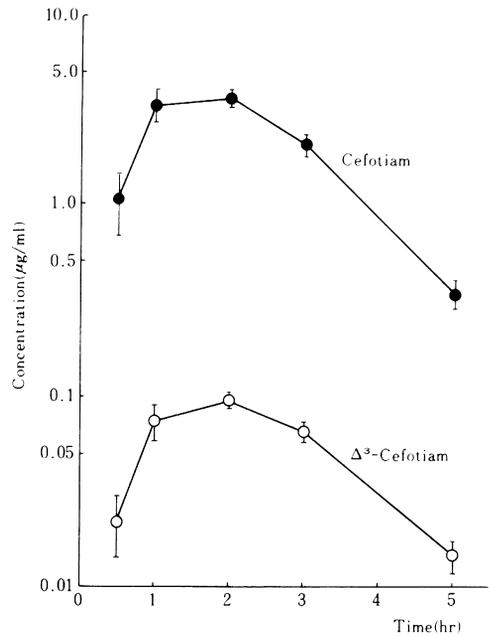


Fig. 6 Plasma levels of cefotiam and Δ^3 -cefotiam after oral administration of cefotiam hexetil (2HCl) (400 mg) to human volunteers. Each point and bar represent the mean and standard error, respectively.

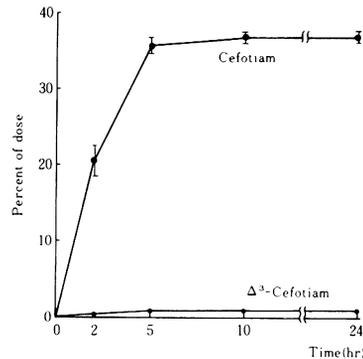


Fig. 7 Cumulative urinary excretion of cefotiam and Δ^3 -cefotiam after oral administration of cefotiam hexetil (2HCl) (400 mg) to human volunteers. Each point and bar represent the mean and standard error, respectively.

は cefotiam 濃度の約 2~3% であった。また尿中には 0~24 時間に、投与量の 37% が cefotiam として、1% が Δ^3 -cefotiam として排泄された (Fig. 7)。 Δ^3 -Cefotiam の排泄量は cefotiam の約 3% で、血漿

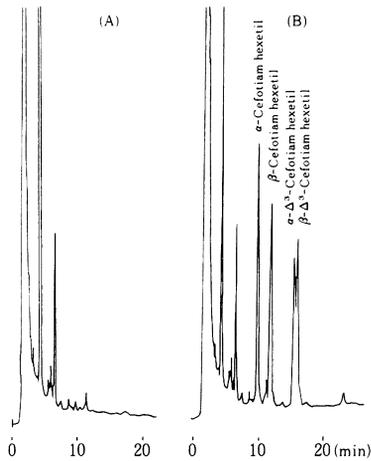


Fig. 8 Chromatograms of control plasma and plasma spiked with cefotiam hexetil and Δ^3 -cefotiam hexetil. (A), Control plasma; (B), Spiked plasma (cefotiam hexetil, 2HCl and Δ^3 -cefotiam hexetil, 2HCl, each 2 $\mu\text{g/ml}$)

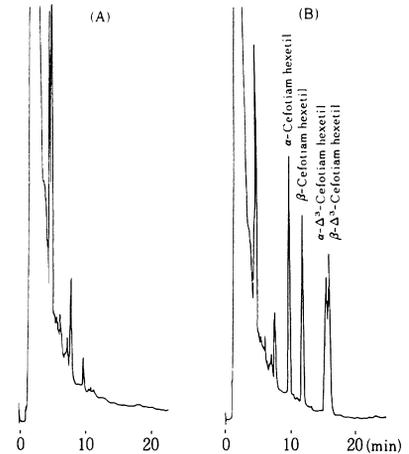


Fig. 9 Chromatograms of control feces and feces spiked with cefotiam hexetil and Δ^3 -cefotiam hexetil. (A), Control feces; (B), Spiked feces (cefotiam hexetil, 2HCl and Δ^3 -cefotiam hexetil, 2HCl, each 2 $\mu\text{g/ml}$)

中の存在比率に相当する値を示した。

2. 血漿および糞中 cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil

2.1. 試料の前処理と HPLC 条件

(1) 血漿

Cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は溶液状態では酸性で安定であるが中性およびアルカリ性で不安定なため、HPLC の移動相は弱酸性とし、実験の部で述べた条件下で HPLC を行うとき、cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は血漿中の妨害成分から良好な分離を示し、その検出下限は 100 ng/ml であった (Fig. 8)。

(2) 糞

Cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil の溶解性および安定性を考慮して糞に 0.1 N 塩酸を加えてスラリー状とし、遠心分離して澄明試料溶液を調製した。実験の部で述べた条件下で HPLC を行うとき、cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は糞中の妨害成分から良好な分離を示し、その検出下限は両成分とも 100 ng/ml であった (Fig. 9)。さらに、この試料溶液について血漿、尿中 cefotiam および Δ^3 -cefotiam の定量に用いた実験条件下で HPLC を行うとき、cefotiam および Δ^3 -cefotiam は糞中妨害成分から良好な分離を示し、その検出下限はともに 200 ng/ml であった。

2.2. 添加検量線および回収率

(1) 血漿

Cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は血漿中において、エステル部が加水分解を受けることが予試験で明らかになったので、エステラーゼを失活させる目的で除蛋白法について検討した。その結果、血漿 0.5 ml に 1 N 塩酸 160 μl を含むアセトニトリル 1 ml を加えて除蛋白すると、cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は良好な回収率を示した。既知量の cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil を添加した血漿について求めた添加検量線は、ほぼ原点を通る良好な直線性を示し (Table 4)、その平均回収率はともに 95% 以上であり、変動係数は 1.6% 以下であった (Table 5)。この除蛋白前処理後の試料溶液は凍結 (-20°C) 下では、1 週間後もほとんど含量変化を示さなかった。

(2) 糞

既知量の cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil および cefotiam, Δ^3 -cefotiam を添加した糞サンプルについて求めた cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil の平均回収率および変動係数は、ともに 73% 以上および 5.6% 以下であり、cefotiam, Δ^3 -cefotiam の平均回収率および変動係数は、ともに 87% 以上および 5.7% 以下であった (Table 5)。添加回収率がやや低い原因としては糞との相互作用が

Table 4 Linearity of calibration curves of cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil from spiked human plasma and fecal extract and of cefotiam and Δ^3 -cefotiam from spiked fecal extract

Sample	Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	r
Plasma	Cefotiam hexetil	0.2 ~4.0	0.999
	Δ^3 -Cefotiam hexetil	0.25~4.0	1.000
Fecal extract	Cefotiam hexetil	0.2 ~4.0	1.000
	Δ^3 -Cefotiam hexetil	0.25~4.0	1.000
Fecal extract	Cefotiam	0.5 ~5.0	1.000
	Δ^3 -Cefotiam	0.5 ~5.0	1.000

r : Correlation coefficient

Table 5 Recovery of cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil from spiked human plasma and feces and of cefotiam, Δ^3 -cefotiam from spiked human feces

Sample	Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	C.V. (%)	n
Plasma	Cefotiam hexetil	2.0	100.8	1.6	5
	Δ^3 -Cefotiam hexetil	2.0	95.5	0.7	5
Feces	Cefotiam hexetil	99.8	92.9	2.7	5
	Δ^3 -Cefotiam hexetil	101.0	73.5	5.6	5
Feces	Cefotiam	160.5	87.5	4.1	5
	Δ^3 -Cefotiam	174.0	90.4	5.7	5

C.V. : Coefficient of variation

n : Number of experiments

Table 6 Cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil and its metabolites in the extract of fecal samples* in the clinical study

Subject	Extract (ml)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
		Cefotiam hexetil	Δ^3 -Cefotiam hexetil	Cefotiam	Δ^3 -Cefotiam
1	1224	<0.1	<0.1	23.1	63.8
2	1040	<0.1	<0.1	33.6	21.1
3	1167	<0.1	<0.1	89.5	65.9
4	1130	<0.1	<0.1	73.7	90.0
5	1125	<0.1	<0.1	52.6	58.1
6	1190	<0.1	<0.1	103.7	126.8
7	1240	<0.1	<0.1	69.3	89.8
8	1090	<0.1	<0.1	15.6	58.3
9	1090	<0.1	<0.1	24.9	55.3
10	1050	<0.1	<0.1	31.1	45.7

* Excreted in the last day after 22 consecutive administration of cefotiam hexetil (2HCl) (400 mg, three times a day) to human volunteers.

推定される。なお、糞の0.1N塩酸抽出液を -20°C で凍結保存すれば、1週間後もほとんど含量低下を示さなかった。

3. 臨床検体中の cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil およびその代謝物濃度

臨床第一相試験において cefotiam hexetil (2 HCl) 200 mg (力価) を投与後 (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 10 および 24 時間) の血漿につき測定した結果, cefotiam hexetil, Δ^3 -cefotiam hexetil はいずれも認められず, 検出下限 (100 ng/ml) 以下であった。一方, cefotiam hexetil (2HCl) 1200 mg (力価)/日, 8 日間連続投与試験における最終日の排泄糞中には cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil はいずれも認められず, 検出下限 (100 ng/ml) 以下であり, それらの加水分解物 cefotiam および Δ^3 -cefotiam が検出された (Table 6)。糞中の Δ^3 -cefotiam 濃度は cefotiam 濃度の 130% であり, 尿中における約 3%, 血漿中における約 2.7% と比較してはるかに高かった。これは未吸収の cefotiam hexetil と腸管内で生じた異性体 Δ^3 -cefotiam hexetil が加水分解を受け, それぞれ cefotiam および Δ^3 -cefotiam となって直接, 糞中に排泄されたものと推定されるが, 一部, 体循環血中に吸収された cefotiam および Δ^3 -cefotiam が胆汁中に排泄された可能性もある。

結 論

Cefotiam hexetil (2HCl) をヒトに経口投与後の cefotiam (親化合物) および Δ^3 -cefotiam の血漿, 尿中濃度を測定するため, HPLC 法による両成分の同時定量法を確立した。本法は cefotiam hexetil (2 HCl) の臨床試験に適用可能であり, 血漿, 尿について定量した cefotiam 濃度は Bioassay 法で測定した濃度と良好な相関性を示した。

次に, cefotiam hexetil (2HCl) の吸収機構, 生物学的利用能の理解のため, 血漿および糞中の cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil の HPLC による定量法を設定した。臨床第一相試験における血漿中には cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は認められず, 体循環血へは cefotiam および一部 Δ^3 -cefotiam として吸収されると推定した。

一方, 糞中にも cefotiam hexetil および Δ^3 -cefotiam hexetil は認められず, それぞれの代謝物 cefotiam および Δ^3 -cefotiam として排泄されることがわかった。

文 献

- 1) TSUCHIYA K, KIDA M, ONO M, TAKEUCHI M, NISHI T: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents & Chemotherapy*. 14 (4): 557~568, 1978
- 2) 西村立雄, 吉村義信, 沼田光雄: セファロsporin エステル誘導体, 特開昭 59-225192
- 3) NISHIMURA T, YOSHIMURA Y, MIYAKE A, YAMAOKA M, TAKANOHASHI K, HAMAGUCHI N, HIRAI S, YASHIKI T, NUMATA M: Orally active 1 (cyclohexyloxycarbonyloxy) alkyl ester prodrugs of cefotiam. *J. Antibiotics* 40: 81~90, 1987
- 4) 山本俊夫, 桑原一郎, 足立幸彦, 山口 登: Cefotiam (SCE-963) 臨床第一相試験. *Chemotherapy* 27 (S-3): 172~180, 1979
- 5) ITAKURA K, MITANI M, AOKI I, USUI Y: High performance liquid chromatographic assay of cefsulodine, cefotiam and cefmenoxime in serum and urine. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (2): 622~627, 1982
- 6) LECAILLON J B, ROUAN M C, SOUPPART C, FEBVRE N, JUGE F: Determination of cefsulodin, cefotiam, cephalixin, cefotaxime, desacetyl-cefotaxime, cefuroxime and cefroxadin in plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 228: 257~267, 1982
- 7) YAMAMURA K, NAKAO M, YAMADA J, YOTSUYANAGI T: Simultaneous determination of cefsulodin and cefotiam in serum and bone marrow blood by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 72: 958~960, 1983
- 8) 畚野 剛, 前田憲一: Cefotiam (SCE-963) の体内濃度測定法. *Chemotherapy* 27 (S-3): 106~111, 1979
- 9) 板倉紘一, 尾上 正, 神戸正幸, 小田容三, 内藤健三, 桑山素明: Cefotiam dihydrochloride の物性および安定性. 武田研究所報 37: 286~296, 1978
- 10) ROUAN M C, ABADIE F, LECLERC A, JUGE E: Systematic approach to the determination of cephalosporins in biological fluids by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 275: 133~144, 1983

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF CEFOTIAM HEXETIL AND ITS METABOLITES IN HUMAN BIOLOGICAL SAMPLES

KENJI YAMASHITA, RYUICHI OHTA, KIKUO YAMAGUCHI, ISAMU AOKI,
KENICHI MAEDA, TAKESHI FUGONO and TAKATSUKA YASHIKI

Analytical Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.,

2-17-85 Juso-honmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

Cefotiam hexetil (2HCL) is a newly developed orally active cephalosporin, whose parent drug is cefotiam. A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was established for the simultaneous determination of cefotiam and Δ^3 -cefotiam in human plasma and urine.

A sample solution was prepared after a plasma sample was deproteinized, concentrated and dissolved in a 0.1 M KH_2PO_4 solution or a urine sample was directly diluted with the 0.1 M KH_2PO_4 solution. The sample solution was loaded onto a reversed-phase ODS column, eluted with a mixture of 0.05 M phosphate buffer (pH7.7) and acetonitrile (88 : 12, V/V) and detected by UV absorbance at 254 nm. Recoveries from the spiked plasma and urine were more than 94% with coefficients of variation below 5%. The lower limits of detection in plasma and urine were 10 ng/ml and 500 ng/ml, respectively. Concentrations of cefotiam in plasma and urine determined by the present method correlated well with those determined by microbiological assay.

For the better understanding of the absorption mechanism or bioavailability of cefotiam hexetil (2HCL), an HPLC method was also established for the simultaneous determination of cefotiam hexetil and Δ^3 -cefotiam hexetil in human plasma and fecal samples. A sample solution was prepared after a plasma sample was immediately deproteinized and diluted with the mobile phase or a fecal sample was immediately extracted with 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M KH_2PO_4 .

An ODS column, a mobile phase (0.1 M KH_2PO_4 , acetonitrile and acetic acid (72 : 28 : 1, V/V)) and a UV detector at 254 nm were employed for HPLC. When the method was applied to clinical samples, neither cefotiam hexetil nor Δ^3 -cefotiam hexetil was detected in plasma and fecal samples, but cefotiam and Δ^3 -cefotiam were detected in the fecal samples after oral administration of cefotiam hexetil (2HCL) to human volunteers.