

## ガスクロマトグラフィーによる Cefotiam hexetil (2HCl) のエステル側鎖代謝物の測定

岡田好弘・浅井大丈夫・安松幹夫  
竹田益雄<sup>a)</sup>・三浦高義<sup>a)</sup>

武田薬品工業株式会社中央研究所\*

(<sup>a)</sup>現、武田薬品工業株式会社技術管理本部)

新規な経口用セファロスポリン cefotiam hexetil (CTM-HE) (2HCl) のヒトにおける薬物動態を調べる目的で、CTM-HE (2HCl) のエステル側鎖代謝物であるシクロヘキサノール (CH) およびシクロヘキサンジオール (CHD) 類の血漿中および尿中測定法を確立した。本法は、試料からこれらの代謝物をエーテルまたはアセトニトリルにより別個に抽出し、カラム充てん剤として 10% SE-30 および 0.5% FFAP をコーティングしたのを用い、ガスクロマトグラフ法により分析するものである。定量限界は、CH については血漿中および尿中ともに 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、CHD 類については血漿中で 0.025  $\mu\text{g/ml}$ 、尿中で 1.0  $\mu\text{g/ml}$  であった。本法を CTM-HE (2HCl) の臨床第一相試験における CH および CHD 類の測定に適用し、その有用性を確認した。

**Key words :** Cefotiam hexetil, 定量, ガスクロマトグラフィー, 代謝物, 臨床第一相試験

(RS) -1- (Cyclohexyloxy) ethyl (+)  
(6R,7R) -7-[2- (2-amino-4-thiazolyl) acetamido]  
-3-[[[1- (2-dimethylaminoethyl) -1H-tetrazol-5-yl]  
thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-  
-ene-2-carboxylate dihydrochloride (Cefotiam hexetil  
又は CTM-HE (2HCl)) は西村ら<sup>1)</sup>によって合成された  
新規な経口用セファロスポリンで、セフォチアム  
(CTM) のエステル型プロドラッグである。この化合物  
は各種の実験動物において経口投与により吸収され、主  
として CTM として全身循環されるが、マウスおよびラ  
ットでは同時に CTM-HE (2HCl) の側鎖由来の成分と  
してシクロヘキサノールが生成し、主としてシクロヘキ  
サンジオールに代謝される<sup>2)</sup>。著者らはこれらの側鎖由  
来の成分を迅速に分析するために、GC による分析法を  
確立し、その方法を用いて臨床第一相試験<sup>3)</sup>における血  
漿中および尿中のシクロヘキサノールおよびシクロヘキ  
サンジオール類の測定を行ったので報告する。

### I. 方 法

#### 1. 装 置

遠心器：国産遠心器製 H-108N 型を使用した。  
ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-7A およ  
び 9A 型 (検出器 FID) を使用した。

#### 2. 試 薬

シクロヘキサノール (CH)、トランス-1,2-シクロ  
ヘキサンジオール (*trans*-1,2-CHD)、1,3-シクロヘ  
キサンジオール [シスおよびトランスの混合物 (1,  
3-CHD)]、シクロヘプタノン (CHN)、シクロオク  
タノン (CON) および  $\alpha$ -ナフチルメチルエーテル  
(NME) は東京化成工業製の一級品を、1,4-シクロ  
ヘキサンジオール [シスおよびトランスの混合物  
(1,4-CHD)] およびジエチレングリコール (DEG)  
は和光純薬製の一級品を、1-クロロナフタリン  
(CNP) は和光純薬製の化学用を、n-ヘキサンおよび  
アセトニトリルは和光純薬製の液体クロマトグラフ  
用を、4N および 0.1N 水酸化ナトリウム液は和光  
純薬製の容量分析用を、 $\beta$ -グルクロニダーゼは

Sigma 社製 (type IX, *E. coli* 由来) を, その他の試薬は和光純薬製 JIS 試薬特級品または和光特級品を用いた。血漿および尿は健康人男子から得たものを凍結保存 (約  $-20^{\circ}\text{C}$ ) し, 用時解凍して用いた。

### 3. 試液および標準原液

・CH 分析用標準原液 (CH 標準原液: CH 約 1 mg/ml を含む)

CH 約 50 mg に水を加えて正確に 50 ml とし, CH 標準原液とした。本原液は用時調製した。

・CHD 分析用標準原液 (CHD 標準原液: *trans*-1, 2-CHD と 1, 4-CHD それぞれ約 1 mg/ml を含む)

*trans*-1, 2-CHD および 1, 4-CHD それぞれ約 50 mg を同一容器に精密に量り, 水を加えて正確に 50

ml とし, CHD 標準原液とした。本原液は用時調製した。

#### ・DEG 溶液

DEG 2 ml にエーテルを加えて 100 ml とした。

#### ・0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8)

リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 12.8 g とリン酸一水素ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 37.8 g に水約 900 ml を加えて溶かし, 薄めたリン酸 (1 → 10) または 0.1 N 水酸化ナトリウム液で pH 6.8 に調整した後, 水を加えて正確に 1,000 ml とした。

・CH 分析用  $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液 (2,900 単位/ml)

$\beta$ -グルクロニダーゼを 0.2 M リン酸塩緩衝液

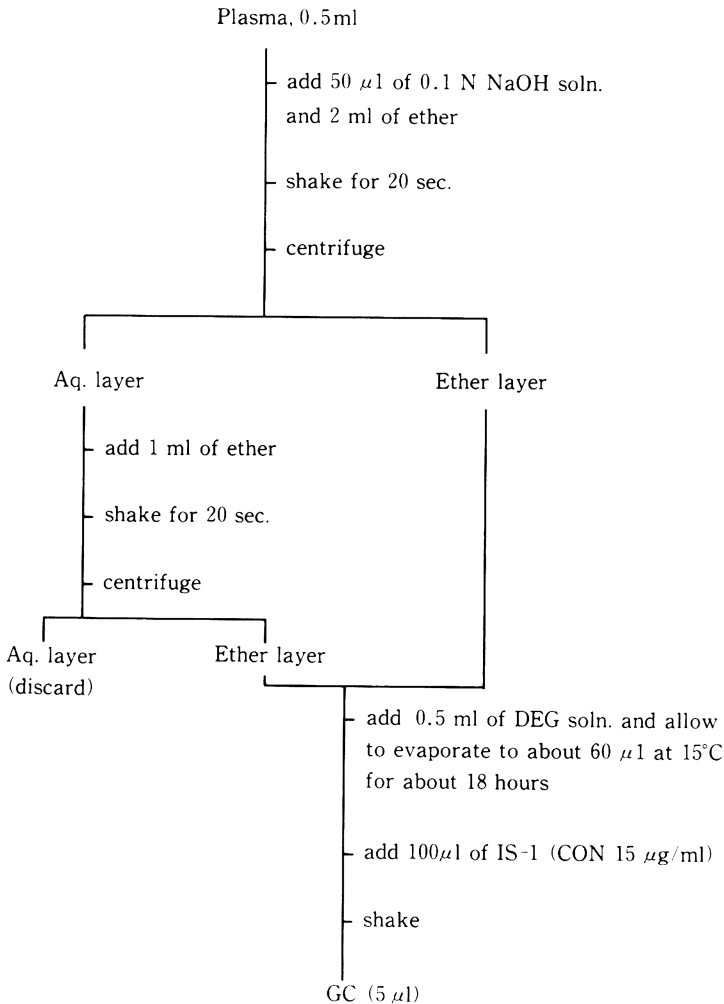


Fig. 1 Preparation of Sample Solution for Cyclohexanol in Plasma

(pH 6.8) に溶かし, 2,900 単位/ml とした。本溶液は用時調製した。

- 1.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8)

リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 76.8 g とリン酸一水素ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 226.8 g に水約 900 ml を加えて溶かし, 薄めたリン酸 (1 → 10) または 0.1 N 水酸化ナトリウム液で pH 6.8 に調整した後, 水を加えて正確に 1,000 ml とした。

- CHD 分析用  $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液 (5,400 単位/ml)

$\beta$ -グルクロニダーゼを 1.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) に溶かし, 5,400 単位/ml とした。本溶液は用時調製した。

- 血漿中 CH 分析用内標準液 (IS-1: CON 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  または 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

CON 50 mg を 95 v/v% エタノール 50 ml に溶かした。この液 3 ml に水を加えて 100 ml とした (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。この液 10 ml に水を加えて 20 ml とした (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

- 尿中 CH 分析用内標準液 (IS-2: CHN 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  または 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

CHN 50 mg を 95 v/v% エタノール 50 ml に溶かした。この液 2 ml に水を加えて 100 ml とした (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。この液 10 ml に水を加えて 20 ml とした (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

- 血漿中 CHD 分析用内標準液 (IS-3: NME 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

NME 50 mg をアセトニトリル 50 ml に溶かした。この液 2 ml にアセトニトリルを加えて 50 ml とした。

- 尿中 CHD 分析用内標準液 (IS-4: CNP 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

CNP 100 mg をアセトニトリル 50 ml に溶かした。この液 4 ml にアセトニトリルを加えて 50 ml とした。

#### 4. 試料溶液および標準溶液の調製

##### 4.1 血漿分析用試料溶液および標準溶液

###### (1) CH 測定用

解凍した血漿 0.5 ml をスピッツロールにとり, 0.1 N 水酸化ナトリウム液 50  $\mu\text{l}$  およびエーテル 2 ml を加え, 20 秒間激しく振り混ぜた。この液を遠心分離し, 上清液を別のスピッツロールに移した。さらに下層液にエーテル 1 ml を加え, 20 秒間激しく振り混ぜた。この液を遠心分離し, 上清液を先の上

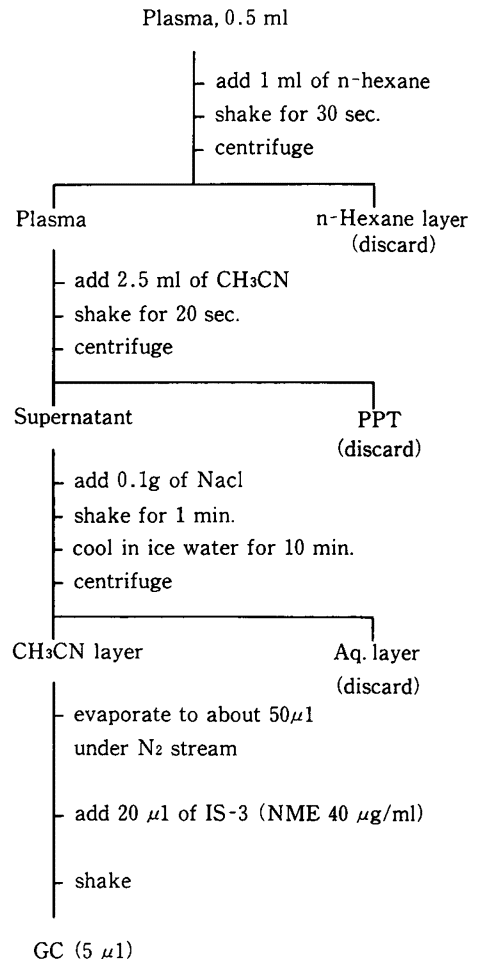


Fig. 2 Preparation of Sample Solution for Cyclohexanediols\* in Plasma

\* 1,2-CHD and "1,3-CHD+1,4-CHD"  
CHD: cyclohexanediol

清液と合わせ, この液にジエチレングリコール溶液 0.5 ml を加え, 開栓してスピッツロールの頸部まで水浴 (15 ± 1°C) 中に浸し, 18 時間静置し, 約 60  $\mu\text{l}$  まで濃縮した。濃縮液に IS-1 (CON 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 100  $\mu\text{l}$  を正確に加え, 試料溶液とした。この試料溶液の調製方法のフローシートを Fig. 1 に示す。

CH 標準原液を適当に薄めた液 50  $\mu\text{l}$  に IS-1 (CON 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 50  $\mu\text{l}$  を正確に加え CH 測定用標準溶液とした。別に健康男子の血漿 0.5 ml をスピッツロールにとり, 水で 100 倍に薄めた CH 標準原液 (CH 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 50  $\mu\text{l}$  を正確に加え, 以下, 血漿中の CH 測定用試料溶液の調製方法に準じて操作を

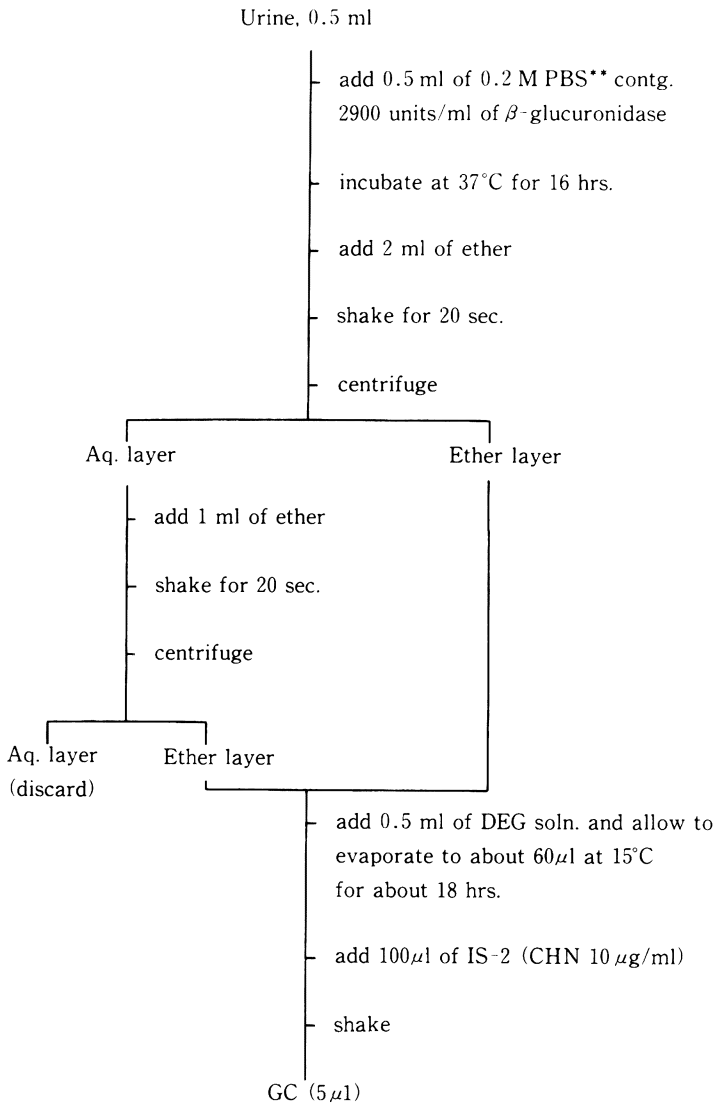


Fig. 3 Preparation of Sample Solution for Cyclohexanol\* in Urine

- \* Cyclohexanol and its glucuronide
- \*\* 0.2 M Phosphate buffer of pH 6.8

行い、回収率補正用標準溶液を調製した。

#### (2) CHD 測定用

Fig. 2 に示す試料溶液の調製方法により試料溶液を調製した。

CHD 標準原液を水で適当に薄めた液 50  $\mu$ l に 20  $\mu$ l の IS-3 を正確に加え、CHD 測定用標準溶液とした。別に健康男子の血漿 0.5 ml をスピッツロール

にとり、水で 100 倍に薄めた CHD 標準原液 (*trans*-1,2-CHD および 1,4-CHD それぞれ 10  $\mu$ g/ml を含む) 50  $\mu$ l を正確に加え、以下、血漿中の CHD 測定用試料溶液の調製方法に準じて操作を行い、回収率補正用標準溶液を調製した。

#### 4.2 尿分析用試料溶液および標準溶液

##### (1) CH 測定用

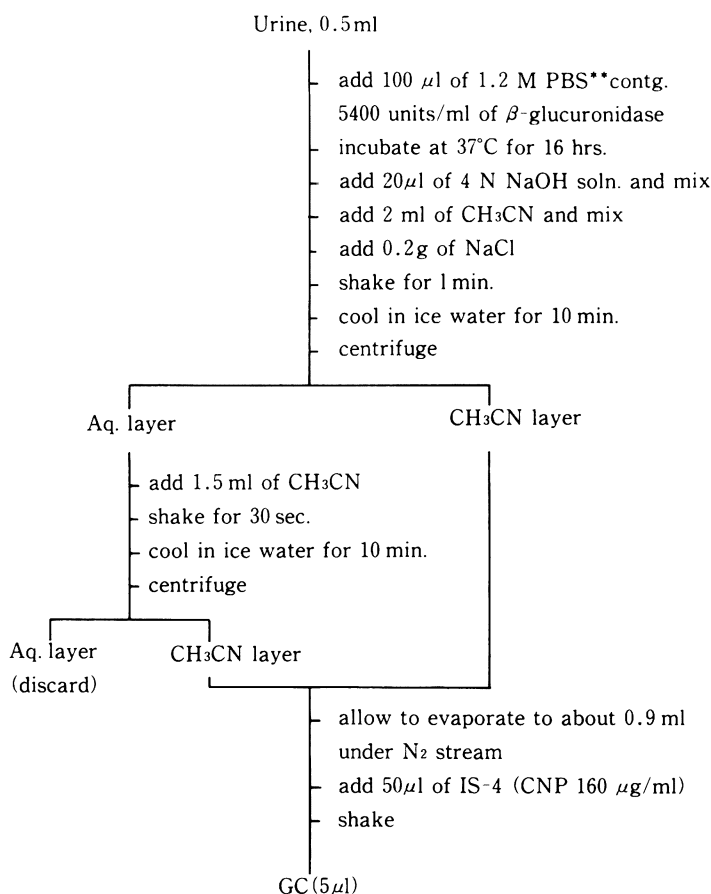


Fig. 4 Preparation of Sample Solution for Cyclohexanediols\* in Urine

- 1,2-CHD (free+glucuronide) and 1,3-CHD  
+1,4-CHD (free+glucuronide)
- • 1.2 M Phosphate buffer of pH 6.8

CHD: cyclohexanediol

Fig. 3 に示す試料溶液の調製方法により試料溶液を調製した。

CH 標準原液を水で適当に薄めた液 50  $\mu$ l に IS-2 (CHN 20  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l を正確に加え、CH 測定用標準溶液とした。別に健常男子の尿 0.5 ml をスピットロールにとり、水で 100 倍に薄めた CH 標準原液 (CH 10  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l を正確に加え、以下、尿中の CH 測定用試料溶液の調製方法に準じて操作を行い、回収率補正用標準溶液を調製した。

#### (2) CHD 測定用

Fig. 4 に示す試料溶液の調製方法により試料溶液

を調製した。

CHD 標準原液を水で 10 倍に薄めた液一定量を取り、アセトニトリルを加えて全量 0.9 ml とし、この溶液に 50  $\mu$ l の IS-4 を正確に加え、尿中 CHD 測定用標準溶液とした。別に健常男子の尿 0.5 ml をスピットロールにとり、水で 100 倍に薄めた CHD 標準原液 (*trans*-1,2-CHD および 1,4-CHD それぞれ 10  $\mu$ g/ml を含む) 50  $\mu$ l を正確に加え、以下、尿中の CHD 測定用試料溶液の調製方法に準じて操作を行い、回収率補正用標準溶液を調製した。

#### 5. ガスクロマトグラフィー

Table 1 GC conditions

Conditions	for Cyclohexanol	for Cyclohexanediol
Column	1.6m×3mm i.d., glass	
Packing	10% SE-30+0.5% FFAP on Shimalite W (AW-DMCS, 60-80 mesh)*	
Temperature Column Inlet	110°C** 200°C	135°C 180°C
Carrier gas	He, 60ml/min.	

\* Shimadzu's pre-packed column was used.

\*\* After the run time was over, the column temperature was raised to 180°C at a rate of 16°C per minute and maintained at the temperature for about 1 hour to purge diethylene glycol from the column. Then the column was allowed to cool to 110°C. After a stable baseline was obtained, the next sample was injected onto the column.

各試料溶液、標準溶液および回収率補正用標準溶液 5  $\mu$ l につき、Table 1 に示す条件でガスクロマトグラフィーを行い、得たクロマトグラムの内標準物質のピーク高さに対する被検物質のピーク高さの比から、試料中の被検物質の濃度を算出した。

## II. 結果および考察

### 1. CH 分析のための前処理法の検討

CH はエーテルに可溶であるので、血漿の場合、常法<sup>5)</sup>により、アルカリ性 (pH 約 11) におけるエーテル抽出法を試み、血漿中の妨害成分が除去できることを確認した。濃縮方法として、窒素気流下およびロータリーエバポレーターによる濃縮を試みたが、回収率が 60% 以下と低く、かつ、再現性も悪かった。CH の揮散による損失が考えられたため、水、アルコールおよびエーテルに可溶で高沸点の DEG (bp=245°C) を添加し、濃縮条件を検討した。蒸発乾固すると回収率が低くなったので、乾固直前 (約 60  $\mu$ l) まで濃縮するため、なるべく穏やかな条件を調べた。濃縮時間は 15°C の水浴中で約 18 時間、25°C の水浴中で約 9 時間、30°C の水浴中で約 5 時間をそれぞれ要した。作業性を考えて濃縮条件として 15°C の水浴中一夜 (約 18 時間) 自然蒸発とした。動物実験において、CH は水酸化およびグルクロン酸抱合を受けて尿中に排泄されることが知られている<sup>6,7)</sup> ので、臨床第一相試験<sup>3)</sup> における投与後 2~8 時間のプール尿 0.5 ml に  $\beta$ -グルクロナダーゼの 0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) 溶液 (2,900 u/ml)

0.5 ml を加え、37°C で 16 時間および 24 時間インキュベートした。このように酵素処理したものを未処理のものと比較したところ、ELLIOTT ら<sup>7)</sup> のウサギにおける実験結果と同様、ヒトにおいても CH の大部分が抱合体として存在していることがわかった。なお、脱抱合時間 16 時間と 24 時間で CH の測定値に差がなかったため、インキュベート時間は 16 時間とし、この条件を酵素活性の確認にも利用することにした。すなわち、プール尿を 16 時間と 24 時間インキュベートし、有意差がない酵素を使用することにした。

### 2. CHD 分析のための前処理法の検討

CHD はエーテルに難溶で、水、アルコールおよびアセトニトリルに可溶であるので、アセトニトリルによる抽出を試みた。血漿の場合、妨害成分を除去するため脂溶性成分の除去と除蛋白操作が必要であった。常法<sup>5)</sup>により、血漿を n-ヘキサンで抽出した後、アセトニトリルを加え、塩化ナトリウムで塩析することで目的を達した。濃縮操作は窒素気流下でも、CH の場合のような揮散損失の問題はなく、*trans*-1,2-CHD は 97.1%、1,3-CHD は 86.9%、1,4-CHD は 92.2% と、それぞれ回収率は良好であった。尿の場合も、常在成分由来の妨害ピークがアセトニトリルに転溶されることがわかったため、アルカリ性 (pH 8~10) における抽出を試み、妨害成分をかなり除去できることを確認した。血漿の場合のようにクリーンアップできなかったが、通常、尿中濃度は血中の約 10 倍であるので、濃縮後の容量を

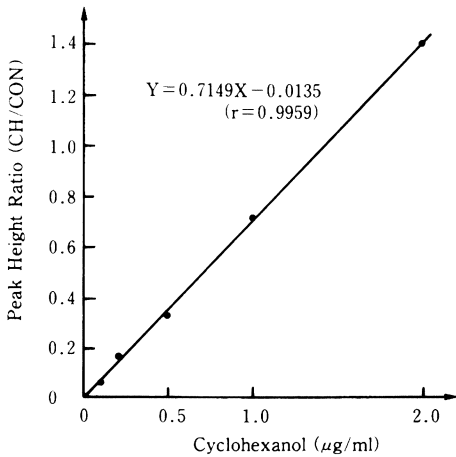


Fig. 5 Calibration Curve of CH spiked in Control plasma

CH : cyclohexanol, CON : cyclooctanone

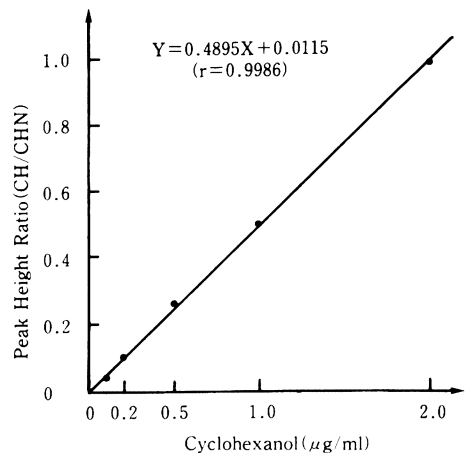


Fig. 6 Calibration Curve of CH spiked in Control urine

CH : cyclohexanol, CHN : cycloheptanone

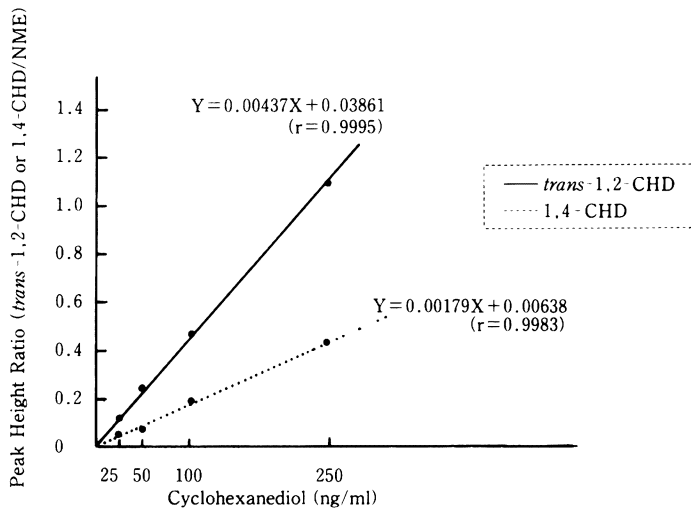


Fig. 7 Calibration Curves of t-1,2-CHD and 1,4-CHD spiked in Control plasma

CHD : cyclohexanediol, NME : 1-naphthyl methyl ether

血漿の場合の約10倍量の約1mlにとどめることにした。なお、1,2-CHDは動物でグルクロン酸抱合を受けて尿に排泄される<sup>2)</sup>ので、CHの処理法に準じて、前記のプール尿0.5mlに、 $\beta$ -グルクロニダーゼの1.2Mリン酸塩緩衝液(pH6.8)溶液(5,400u/ml)0.1mlを加え、37°Cで16時間および24時間インキュベートした。ここにおいて酵素液の添加量を少なくしたのは抽出時の層分離をよくするためであり、緩衝液の濃度を濃くしたのは、変化しやすい

尿のpHを至適pHに維持するためである。その結果、1,2-CHDについてはCHと同様の結果を得た。すなわち、棚山ら<sup>2)</sup>およびELLIOTTら<sup>7)</sup>の動物実験の結果と同様、ヒトにおいても大部分が抱合体として存在していた。一方、1,3-CHD+1,4-CHDは酵素処理の有無にかかわらずほぼ同じ値となった。これも棚山ら<sup>2)</sup>の実験結果と同様で1,3-CHDおよび1,4-CHDはそれ自体水溶性が高いため、グルクロン酸抱合を受け難いものと考えられる。

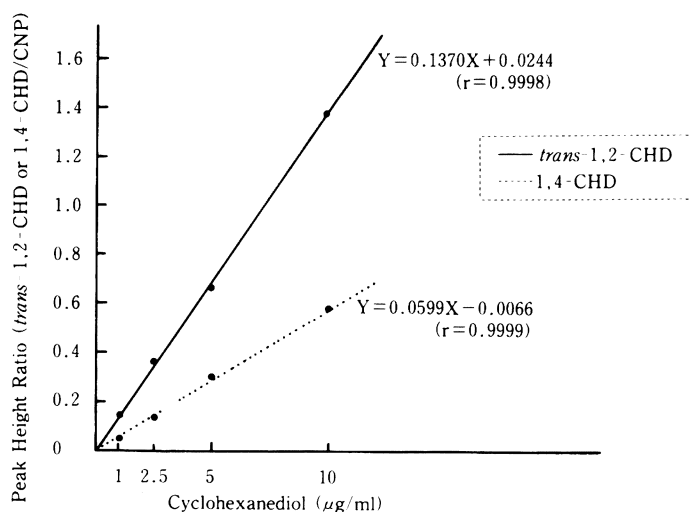


Fig. 8 Calibration Curves of *t*-1,2-CHD and 1,4-CHD spiked in Control urine  
CHD: cyclohexanediol, CNP: chloronaphthalene

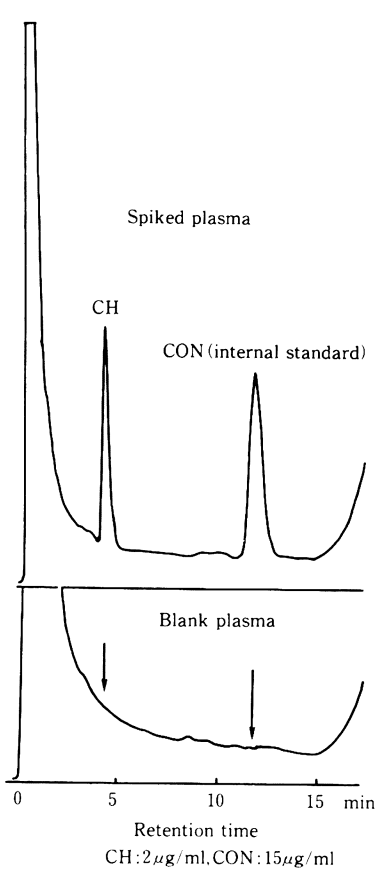


Fig. 9 Gas chromatograms of blank plasma and spiked human plasma for CH  
CH: cyclohexanol

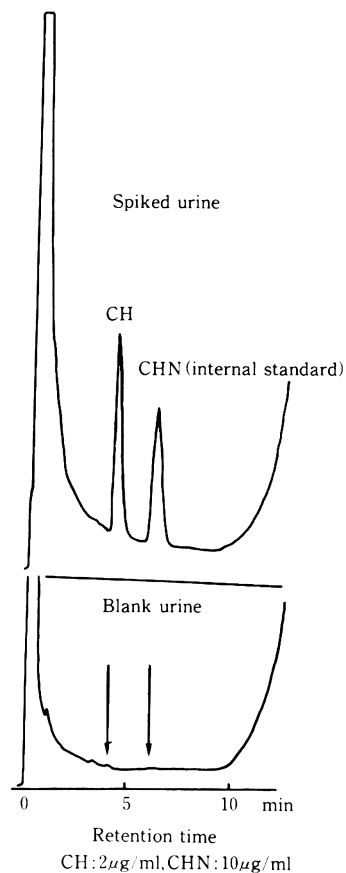


Fig. 10 Gas chromatograms of blank urine and spiked human urine for CH  
CH: cyclohexanol



### 3. ガスクロマトグラフィー

CH と CHD の一斉分析を目的として、昇温 GC による分析を試みたが、高感度ではベースラインが著しく変動し、コントロールが困難な上、同一の試料処理方法と GC 条件により、CH と CHD を生体中の常在成分の妨害なしに高い回収率で測定する方法を見出すことは困難であった。また、CHD 類の完全分離分析は LEVINA らが試みているようにきわめて困難と考えられたので、CH と CHD は別々に分析することにしたが、多数試料の処理が可能なように、GC における分離、操作の簡便さ、標品の入手の容易さなどを考慮し、CHD 類の GC 分析においては 1,2-CHD と (1,3-CHD+1,4-CHD) の 2 つのピークとして分離定量することにし、それぞれの群

の標準物質としては *trans*-1,2-CHD および 1,4-CHD (シスおよびトランスの混合物) を用いることにした。カラムとしては、溶媒ピークが小さく、カラム温度を変えるのみで CH および CHD の測定に共用でき、ピークの形状が比較的良く、被検物質が 20 分間以内で溶出する "10% SE-30+0.5% FFAP"/Shimalite W を用いることにした。内標準物質は被検物質のピークに近く、かつ、試料中の妨害成分のピークに重ならない化合物を検討し、血漿中の CH 分析用には CON を、CHD 分析用には NME を、尿中の CH 分析用には CHN を、CHD 分析用には CNP をそれぞれ選定した。

### 4. 検量線

方法の部 4.1 および 4.2 の操作方法に従って作成

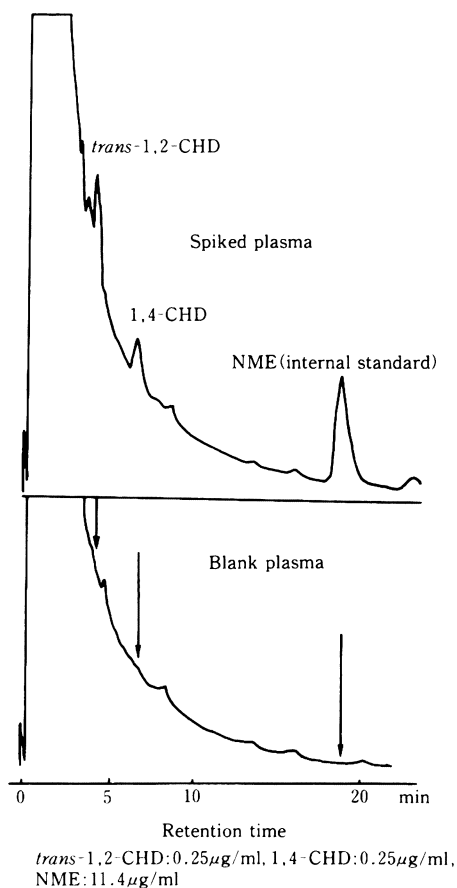


Fig. 11 Gas chromatograms of blank plasma and spiked human plasma for CHD

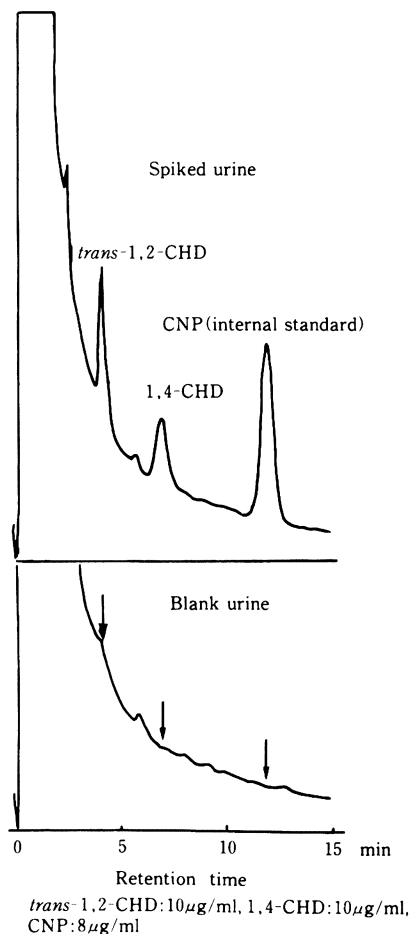


Fig. 12 Gas chromatograms of blank urine and spiked human urine for CHD

Table 2 Recovery of the analytes spiked in human plasma and urine

Analyte		Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%) <sup>*</sup>		Limit of Determination
			Mean	RSD	
Human Plasma	CH	0.1, 0.2, 0.5, 1, 2	74.5	11.1	0.1 $\mu\text{g/ml}$
	<i>trans</i> -1,2-CHD	0.025, 0.05, 0.1, 0.25	95.0	7.8	0.025 $\mu\text{g/ml}$
	1,4-CHD	0.025, 0.05, 0.1, 0.25	78.2	13.5	0.025 $\mu\text{g/ml}$
Human Urine	CH	0.1, 0.2, 0.5, 1, 2	72.7	11.0	0.1 $\mu\text{g/ml}$
	<i>trans</i> -1,2-CHD	1, 2.5, 5, 10	95.9	9.8	1.0 $\mu\text{g/ml}$
	1,4-CHD	1, 2.5, 5, 10	78.0	2.3	1.0 $\mu\text{g/ml}$

<sup>\*</sup> Recoveries for CH and CHDs are expressed as the mean values of five and four determinations, respectively.

CH: cyclohexanol, CHD: cyclohexanediol

Table 3 Plasma levels of CH and CHDs after oral administration of 400 mg (potency) of cefotiam hexetil (2HC1) in 20 healthy volunteers

(concentration: ng/ml plasma)

Time after dosage	0.5 hr	1 hrs	2 hrs	3 hrs	5 hrs	10 hrs	24 hrs
CH	Mean	0	94	108	53	6	0
	S.D.	0	101	105	77	25	0
	S.E.	0	23	24	17	6	0
	Range	0	0-270	0-320	0-180	0-110	0
1,2-CHD	Mean	57	383	876	1073	1220	965
	S.D.	87	199	217	279	502	241
	S.E.	20	44	49	62	112	54
	Range	0-290	140-850	560-1460	590-1600	510-2550	490-1450
1,3-&1,4-CHDs	Mean	0	74	287	334	406	305
	S.D.	0	79	82	84	203	78
	S.E.	0	18	18	19	45	18
	Range	0	0-230	190-400	210-570	160-910	150-460

S.D.: standard deviation, S.E.: standard error

CH: cyclohexanol, CHD: cyclohexanediol

した添加検量線を Fig. 5~8 に示す。

CH については血漿および尿とも 0.1~2.0  $\mu\text{g/ml}$ , CHD については血漿で 25~250 ng/ml, 尿で 1~10  $\mu\text{g/ml}$  の添加量の範囲でほぼ原点を通る直線が得られ, 血漿および尿中の常在成分に由来する妨害はほとんど見られなかった。代表的なクロマトグラムを Fig. 9~12 に示す。

##### 5. 添加回収率および精度

血漿および尿に CH および *trans*-1,2-CHD+1,4-CHD を添加したときの各添加濃度水準における回収率の平均値とその相対標準偏差 (RSD%) および検出限界を Table 2 に示す。

血漿および尿とも, 添加回収率が若干低く, バラツキも比較的大きかったので, 試料と同時に回収率補正用標準溶液についても測定を行い, その値で試料の回収率を補正することにした。

Table 4 Urinary excretion of CH\* and CHDs\* after oral administration of 400 mg (potency) of cefotiam hexetil (2HCl) in 20 healthy volunteers

Time (hr)	Urinary concentration* ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	CH	1,2-CHD	1,3-&1,4-CHDs
0-2	3.20 $\pm$ 0.46	6.25 $\pm$ 0.65	4.41 $\pm$ 0.42
2-5	1.06 $\pm$ 0.13	17.75 $\pm$ 1.68	8.12 $\pm$ 0.65
5-10	0.15 $\pm$ 0.04	22.18 $\pm$ 2.19	8.24 $\pm$ 0.71
10-24	<0.10	19.98 $\pm$ 0.97	7.83 $\pm$ 0.31

Time (hr)	Cumulative urinary excretion* (% of dose)			
	CH	1,2-CHD	1,3-&1,4-CHDs	Total
0-2	0.36 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.04	1.38 $\pm$ 0.03
0-5	0.64 $\pm$ 0.13	4.20 $\pm$ 0.20	2.10 $\pm$ 0.12	6.94 $\pm$ 0.21
0-10	0.69 $\pm$ 0.08	10.61 $\pm$ 0.40	4.54 $\pm$ 0.21	15.84 $\pm$ 0.55
0-24	0.70 $\pm$ 0.08	22.64 $\pm$ 0.51	9.30 $\pm$ 0.28	32.64 $\pm$ 1.19

\* free+glucuronide, mean $\pm$ S.E.

CH: cyclohexanol, CHD: cyclohexanediol

## 6. 臨床検体への応用

臨床第一相試験<sup>3)</sup>における血漿および尿中の CH および CHD 類の濃度の測定を行った。

血漿および尿中とも 1,2-CHD の濃度が最も高く、1,3-CHD+1,4-CHD の約 2~3 倍量が検出されたが、CH はわずかに検出されたにすぎなかった。CTM-HE (2HCl) 400 mg (力価) の経口投与を行った場合<sup>3)</sup> の血漿中濃度の測定結果の一例を Table 3 に示す。

薬物投与前の試料ではいずれも妨害ピークは全く検出されなかったが、投与後の試料で被験者によっては血漿中の妨害成分が CHD 類の保持時間にきわめて接近して現れ、測定結果に影響を与える場合があった。今回は、予測できない試料のため試料量不足で検討できなかったが、より再現性のよい測定を行うためにはより厳密なクリーンアップ法を検討する必要がある。1,2-CHD はどの時間においても、1,3-CHD+1,4-CHD の約 2~3 倍量が検出された。CH は CTM-HE (2HCl) の投与後 1~5 時間において、わずかに 6~108 ng/ml 程度検出され、その後、比較的速やかに消失した。上記血漿中濃度測定時に採尿し、尿中排泄率を測定した結果を Table 4 に示す。

薬物投与前の試料で CHD 類と同一保持時間にわずかにピークが見られたので、CHD 類の測定では

補正を行ったが、CH では全く見られなかったので補正を行わなかった。主代謝物は CHD で、その中、1,2-CHD が最も多く、1,3-CHD+1,4-CHD の約 2 倍量が排泄された。CH は比較的少なく投与後 24 時間でほぼ排泄が終了した。投与後 24 時間までの CTM-HE (2HCl) のエステル側鎖代謝物の平均総排泄率は投与量の 32.64% であった。

## III. 結 語

ヒトの血漿および尿中の CTM-HE (2HCl) のエステル側鎖代謝物の GC による濃度測定法を設定し、臨床第一相試験における測定に適用した。ヒトの血漿中には主として 1,2-CHD が見られ 1,3-CHD+1,4-CHD の約 2~3 倍量が検出され、CH はわずかに検出されたに過ぎなかった。一方、ヒトの尿中においても 1,2-CHD が主として排泄され、1,3-CHD+1,4-CHD の約 2 倍量が排泄された。CH は比較的少なく、投与後 24 時間でほぼ排泄が終了した。本検討では、普及性の高い機器と試薬で行える分析条件の確立を目指したので、CH と CHD 類の一斉分析および 1,3-CHD と 1,4-CHD の分離はできなかった。しかし、本法は少量の試料で CH および CHD 類を高感度に再現性よく測定できるので生体試料のルーチン分析に十分適用できると考える。より綿密な分

離定量を行うためには、ランニングコストの面で難はあるが、GC-MS による方法が有用と考える。

### 文 献

- 1) 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
- 2) 棚山薫晴, 吉田清志, 三谷政義, 塚本剛司, 鳥井 洋: 新規経口セファロスポリン Cefotiam hexetil のラット、マウスとイヌにおける生体内運命—エステル側鎖由来成分を中心にした検討—。Chemotherapy

投稿中

- 3) 立野政雄, 杉山一郎, 衣非 脩: Cefotiam hexetil の臨床第一相試験。Chemotherapy 投稿中
- 4) LEVINA OV, ZNAMENSKAYA AP, ZHEMCHUGOVA LM: *Gazov. Khromatogr.*, 3: 116~119, 1965, (CA, 68: 92808z, 1968)
- 5) 久保博昭: 生体試料の扱い方 (下)。月刊薬事 26: 145~150, 1984
- 6) BROWNING E: Toxicity and metabolism of industrial solvents. Elsevier Publishing Company, 385~387, 1965
- 7) ELLIOTT TH, PARKE DV, WILLIAMS RT: The metabolism of cyclo<sup>[14C]</sup> hexane and its derivatives. *Biochem. J.* 72: 193~199, 1959

## GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF METABOLITES OF THE ESTER SIDE-CHAIN OF Cefotiam hexetil (2HCL) IN HUMAN PLASMA AND URINE

YOSHIHIRO OKADA, MASURAO ASAI, MIKIO YASUMATSU,  
MASAO TAKEDA\* and TAKAYOSHI MIURA\*

Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.,  
2-17-85 Juso-honmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

(\*Present address: Corporate Technology, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka)

For determining the metabolites of the ester side-chain of a newly developed oral cephalosporin, cefotiam hexetil (CTM-HE) (2 HCl), a gas chromatographic method has been established. The objective metabolites in biological materials, cyclohexanol (CH) and cyclohexanediols (CHDs), were extracted individually from biological fluids with ether or acetonitrile and then analyzed by gas chromatography using column packings coated with 10% SE-30 and 0.5% FFAP. The determination limit for CH was 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in both plasma and urine, and the limits for CHDs were 0.025  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in plasma and 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in urine. This method was applied to the determination of CH and CHDs in clinical trials of CTM-HE (2 HCl) and has proved useful for pharmacokinetic studies.