

## 高速液体クロマトグラフィー電気化学検出法及び bioassay 法による 血中 Sulbactam 濃度の高感度測定法

下岡新雄・伊藤正実・松本京子・新美博仕・松永敏幸・川崎賢二  
台糖ファイザー(株)新薬開発センター\*

Ampicillin (ABPC) 存在下の Sulbactam (SBT) の高感度測定法として、高速液体クロマトグラフィー法及び bioassay 法について検討し、以下に示す二種の SBT 濃度測定法を開発した。

1) SBT をヒドロキシルアミンと反応させた後、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出法を用いることにより血中の SBT 濃度を  $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$  まで測定することができた。

なお、この方法は試料中に共存する  $\beta$ -lactam 抗生物質 ABPC, Cefoperazone (CPZ) 等の影響を受けなかった。

2) SBT の bioassay 法として  $\beta$ -lactamase を産生し、ABPC に高度耐性を示す *Branhamella catarrhalis* No. 8 を検定菌とし、ABPC 含有培地上で SBT の  $\beta$ -lactamase 阻害効果を利用した SBT の高感度測定法を確立した。

なお、検定菌には *B. catarrhalis* に加えて ABPC 感受性の *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を併用することによって、鮮明な阻止円が形成された。本法における血中の SBT 濃度の測定感度は  $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

今回開発した上述の HPLC 法及び bioassay 法により患者の血清中 SBT 濃度を測定した結果、両法とも良好な相関関係が認められた。

**Key words:** Sulbactam, 高速液体クロマトグラフ法, bioassay, 高感度測定法

Sulbactam (SBT: (2S, 5R)-3, 3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3. 2. 0] heptane-2-carboxylate 4, 4-dioxide) はファイザー社中央研究所で開発された  $\beta$ -lactamase 阻害剤であり<sup>1)</sup>、SBT と Cefoperazone (CPZ) 力価比 1:1 の注射用配合剤<sup>2)</sup>、SBT と Ampicillin (ABPC) 力価比 1:2 の注射用配合剤<sup>3)</sup>、及び SBT, ABPC の mutual prodrug である Sultamicillin (SBTPC)<sup>4)</sup> として用いられ、各種  $\beta$ -lactamase 産生能を有する耐性菌に対して優れた抗菌力を発揮することが知られている。

$\beta$ -lactam 抗生物質存在下の SBT の分析法としては従来、紫外吸光度検出による高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法)<sup>5)</sup>、CPZ 存在下で *Escherichia coli* 603 を検定菌とする bioassay 法<sup>6)</sup>、ABPC 存在下で *Escherichia coli* 273 を検定菌とする bioassay 法<sup>7)</sup> があるが、いずれも測定感度が  $0.4\sim 2\mu\text{g}/\text{ml}$  程度であり、満足しうるものではなかった。

高感度分析法としては、SBT をメチルエステルとして測定するガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS 法): 測定感度  $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>8)</sup>、1, 2, 4-トリアゾールとのプレカラム反応又は、アルカリによる分解ポストカラ

ム反応を利用する HPLC 法 (いずれの測定感度も  $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ )<sup>9)</sup> 等が報告されているが、いずれも操作が煩雑で安定した感度、精度を得るためには熟練した技術が必要で多数の検体を測定していくためにはカラムの洗浄、再生等の測定能率上にも問題があった。

今回、著者らは高感度で簡便な SBT の濃度測定法として HPLC 法及び Bioassay 法について検討したので報告する。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. 使用薬剤

Sodium sulbactam ( $895\mu\text{g}$  (力価)/mg), Sodium ampicillin ( $909\mu\text{g}$  (力価)/mg) 及び Sodium cefoperazone ( $920\mu\text{g}$  (力価)/mg) を用いた。なお薬液濃度はすべて力価で表示した。

#### 2. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法

##### 1) 装置

高速液体クロマトグラフはコスモシールパックドカラム 5 C<sub>18</sub>-P カラム (4.6mmi.d.×150mm. 粒子径 5  $\mu\text{m}$ . 半井化学) を装着した TRI ROTAR HPLC 装置 (日本分光) を使い、検出器は電気化学検出器 (ECD) E-502 (医理化) を用いた。

\* 愛知県知多郡武豊町字 5 号地 2 番地

## 2) HPLC条件

移動相: テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシド (TBAH) を 5 mM濃度で含有する 0.03M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) とメタノールの混液 (8:1)

流速: 1 ml/分

電気化学検出: 印加電圧+0.8V (対照電極: Ag/AgCl), 作用電極グラッシーカーボン

注入量: 40 $\mu$ l

## 3) 前処理及びプレカラム反応

血清又は血漿0.5mlに精製水0.1ml, 塩化ナトリウムを28.5W/V%濃度で含有する1 N塩酸0.2mlを加え酢酸エチル3 mlと共に5分間振とうする。3000rpm (2000 $\times$ g)で5分間遠心分離操作を行った後, 酢酸エチル抽出液層を分離する。

酢酸エチル抽出液に0.5mlの0.01Mリン酸緩衝液pH7.0を加え, 同様の振とう, 遠心分離操作を行い水層を分離する。水層をクロロホルム1 mlで洗浄した後その0.2mlを別の試験管に移す。2.5W/V%塩酸ヒドロキシルアミン pH7.0 (0.5N-水酸化カリウムを用いてpHを調整) 50 $\mu$ lを加え, 均一にした後, 40 $^{\circ}$ Cで40分間反応し, SBTをヒドロキサム酸誘導体に導く。得られた反応液40 $\mu$ lを, 5 $^{\circ}$ Cの水槽を装備したオートサンプラーを用いてHPLCに注入する。

## 4) 検量線の作成

SBTの標準溶液 (1~50 $\mu$ g/ml水溶液)を調製し, その各0.1mlを薬物投与を受けていないヒトの血清の0.5mlに加え (血清中濃度として0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0及び10.0 $\mu$ g/ml), 以降前項3)に従って抽出, 反応操作を行い, HPLC分析に供した。

得られたクロマトグラムからSBTのピーク高さを求め, 検量線を作成した。

## 5) プレカラム反応及び測定条件の検討

塩酸ヒドロキシルアミンを水に溶解し, 0.5N水酸化カリウムを用いてpHを5~9に調製し, ヒドロキシルアミンとして1~7 mg/mlの濃度の反応試液を調製した。0.5~0.8 $\mu$ gを添加した試験管(メタノール溶液として加え溶媒留去)に反応試液1 mlを加え30~50 $^{\circ}$ Cで10~120分間反応させ, 生成したヒドロキサム酸の反応液をHPLC-ECDに注入し, 得られたクロマトグラムのピーク高さを基準に反応又は測定に至適条件を検討した。

## 6) SBT 選択的定量性の検討

ヒト血清にSBTの $\beta$ -lactam 環開裂体 (分解物又は代謝物: SBTを1 N-NaOHに溶解し, 室温に20分放置後1 N-HClで中和し調製した) 又は併用薬のABPC

及びCPZをそれぞれ添加し, 各10 $\mu$ g/mlの濃度の試料を調製し, これを処理してSBTの分析法に対する干渉の有無を検討した。

## 3. Bioassay法

## 1) 検定菌種ならびに菌株の選定

$\beta$ -lactamase産生能を有し, ABPC高度耐性で且つ, SBTとABPCの配合剤(力価比1:2, SBT $\cdot$ ABPC)に対し高い感受性を示す各種細菌の中から, 発育速度, 栄養要求性, 培養条件等の操作性に優れる *Branhamella catarrhalis* を検定菌として選択した<sup>9)</sup>。日本化学療法学会標準法<sup>10)</sup>に従って, *B. catarrhalis* 臨床分離株20株に対するSBT, ABPC及びSBT $\cdot$ ABPC (1:2)の最小発育阻止濃度(MIC)を測定し, 菌株を選定した。

## 2) 測定用培地

*B. catarrhalis*の栄養要求性に応える培地としてBrain heart infusion agar(BHIA, Difco), Mueller-Hinton agar(MHA, Difco)及びDiagnostic sensitivity test agar base (DSTA, Oxoid)を選び *B. catarrhalis* No.8の発育を比較した。

## 3) 接種菌液調製

BHIA平板に継代した *B. catarrhalis* No.8の一回白金耳量をBHIAスラント(10ml)に植菌し, 37 $^{\circ}$ Cで20時間培養した。Heart infusion (HI) broth 10mlで洗いとり, これを接種菌液とした (1.1~2.0 $\times 10^8$  cells/ml)。なお, このHI broth 6倍希釈液の600nmにおける透過率は48~52%であった。

## 4) 培地へのABPC添加量と接種菌量

ABPCの添加濃度は, *B. catarrhalis* No.8に対するABPCの1/4 MIC濃度(接種菌量 $10^8$  cells/ml)近辺に相当する20~40 $\mu$ g/ml濃度を用い, 接種菌量は測定用培地に対し菌液を0.1~2%まで添加し菌の発育について検討した。

5) 検定菌に *B. subtilis* を添加した場合の効果 ABPCに感受性で芽胞形成能のある *Bacillus subtilis* ATCC 6633を検定菌として *B. catarrhalis* に併用することにより阻止円が鮮明になることから *B. subtilis* 芽胞液 ( $4 \times 10^8$  spores/ml) の添加量について検討した。

## 6) 操作法

検定菌を接種した測定用培地10mlを榮研円筒型HSプラスチックシャーレ(内径9 cm)に分注し, 水平台上で固化させた。

ペーパーディスク(直径8 mm, 東洋製作所)に試料50 $\mu$ lを浸み込ませたのち培地上にのせ軽く圧着させ, 28 $^{\circ}$ Cで20時間培養し阻止円径を測定した。

なお, 1試料についてディスク3枚の阻止円径を読みとり, その平均値を用いた。

## 7) 標準液の調製

SBTを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、800 $\mu$ g/ml濃度の溶液を調製した。0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)、ヒト血清又はヒト血清を25%の割合で含有する0.1Mリン酸緩衝液を用いて0.05~0.8 $\mu$ g/mlの標準希釈系列を作成した。それぞれ3例の阻止円直径の平均から検量線を作成した。

## 4. HPLC法とbioassay法の相関性

SBTPC 10%細粒をSBTPC力価として10mg/kgの用量で服用した患者の血清試料検体を用い、これら試料中のSBT濃度をHPLC法で測定した。

また同一検体をbioassay法でも測定し、HPLC法とbioassay法の相関性について調べた。

## II. 実験結果

## 1. HPLC法によるSBT濃度の測定

## 1) プレカラム反応条件の検討

SBTはpH5~9の条件下でヒドロキシルアミンと反応させる時ヒドロキサム酸を生成する。このものは容易に電気化学酸化を受けることからこの原理をSBTの高感度HPLC検出法に利用した。

反応条件としてはpH7.0(Fig.1)及び試薬濃度(塩酸ヒドロキシルアミン)5mg/ml以上(Fig.2)、反応温度は40°Cで反応時間40分以上(Fig.3)の時ヒドロキサム酸の生成が最も高率であった。

## 2) HPLC条件の検討

HPLCは通常よく用いられる逆相のオクタデシルシリルカラムを固定相とし、ヒドロキサム酸体に対するイオン対分析手法を採用した。SBTのヒドロキサム酸のポルタモグラムはFig.4に示した通りであり、印加電圧+0.9V以上で最大の感度を示した。但し、選択性及び感度を考慮し、この場合の印加電圧は+0.8Vで十分であると判断した。

## 3) 抽出精製操作

血清からのSBTの抽出は酸性酢酸エチルを用いて行った。この時、水層を食塩で飽和させることにより酢酸エチル層への抽出率の向上がみられた。また、酢酸エチルを0.01Mリン酸緩衝液pH7.0で逆抽出することにより、夾雑物の抽出を抑えることが出来た。この緩衝液をクロロホルムで洗浄した後、上層の水溶液をプレカラム反応に供した。

## 4) SBTの定量標準操作法及び測定感度

上述の検討結果に基づき、実験項I-2-1)~4)記載の方法を標準操作法として設定した。

本法に従ってヒト血清を処理し、得たクロマトグラムをFig.5に示した。いずれのクロマトグラムでもSBTのヒドロキサム酸体と生体成分との分離は良好であっ

た。また、SBTの $\beta$ -lactam環の開裂体ならびにABPC、CPZは、本定量法に影響を及ぼすことはなかった。

検量線はFig.6に示した通りSBT濃度0.2~10.0 $\mu$ g/mlの範囲で良好な直線性を示し、直線の回帰式は $Y = 62.0X + 2.77$ 、相関係数( $r$ )は0.999であった。また、本分析法における変動係数は0.2~0.4 $\mu$ g/mlで6%、1~10 $\mu$ g/mlで3%であった。測定感度は0.05 $\mu$ g/ml(S/N比5)であった。

## 2. Bioassay法によるSBT濃度の測定

## 1) 測定条件の検討

検定菌としては、 $\beta$ -lactamase産生能を有しABPCに高度耐性で、SBT・ABPC(1:2)に対し高い感受性を示す*B. catarrhalis*20株の中からSBTとABPCの相乗効果が最も顕著に認められたNo.8株を選択した。本菌株に対するSBT、ABPC、SBT・ABPC(1:2)のMICをTable1に示した。接種菌量が $10^6$ cells/mlの場合のMICは、SBT・ABPC(1:2)で0.10 $\mu$ g/mlであり、SBT又はABPCそれぞれ単独のMICはそれぞれ3.13 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/mlであった。

測定用培地はBHIAの発育支持能が最も強く、次いでMHAであり、DSTAは前2者に比べ劣った。

そこで感受性ディスク用試験培地として推奨されているMHAを測定用培地とし、前培養培地にはBHIAを用いることとした。

測定培地へのABPCの添加量と菌の接種量について調べた。ABPCの培地への添加濃度が20 $\mu$ g/mlで測定用培地に対して*B. catarrhalis*の接種菌液添加量を0.5%とした場合には菌の発育が悪く、1~2%の添加で阻止円が形成された。接種菌量の増加に伴い、阻止円は小さくなる傾向が認められ、阻止円の大きさの点から1.4~1.6%( $10^7$ cells/ml)近辺が最適と思われた(Fig.7)。接種菌量を1.5%に固定し、ABPCを20、25、30 $\mu$ g/mlの添加濃度で検討した結果、高濃度になるほど阻止円径が増大した。阻止円径の大きさの観点から20 $\mu$ g/mlが最適と思われた(Fig.8)。

*B. catarrhalis*の発育域の色調は淡く、阻止円境界が不鮮明であったため、他の検定菌の併用を考えた。ABPCに感受性で、且つ、ABPC含有培地中でも菌数が減少しないことが望ましいことから*B. subtilis*に着目した。芽胞形成菌である*B. subtilis* ATCC 6633を混合して用いると明瞭な阻止円が得られ、*B. catarrhalis*で形成される阻止円と*B. subtilis*で形成される阻止円はよく一致した。そこで、測定用培地に対し、*B. subtilis*孢子液( $4 \times 10^6$ spores/ml)を通常用いられる濃度の3%添加することとした。

Reaction conditions were as follows:

sublactam:  $0.5 \mu\text{g/ml}$ , hydroxylamine solution:  $5 \text{ mg/ml}$  pH 5~9, temperature:  $40^\circ\text{C}$

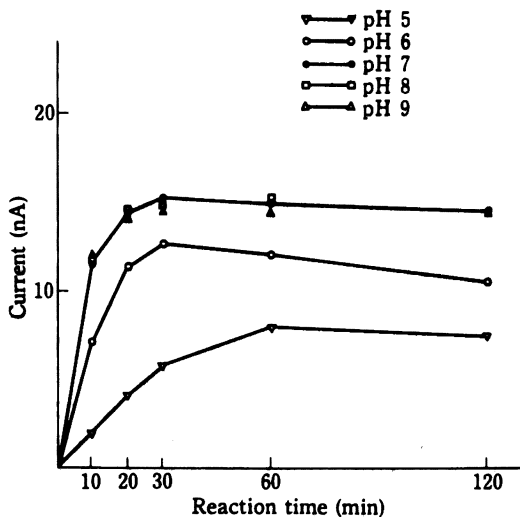


Fig. 1. Effect of pH on pre-column reaction of sublactam with hydroxylamine determined by HPLC

Reaction conditions were as follows:

sublactam:  $0.8 \mu\text{g/ml}$ , hydroxylamine solution:  $1\sim7 \text{ mg/ml}$  (pH 7.0), temperature:  $40^\circ\text{C}$

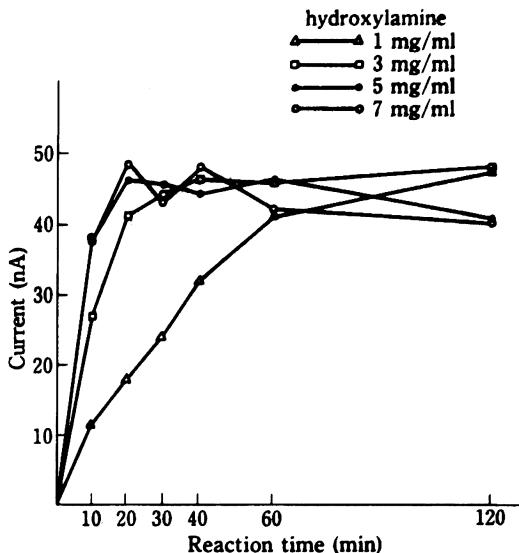


Fig. 2. Effect of hydroxylamine concentration on pre-column reaction of sublactam with hydroxylamine determined by HPLC

Reaction conditions were as follows:

sublactam:  $0.5 \mu\text{g/ml}$ , hydroxylamine solution:  $5 \text{ mg/ml}$  pH 7.0, temperature:  $30\sim50^\circ\text{C}$

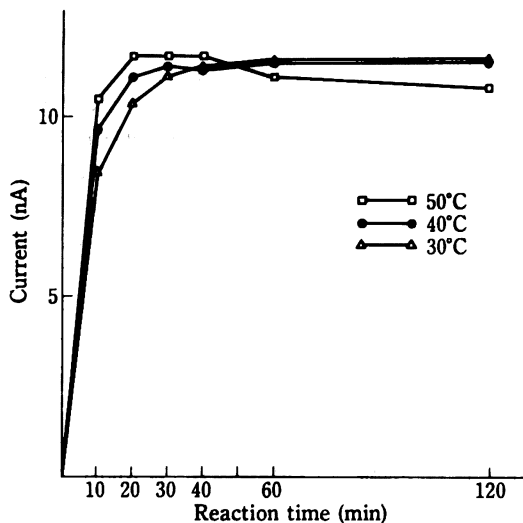


Fig. 3. Effect of temperature on pre-column reaction of sublactam with hydroxylamine determined by HPLC

Conditions of pre-column reaction were as follows:

sublactam:  $1 \mu\text{g/ml}$ , hydroxylamine solution:  $5 \text{ mg/ml}$ , pH 7.0, temperature:  $40^\circ\text{C}$

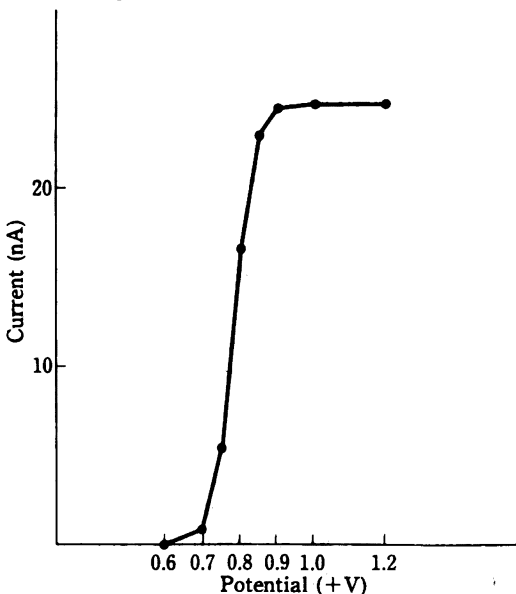


Fig. 4. Voltammogram for reaction product of sublactam with hydroxylamine determined by HPLC

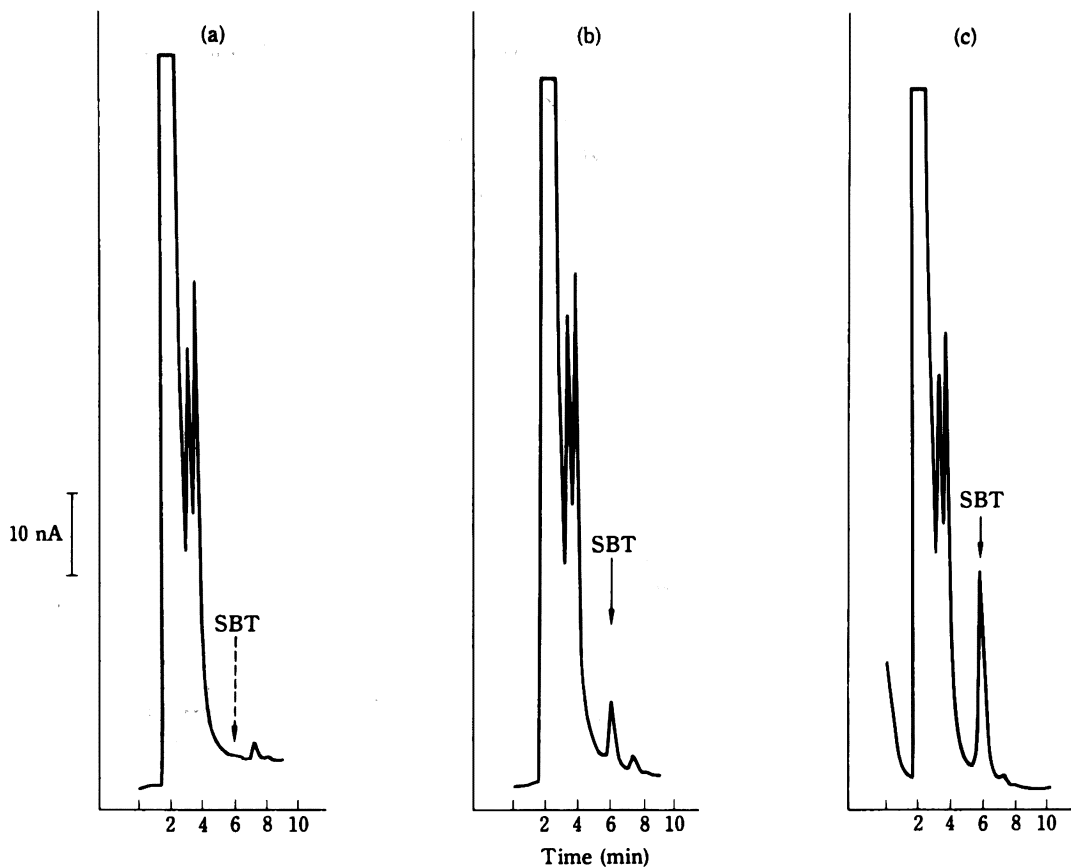


Fig. 5. Chromatograms showing control serum (a), control serum fortified with  $0.2 \mu\text{g/ml}$  sulbactam (b) and patient serum with sulbactam of  $0.75 \mu\text{g/ml}$  1 h after a  $10 \text{ mg/kg}$  dose of sultamicillin as 10% fine granules (c)

2) bioassayによる標準操作方法及び測定感度  
 上述の検討結果に基づき bioassay 法による標準的な  
 測定法を以下のように設定した。

#### SBT 血中濃度測定法

##### (1) 方法

ペーパーディスク法

##### (2) 試験菌株

*Branhamella catarrhalis* No. 8 及び *Bacillus subtilis* ATCC 6633を用いる。

##### (3) 測定用培地

Mueller-Hinton agar を用いる。

##### (4) 接種菌液および接種菌量

*B. catarrhalis* No. 8 一白金耳量を Brain heart infusion agar スラント (10ml) に植菌し  $37^\circ\text{C}$ , 20時間

培養し, Heart infusion broth (10ml) で洗い取る ( $1.1\sim 2.0\times 10^9$  cells/ml)。また, *B. subtilis* ATCC 6633は日本抗生物質医薬品基準<sup>11)</sup>の一般試験法に準じて調製した胞子液を胞子液濃度  $4\times 10^8$  spores/ml に調製する。測定用培地に対し, *B. catarrhalis* No. 8 菌液を1.5%, *B. subtilis* ATCC 6633胞子液を3%加え, さらに培地中 ABPC 濃度が  $20\mu\text{g/ml}$  になるように ABPC 水溶液 (2 mg/ml 濃度) を加える。

##### (5) 検体の希釈液

血清試料の希釈にはヒト血清又は25%ヒト血清を用いる。

##### (6) 寒天平板調製法

内径9 cm の円筒型シャーレを用い, 測定用培地10 ml を流して調製する。

Vertical bars represent standard deviation of the mean, n=5

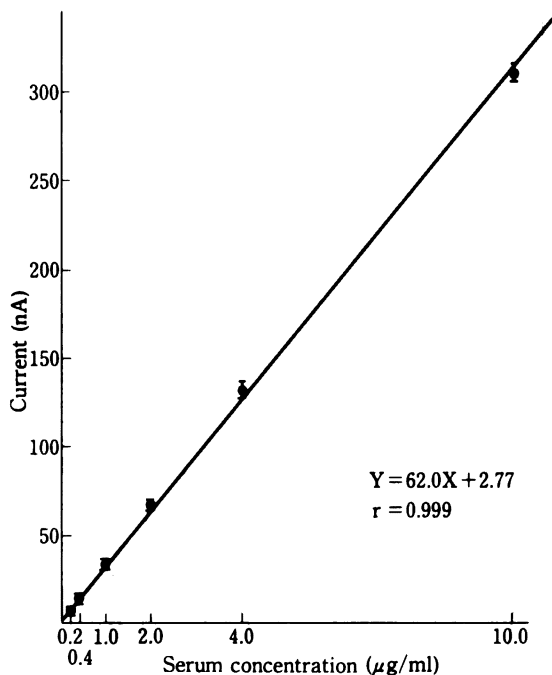


Fig. 6. Standard curve of subactam prepared by HPLC determinations of control sera fortified with 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 and 10.0 µg/ml

Method: paper-disk  
Organism: *Branhamella catarrhalis* No.8  
*Bacillus subtilis* ATCC 6633  
( $1 \times 10^8$  spores/ml)  
Medium: Mueller-Hinton agar  
Diluent: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)  
Incubation: 28°C, 20 h

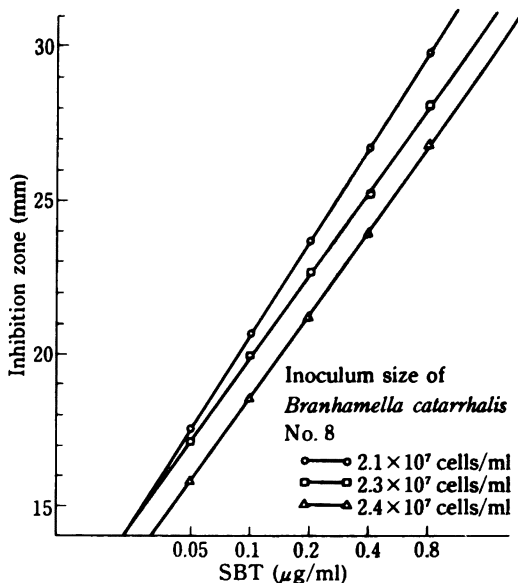


Fig. 7. Influence of inoculum size on standard curve of subactam

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICS) of SBT, ABPC and combination of SBT and ABPC (1:2) against *Branhamella catarrhalis* No. 8

	MIC ( µg/ml )	
	10 <sup>8</sup> cells/ml	10 <sup>6</sup> cells/ml
SBT	3.13	1.56
ABPC	100	0.20
SBT·ABPC (1:2)	0.10	0.05

SBT : subactam  
ABPC : ampicillin

#### (7) 検量線の作成

標準液として SBT を 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、ヒト血清又は 25% ヒト血清による希釈系列を作成し、これを用いて検量線を作成する。

#### (8) 培養条件

28°C, 20時間

本法により作成した検量線を Fig. 9 に示した。0.1M リン酸緩衝液、ヒト血清及び 25% ヒト血清を用いた場合の検量線はわずかに勾配が異なったがいずれも 0.05~0.8 µg/ml の範囲で良好な直線性を示した ( $r > 0.999$ )。

本法による SBT の測定感度は 0.05 µg/ml であった。

### 3. HPLC 法と bioassay 法の相関性

SBTPC を経口投与した患者の血清試料について HPLC 法及び bioassay 法 (ディスク法) により SBT 濃度を測定し、両測定値の相関性について調べた。

Method: paper-disk

Organism: *Branhamella catarrhalis* No.8

( $2 \times 10^7$  cells/ml)

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

( $1 \times 10^5$  spores/ml)

Medium: Mueller-Hinton agar

Diluent: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)

Incubation: 28°C, 20 h

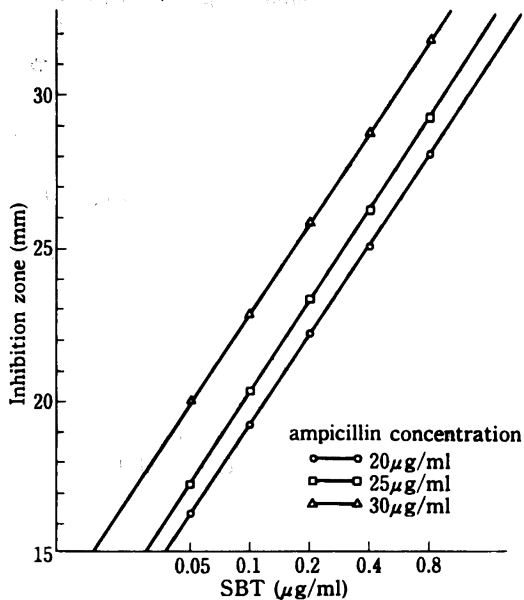


Fig. 8. Influence of ampicillin concentration in test medium on standard curves of sulbactam

両測定法により得た値はよく一致し、両者間の回帰直線式は  $Y = 0.970X + 0.0851$  ( $X$ : bioassay 値,  $Y$ : HPLC 測定値),  $r = 0.987$  であり良好な相関関係が認められた (Fig. 10).

### III 考 察

SBT は *Comamonas terrigena*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter calcoaceticus* 等の少数の菌を除くほとんどの菌に対して抗菌活性を示さない<sup>1)</sup>。 *C. terrigena* 等の SBT 感受性菌を検定菌とした SBT の bioassay 法は SBT 単品を含有する検体の測定は可能なものの、併用される  $\beta$ -lactam 抗生物質、例えば ABPC、CPZ に対し検定菌が感受性を示すためこの方法を併用時の臨床検体中の SBT の測定に適用することは適切とは言い難い。

Foulds らは、SBT が ABPC との共存下で ABPC 耐性菌に対し相乗効果を発揮することに着目し、この原理を *E. coli* を検定菌とする bioassay に応用し

Method: paper-disk

Organism: *Branhamella catarrhalis* No.8

( $2 \times 10^7$  cells/ml)

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

( $1 \times 10^5$  spores/ml)

Medium: Mueller-Hinton agar

Incubation: 28°C, 20 h

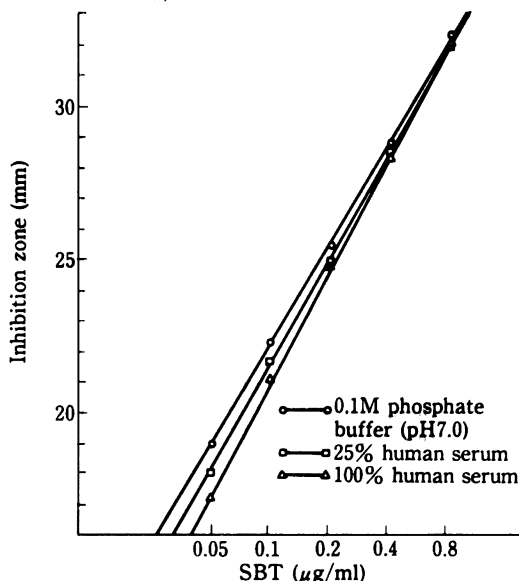


Fig. 9. Comparison of standard curves using 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) human serum and 25% human serum 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) as diluents

SYN-BIO assay を開発した<sup>5)</sup>。

著者らもこの方法を利用し *E. coli* を用いて ABPC 及び CPZ と併用された場合の体液内 SBT 濃度の測定法を考案し検体の分析を行って来た<sup>6,7)</sup>。但し検出感度は、ABPC 存在下での  $0.4 \mu\text{g/ml}$ 、CPZ 存在下で  $2 \mu\text{g/ml}$  と低かった。一方、SYN-BIO assay で感度不足の検体については GC-MS 法による SBT の高感度分析を行って来た。但し GC-MS 装置は高価であり、また兼用機器ではなく<sup>6,7)</sup>、SBT のメチルエステル化及び装置の好条件維持及び保守に熟練した研究者を必要とする等の測定能率上に問題があった。

そこで著者らは GC-MS 法にかわる方法として高感度な SYN-BIO assay 法及び HPLC 法の開発を目的に検討を行った。ABPC 存在下の SBT の高感度 bioassay 法について検討した結果、検定菌としては ABPC に高度耐性で、 $\beta$ -lactamase 産生能を有し、SBT の ABPC 増強効果が極めて強く発現する *B.*

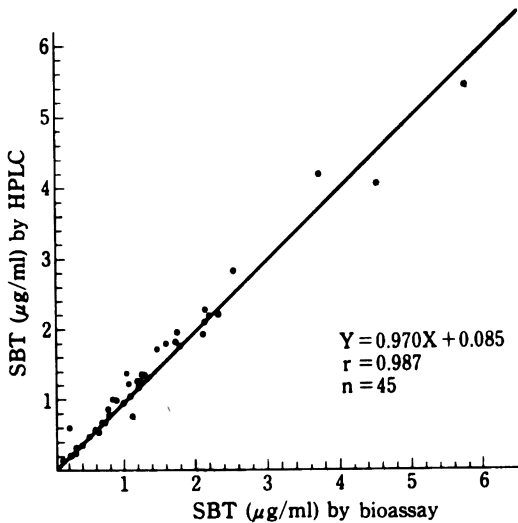


Fig. 10. Correlation between patient serum levels of sulbactam determined by HPLC and bioassay

*catarrhalis* No. 8が測定感度の点で選択された。本法では、検定菌 *B. catarrhalis* にさらに ABPC 感受性で芽胞形成能を有する *B. subtilis* ATCC 6633を混合して用いることによって、より鮮明な阻止円形成が得られ検出感度は体液中濃度として  $0.05\mu\text{g/ml}$  まで向上した。

即ち本 SYN-BIO assay の原理は以下の通りである。ディスクに置かれた試料液中の SBT がその濃度に依存して拡散し、*B. catarrhalis* の産生する  $\beta$ -lactamase を永久不活化し、培地中に含有した ABPC との相乗効果により阻止円を形成する。一方、SBT の拡散が及ばない区域では、*B. catarrhalis* の産生する  $\beta$ -lactamase により培地に含有する ABPC が不活化され *B. catarrhalis* の薄い白濁状の生育が生じ、同時に *B. catarrhalis* の ABPC 不活化に力を借りて ABPC 感受性の *B. subtilis* がより密な生育を示すため、鮮明な阻止円境界が形成される。

本法は最近、Foulds らの報告している *Pasteurella haemolytica* を検定菌として用いた ABPC 存在下の SBT の高感度 SYN-BIO assay 法 (検出感度:  $0.125\mu\text{g/ml}$  またはそれ以下)<sup>9)</sup> に勝るとも劣らない感度を有している。

一方、SBT を選択的に測定するクロマトグラフ手法

は併用薬が何であれ制限を受けることなく応用範囲が広いという利点がある。しかし SBT は  $220\text{nm}$  よりも長波長側に強い吸収を示さないため高感度な HPLC 分析を行うには  $220\text{nm}$  以下の波長を用い且つ、生体成分との分離の上で極めて複雑なクリーンアップ操作を必要とする他、高感度も望めない。

著者らは hydroxylamine が  $\beta$ -lactam 剤の呈色定性反応に用いられていることに着目し、SBT と hydroxylamine の反応生成物であるヒドロキサム酸が電気化学的に容易に酸化を受けることを見出し、この原理をプレカム反応 HPLC 法に応用し血清中の SBT の高感度 ( $0.05\mu\text{g/ml}$ ) 分析法を確立した。

本法は、併用される  $\beta$ -lactam 抗生物質として ABPC、CPZ 等の影響を受けず、SBT、ABPC、CPZ の代謝物である  $\beta$ -lactam 環開裂体は hydroxylamine との誘導化反応が陰性であることからこれらの影響を受けることもない。

また、自動試料注入装置を用い一度に多数の検体を処理する事ができるという利点をも有している。

最近萩中らは SBT と 1, 2, 4-トリアゾールとのプレカム反応を利用した HPLC 法<sup>9)</sup>、SBT のアルカリによる分解をポストカム反応に利用した HPLC 法<sup>9)</sup> を報告している。前者は 2 種の isomer を生じるためカラムを  $50^\circ\text{C}$  にコントロールする必要があり、また試薬の過剰トリアゾールがカラムに保持され連続測定時に baseline のみだれを生じる。また後者はカラム溶出後に反応用のアルカリを送液するポンプ及び反応コイルを必要とする。両者とも測定感度は  $0.2\mu\text{g/ml}$  であり、今回の HPLC-電気化学検出法による検出感度 ( $0.05\mu\text{g/ml}$ ) の方が優れていた。

今回、開発した HPLC 法と Bioassay 法の二法を用いて臨床検体を分析した結果、得られた測定値は互いによく一致しこれから、二法が SBT のヒト血中濃度測定法として有用な方法であることが確認された。

#### 文 献

- 1) ENGLISH A R, RETSEMA J R, GIRARD A R, LYNCH J E, BARTH W E: CP-45, 899, A beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: Initial bacteriological characterization. *Antimicrob Agents Chemother* 14: 414~419, 1978
- 2) 横田 健, 東 映子, 鈴木映子: Sulbactam と Cefoperazone 合剤の各種細菌臨床分離株に対する抗菌力. *Chemotherapy* 32(S-4): 1~10, 1984
- 3) 川崎賢二, 新美博仕, 後迫敏幸, 松永敏幸: Sulbactam・Ampicillin の抗菌活性. *Chemotherapy*



- 36 (S-8) : 34~57, 1988
- 4) 横田 健, 東 映子, 吉田玲子: Sultamicillin の抗菌力及びペニシリン結合蛋白に対する親和性。Chemotherapy 33 (S-2) : 10~22, 1985
- 5) FOULDS G, GANS D J, GIRARD D, WHALL T J : Assays of Sulbactam in the Presence of Ampicillin. Ther Drug Monit 8 : 223~227, 1986
- 6) 加納 弘, 関口金雄, 立松 洋, 下岡新雄, 沖 俊一: 微生物学的定量法ならびに GC または GC-MS 法による Sulbactam 及び Sulbactam-Cefoperazone の定量法。Chemotherapy 32 (S-4) : 131~141, 1984
- 7) 加納 弘, 竹居春実, 大森健太郎, 村上昌弘, 下岡新雄, 福島英明, 沖 俊一: Sultamicillin の実験動物における吸収, 分布, 代謝及び排泄。Chemotherapy 33 S-2 : 128~153, 1985
- 8) HAGINAKA J, WAKAI J, YASUDA H, UNO T : High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Sulbactam Using Pre-column Reaction with 1,2,4-triazole. J Chromatogr 341 : 115~122, 1985
- 9) HAGINAKA J, YASUDA H, UNO T, NAKAGAWA T : Sulbactam : Alkaline Degradation and Determination by High-Performance Liquid Chromatography. Chem Pharm Bull 32 (7) : 2752~2758, 1984
- 10) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 11) 薬業時報社編: 日本抗生物質医薬品基準解説 (改訂新版)。611頁, 1982

## SENSITIVE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC-AMPEROMETRIC AND MICROBIOLOGICAL ASSAYS FOR DETERMINING SULBACTAM IN SERUM

KIN'O SHIMOOKA, MASAMI ITO, KYOKO MATSUMOTO,  
HIROSHI NIIMI, TOSHIYUKI MATSUNAGA and KENJI KAWASAKI  
New Product Development Center, Pfizer Taito Co., Ltd.,  
5-2 Taketoyo-cho, Chita-gun, Aichi 470-23, Japan

We developed the following two procedures after studies on sensitive assay methods for sulbactam (SBT), a  $\beta$ -lactamase inhibitor, in serum in the presence of ampicillin (ABPC).

1) Relatively low concentrations of SBT in serum could be determined with a detection limit of 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by high-performance liquid chromatographic amperometry following pre-column reaction with hydroxylamine. This method was not affected by the coexistence of ABPC, cefoperazone (CPZ), or their metabolites in assay samples.

2) We developed an SBT bioassay using the synergistic activity of SBT in the presence of ABPC. In the microbiological assay, the combination of the  $\beta$ -lactamase-producing strain, *Branhamella catarrhalis* No. 8, and the ABPC-sensitive strain, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 were used as test organisms. Mueller Hinton agar containing a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration of ABPC as assay medium proved most suitable for sensitive determination of SBT serum levels in the presence of ABPC. The detection limit of SBT in serum was 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Serum levels in patients determined by the HPLC and bioassay methods mentioned above showed high correlation.