

高速液体クロマトグラフィーによる cephem 系抗生物質 7432-S  
 およびその代謝物 7432-S-trans のヒト体液内濃度測定法

松浦昭男・永山貴子・北川隆康  
 塩野義製薬株式会社研究所\*

抗生物質 7432-S および代謝物 7432-S-trans の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を確立した。本 HPLC は逆相  $C_{18}$  カラムにイオンペア試薬〔テトラ-*n*-ブチルアンモニウムリン酸塩 (Pic A) と臭化テトラ-*n*-アミルアンモニウム〕を用いるイオンペアクロマトグラフィーの系とした。血漿試料は、イソプロパノールとジクロロメタンにより除蛋白とクリーンアップを同時に行う前処理に付して後、HPLC 分析に供した。尿・胆汁試料は、あらかじめ Bond Elut  $C_{18}$  カラムに 7432-S を保持させ、妨害物質を洗浄・除去するクリーンアップ処理に付して後、HPLC 分析に供した。検出には UV 吸収を用い、波長を 256 nm とした。本法により、各種生体試料中の 7432-S と代謝物 7432-S-trans が高感度で精度良く定量された。変動係数は 3% 以下 (血漿・尿)、5% 以下 (胆汁) で、定量下限は、血漿・胆汁試料に対して 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、尿試料に対して 1  $\mu\text{g/ml}$  であった。本法を用いて 7432-S 投与後の健康人血漿・尿・胆汁中 7432-S の分析を行った。本 HPLC 法とバイオアッセイ法で定量した両者の値は良く相関した (血漿試料で  $r=0.995$ 、尿試料で  $r=0.993$ )。生体試料中 7432-S の安定性を調べたところ、血漿・尿中 7432-S は -70°C で 2 ヶ月間安定であった。胆汁中 7432-S は 4°C で 5 時間まで安定であった。本分析法は、感度・精度・再現性に優れるほか、操作の簡易性を特長とする。

**Key words :** Ceftibuten, High-performance liquid chromatography, Plasma, Urine, Ion-pairing reagent, Stability

7432-S は塩野義製薬研究所において開発された新しい経口用セフェム系抗生物質であり、広範囲のグラム陰性菌および一部のグラム陽性菌に対して優れた抗菌力を示す<sup>1,2)</sup>。すでに生体試料中 7432-S の定量法としては、バイオアッセイ法<sup>3)</sup>が確立され利用されているが、代謝物 7432-S-trans は定量できない。

今回、われわれは、HPLC 法による 7432-S および 7432-S-trans のヒト体液内濃度測定法を確立し、7432-S 投与後の血漿・尿・胆汁濃度を定量した。本報告では定量法について詳述するとともに、その評価について考察した結果についても述べる。

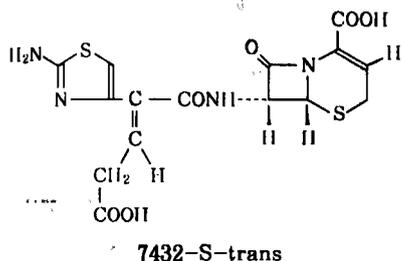
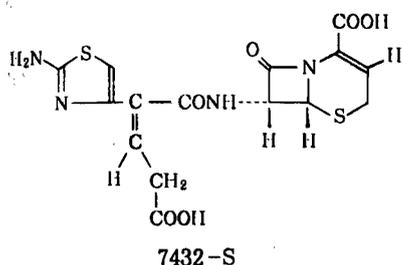
### I. 材料と方法

#### 1. 試薬および調製法

- ・ Pic A (テトラ-*n*-ブチルアンモニウムリン酸塩) : Waters 社製。
- ・ 臭化テトラ-*n*-アミルアンモニウム : 和光純薬製、特級。
- ・ ジクロロメタン : 和光純薬製、特級。

- ・ メタノール、アセトニトリルおよびイソプロパノール : HPLC 用。
- ・ コントロール血清 : Flow Lab., AB type。その他試薬類は特級品を用いた。
- ・ 7432-S 標準溶液 (原液) : 7432-S 標準品 10 mg (力価) を精密に量り、pH 7 リン酸緩衝液に溶かし正確に 10 ml とする。
- ・ 内部標準溶液 (血漿分析用) : *p*-トルエンスルホン酸 135 mg を蒸留水に溶かし、100 ml とする。
- ・ 内部標準溶液 (尿分析用) : *p*-クロロ安息香酸 100 mg をエタノールに溶かし、100 ml とする。用時、この液 3 ml を pH 7 リン酸緩衝液で希釈し、全量を 100 ml とする。
- ・ 内部標準溶液 (胆汁分析用) : *p*-クロロ安息香酸 100 mg をエタノールに溶かし、100 ml とする。用時、この液 1 ml を pH 7 リン酸緩衝液で希釈し、全量を 20 ml とする。
- ・ pH 7 リン酸緩衝液 : 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液に 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液を混和して pH 7 に調整する。

\*〒553 大阪市福島区鷺州 5-12-4



7432-S:

(6R, 7R)-7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-4-carboxy-2-butenoylamino]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-ene-2-carboxylic acid

M. W. : 410.43

Fig. 1. Chemical structures of 7432-S and 7432-S-trans.

・pH 5 酢酸緩衝液: 酢酸ナトリウム 8.2g を蒸留水約 80 ml に溶かし, 氷酢酸を加えて pH 5 に調整し, 蒸留水で全量を 100 ml とする (1M)。

・0.5M リン酸水溶液: リン酸 (85%, 和光純薬) 5.76 g を蒸留水で希釈し, 全量を 100 ml とする。

・pH 5.5 リン酸アンモニウム緩衝液: リン酸二水素アンモニウム 3.45g を蒸留水約 900 ml に溶かし, 0.1N NaOH 水溶液を加えて pH 5.5 に調整した後, 蒸留水で全量を 1000 ml とする (0.03M)。

・pH 5.5 酢酸緩衝液: 酢酸ナトリウム 8.2g を蒸留水約 80 ml に溶かし, 氷酢酸を加えて pH 5.5 に調整し, 蒸留水で全量を 100 ml とする (1M)。

・15% メタノール-緩衝液混液: メタノール 15 ml を pH 5.5 リン酸アンモニウム緩衝液で希釈し, 全量を 100 ml とする。

・20% メタノール-緩衝液混液: メタノール 20 ml を用いて上と同様に希釈する。

## 2. 装置

1) 高速液体クロマトグラフ: LC-6A 型および LC-4A 型 (島津製作所) を用いた。カラムにケムコ社製

Nucleosil 5 C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm I. D. × 15 cm) を, ガードカラムに SHIMPACK SPC-RPI (4 mm I. D. × 3 cm, 島津製作所) を用いた。インジェクターに, 血漿分析の場合, Rheodyne 7125 型, 尿分析の場合, Waters 社製 Sample processor WISP 710B 型を用いた。データ処理装置に島津製クロマトパック C-R3A (または C-R2AX) を, 検出器に, 同社製 SPD-6AV (または SPD-2AS) を用いた。検出波長は 256 nm。感度は ATTEN 2。カラム温度は室温とした。

2) 遠心器: 冷却機付遠心器 05PR-2 型 (日立製作所), 温度 4℃。

3) サーモミキサー: タッチミキサー MT-51 型 (ヤマト科学)。

4) ミクロサンプリングチューブ: バイオプラスチック製, 0.5 ml 用。

5) Bond Elut C<sub>18</sub> カラム: Analytichem International (Part No. 607303) をあらかじめメタノール 5 ml で 2 回, 次いで pH 5.5 リン酸アンモニウム緩衝液 5 ml で 2 回洗浄して用いる (流速 10 ml/min)。

## 3. 移動相

血漿分析には, 10 mM Pic A : アセトニトリル : メタノール [80 : 14 : 6 (v/v)] を用いた。10 mM Pic A は, 試薬一瓶を蒸留水約 400 ml で希釈し, 0.5M リン酸水溶液を加えて pH 6.0 に調整した後, 蒸留水で 500 ml とした。尿・胆汁分析には, 5 mM Pic A - 5 mM 臭化テトラ-*n*-アミルアンモニウム : アセトニトリル : メタノール [65 : 25 : 10 (v/v)] を用いた。水相は, Pic A 試薬一瓶と臭化テトラ-*n*-アミルアンモニウム 1.9g を蒸留水約 800 ml に溶かし, 0.5M リン酸水溶液を加えて pH 5.3 に調整した後, 蒸留水で 1000 ml とした。移動相は混和後, 減圧下で十分脱気した。流速はいずれも 1.2 ml/min。

## 4. 血漿中 7432-S の定量操作

血漿 0.5 ml を正確に量り, 12 ml 遠沈管に入れ, 直ちに氷水中に浸す。内部標準溶液 50 μl をマイクロシリンドジで量り加えた後, pH 5 酢酸緩衝液, 0.5M リン酸水溶液, 蒸留水各 50 μl をマイクロピペットで量り加えて混和し, さらにイソプロパノール 1 ml を加えて 15 秒間サーモミキサーにて攪拌し, 次いでジクロルメタン 5 ml を加えて再び 15 秒間サーモミキサーにて攪拌した後, 遠心分離 (4000 rpm ; 4℃ ; 10 分間) する。上澄液 0.5 ml を正確に量り, あらかじめジクロルメタン 2 ml を入れた 10 ml 遠沈管 (氷水中に浸した) に移し, 15 秒間サーモミキサーにて攪拌する。遠心分離 (3000 rpm ; 4℃ ; 5 分間) し, 上澄液 300 μl をマイクロサン

ブリングチューブに移し、直ちにドライアイス上で凍結させて保存する（8時間以内）。用時解凍して試料溶液とし、その20 $\mu$ lをカラムへ注入する。クロマトグラム上の7432-S、7432-S-transのピーク面積と内部標準物質の面積比を算出する。

#### 検量線

7432-S標準溶液原液4mlを正確に量り、20mlメスフラスコに入れ、pH7リン酸緩衝液で正確に20mlとする。この液0.5、1.5、3、5mlを正確に量り、10mlメスフラスコに入れ、同緩衝液で正確に10mlとし標準溶液とする。測定まで氷水中に浸す。一方、コントロール血清0.5mlを正確に量り、12ml遠沈管に入れ、氷冷する。7432-S標準溶液各50 $\mu$ lをマイクロシリンジで加え混和する。この液に、内部標準溶液、pH5酢酸緩衝液、0.5Mリン酸水溶液各50 $\mu$ lを正確に量り加え混和し、さらにイソプロパノール1mlを加えて15秒間サーモミキサーにて攪拌する。以下定量操作に準じて操作し、内部標準物質に対する7432-Sのピーク面積比を算出し、7432-S濃度〔 $\mu$ g（力価）/ml〕に対する面積比からなる検量線を作成する〔1、3、6、10 $\mu$ g（力価）/ml〕。なお、本検量線は、7432-S-trans定量にもそのままで使用し得る。

#### 5. 尿中7432-Sの定量操作

あらかじめ、pH5.5酢酸緩衝液0.5mlを正確に量り、10ml遠沈管に入れ、氷水中に浸す。これに尿1mlを正確に量り加え混和する。この液1mlを正確に量り、Bond Elut  $C_{18}$ カラムに移し吸引する（2.5ml/min）。次いでpH5.5リン酸アンモニウム緩衝液2.5mlを加えて吸引（2.5ml/min）し、不純物を溶出除去する。7432-Sおよび7432-S-transは、あらかじめ、内部標準溶液2.5mlを正確に量り入れた5mlメスフラスコへ、20%メタノール-緩衝液混液2.5mlで溶出（2.5ml/min）し、振り混ぜた後、10 $\mu$ lをカラムへ注入する。本溶液は、測定まで氷冷し8時間以内に測定する。クロマトグラム上の7432-S、7432-S-transのピーク面積と内部標準物質の面積比を算出する。

500 $\mu$ g/ml以上の高濃度試料では、あらかじめ尿をpH5.5酢酸緩衝液で適宜希釈し、その1mlをBond Elut  $C_{18}$ カラムに移し、以下同じ操作を行う。

#### 検量線

7432-S標準溶液原液2.5mlを正確に量り、10mlのメスフラスコに入れ、20%メタノール-緩衝液混液で正確に10mlとする。この液0.2、0.5、1、2mlを正確に量り、あらかじめ内部標準溶液2.5mlを正確に量り入れた5mlメスフラスコに加え、20%メタノール-

緩衝液混液で正確に5mlとし標準溶液とする。測定まで氷水中に浸す。各10 $\mu$ lをカラムへ注入する。内部標準物質に対する7432-Sのピーク面積比を算出し、7432-S濃度〔 $\mu$ g（力価）/ml〕に対する面積比からなる検量線を作成する（50、125、250、500 $\mu$ g（力価）/ml）。

#### 計算

次式により尿中濃度を算出する。

$$\text{尿中濃度} (\mu\text{g/ml}) = \text{観測値} \times 1.5 \times \frac{1}{0.971}$$

（回収率：97.1%）

なお、7432-S-transも同じ検量線を用いて上式から計算する。

#### 6. 胆汁中7432-Sの定量操作

あらかじめpH5.5酢酸緩衝液2mlを正確に量り、10ml遠沈管に入れ、氷水中に浸す。これに胆汁0.5mlを正確に量り、加え混和する。この液1.5mlを正確に量り、Bond Elut  $C_{18}$ カラムに移し吸引する（2.5ml/min）。次いでpH5.5リン酸アンモニウム緩衝液1.5mlを加えて吸引（2.5ml/min）し、不純物を溶出除去する。7432-Sおよび7432-S-transは、あらかじめ内部標準溶液0.1mlをマイクロシリンジで取り入れた5mlメスフラスコへ、15%メタノール-緩衝液混液2.5mlで溶出（2.5ml/min）し、振り混ぜた後、100 $\mu$ lをカラムへ注入する。本溶液は、測定まで氷冷し4時間以内に測定する。クロマトグラム上の7432-S、7432-S-transのピーク面積と内部標準物質の面積比を算出する。

#### 検量線

7432-S標準溶液原液1mlを正確に量り、25mlメスフラスコに入れ、pH7リン酸緩衝液で正確に25mlとする。この液0.5、1.5、2.5mlを正確に量り、50mlメスフラスコに入れ、15%メタノール-緩衝液混液で正確に50mlとする。この液各2.5mlを正確に量り、5mlメスフラスコに入れ、内部標準溶液0.1mlをマイクロシリンジで取り、加えて振り混ぜ標準溶液とする。測定まで氷水中に浸す。各100 $\mu$ lをカラムへ注入する。内部標準物質に対する7432-Sのピーク面積比を算出し、7432-S濃度〔 $\mu$ g（力価）/ml〕に対する面積比からなる検量線を作成する〔2、6、10 $\mu$ g（力価）/ml〕。

#### 計算

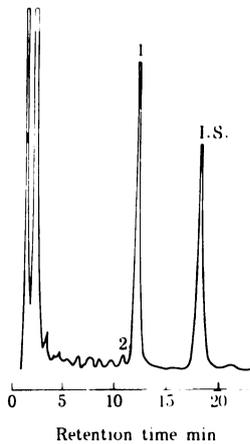
次式により胆汁中濃度を算出する。

$$\text{胆汁中濃度} (\mu\text{g/ml}) = \text{観測値} \times \frac{2.5}{1.5} \times \frac{1}{0.959}$$

（回収率：95.9%）

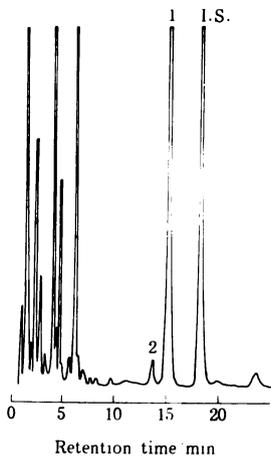
なお、7432-S-transも同じ検量線を用いて上式から計算する。

#### 7. ヒト体液中での安定性



1 7432-S, 6.78  $\mu\text{g/ml}$   
 2 7432-S-trans, 0.27  $\mu\text{g/ml}$   
 I.S.: Internal standard

Fig. 2. Typical chromatogram of a plasma sample taken at 2 h after oral administration of 100 mg of 7432-S to a healthy volunteer.



1 7432-S, 182.0  $\mu\text{g/ml}$   
 2 7432-S-trans, 6.6  $\mu\text{g/ml}$   
 I.S.: Internal standard

Fig. 3. Typical chromatogram of a urine sample from the 1-3 h urine fraction after oral administration of 100 mg of 7432-S to a healthy volunteer.

ヒトの血漿、尿、胆汁 9.9 容に 7432-S 標準溶液 0.1 容を添加し、それぞれ、5, 100, 10  $\mu\text{g}$  (力価)/ml の

試料溶液を調製し、各液 1 ml ずつを速沈管に分注し、各温度で静置し、各時点での 7432-S の残存量および生成した 7432-S-trans の量を測定する。

## II. 成績

### 1. クロマトグラム

7432-S 100 mg (力価) を経口投与した健康人の血漿・尿について分析し、得られたクロマトグラムを Fig. 2, 3 に示した。血漿試料 (投与後 2 時間) では、リテンションタイム 12.3 分に 7432-S, 10.9 分に 7432-S-trans が検出された。尿試料 (投与後 1 時間から 3 時間) ではリテンションタイム 15.0 分に 7432-S, 13.6 分に 7432-S-trans が検出された。胆汁試料では、両物質のリテンションタイムは尿中の値と一致した。両物質がイオンペア試薬により十分に保持されるとともに、生体成分に影響されていないことを認めた。

### 2. 安定性

7432-S を 3 種体液に添加した試料について、各温度で静置、一定時間後に定量し、残存する 7432-S と 7432-S-trans の生成量を調べた (Table 1, 2)。4  $^{\circ}\text{C}$  では、血漿・尿・胆汁ともに少なくとも 5 時間、24  $^{\circ}\text{C}$  では 2 時間 (血漿)、4 時間 (尿) まで安定であった。それ以降では、7432-S の一部は、7432-S-trans に変換し、37  $^{\circ}\text{C}$  (尿中) においては、速度は速くなった。一方、検体を -20  $^{\circ}\text{C}$ 、-70  $^{\circ}\text{C}$  で長期保存した際の安定性を調べた。-20  $^{\circ}\text{C}$  では、血漿・尿それぞれ 7 日、1 日以降に 7432-S-trans が生成し始め、日とともに増量した。しかし、-70  $^{\circ}\text{C}$  では、血漿・尿ともに少なくとも 2 ヶ月間安定であることが明らかとなった。したがって、検体を長期保存する際は、-70  $^{\circ}\text{C}$  に保つことが必要である。

## III. 考察

### 1 前処理

7432-S は、pH 7~8 で最も安定であるが、酸性では 7432-S-trans への変換が起こり、アルカリ性では分解する。したがって、除蛋白やクリーンアップの前処理は、酸性を避けできる限り中性に近い条件下で行わねばならない。また、熱にも不安定であり、加熱して濃縮するなどの処理は避けねばならない。

1) 血漿: 血漿を pH 5 酢酸緩衝液とリン酸水溶液にて pH 5 に調製した後、イソプロパノールを加え、蛋白を変性させた。ジクロロメタンを加えて抽出し、不要な生体成分の除去と除蛋白を同時に行った後、水相を HPLC 分析した。妨害物質は、pH 5 にて最も効果的に除去され、それより高い pH では多少残された。抽出後

Table 1. Stability of 7432-S in human plasma, urine and bile

Specimen	7432-S ( $\mu\text{g/ml}$ )	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Compound	Residual content (%)					
				0	1	2	3	4	5 hours
Plasma	5	4	7432-S	100	98	101	102	97	100
			7432-S-trans	0	0	0	0	0	0
		24	7432-S	100	100	96	94	90	93
			7432-S-trans	0	1	3	3	6	6
Urine	100	4	7432-S	100	101	100	98	101	102
			7432-S-trans	0	0	1	0	0	1
		24	7432-S	100	99	99	97	101	95
			7432-S-trans	0	1	1	1	1	3
		37	7432-S	100	97	97	96	90	91
			7432-S-trans	0	2	4	5	4	7
Bile	10	4	7432-S	100	100	102	99	99	100
			7432-S-trans	0	0	0	0	0	0

Table 2. Stability of 7432-S in human plasma and urine, at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$ 

Specimen	7432-S ( $\mu\text{g/ml}$ )	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Compound	Residual content (%)					
				0	1	3	7	30	60 day
Plasma	5	$-20$	7432-S	100	100	101	96	81	73
			7432-S-trans	0	0	0	4	20	25
		$-70$	7432-S	100	100	101	101	104	108
			7432-S-trans	0	0	0	0	0	0
Urine	100	$-20$	7432-S	100	91	84	72	51	51
			7432-S-trans	0	4	13	26	40	45
		$-70$	7432-S	100	101	99	98	99	100
			7432-S-trans	0	0	1	0	1	1

の水相の容量は、水がイソプロパノール-ジクロルメタン系へ若干分配されるため、減少し、薬物濃度は相対的に上昇し、感度向上(約1.6倍)となった。

2) 尿・胆汁：試料を pH 5.5 酢酸緩衝液で pH 5.5 に調製した後、Bond Elut  $\text{C}_{18}$  カラム<sup>5)</sup>に移した。逆相 ( $\text{C}_{18}$ ) のカラムへ 7432-S と 7432-S-trans を保持させ、生体成分を pH 5.5 リン酸アンモニウム緩衝液にて溶出、クリーンアップした後、両物質を溶出した。

pH 5.5 以上では、両物質の保持は弱まり、回収率は低下した。また、これ以下の pH では保持は強くなるが、7432-S のトランス体への変換が起った。

## 2. クロマトグラフィー条件

移動相：ODS カラム (Nucleosil 5  $\text{C}_{18}$ ) を用いて分離条件を検討した。7432-S, 7432-S-trans はイオン性物質のため、イオンペア試薬により保持を強め、極性の強い生体成分との分離を図った。血漿分析では、水相

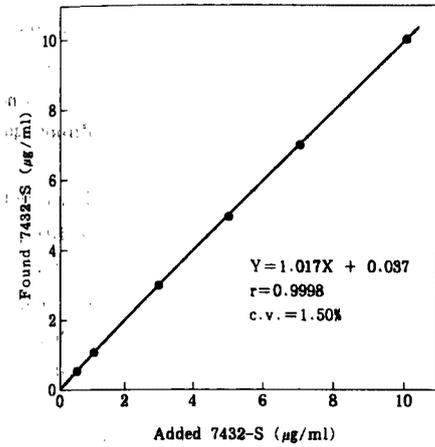


Fig. 4. Regression analysis for assay of 7432-S in plasma.

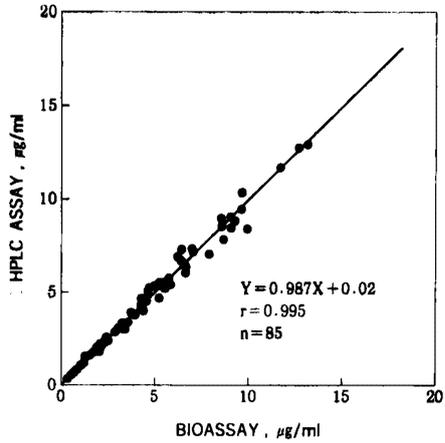


Fig. 6. Correlation between HPLC and bioassay analysis of 7432-S in plasma.

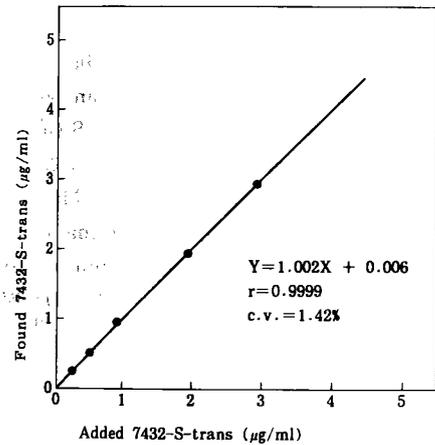


Fig. 5. Regression analysis for assay of 7432-S-trans in plasma.

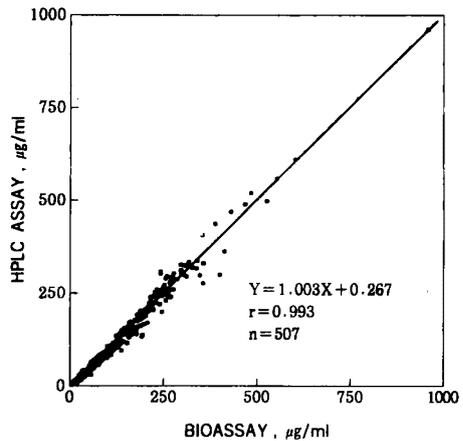


Fig. 7. Correlation between HPLC and bioassay analysis of 7432-S in urine.

の pH を 6, 尿・胆汁分析では 5.3 と設定したが, 大部分の生体成分は, 早い時間に溶出し, 目的物質に影響を及ぼすことなく分離された。尿分析に際し, pH 5.3 以上または以下の pH では, 両物質の保持は弱くなるとともに, 生体成分の影響を受けた。

Pic A と臭化テトラ-*n*-アミルアンモニウムを共存させたが, 試料のリテンションタイム付近の若干の生体成分が効果的に移動し, その妨害が防がれた。

検出波長: 7432-S と 7432-S-trans は, 256 nm において吸収強度 (モル吸光係数) が等しいため, 両物質は 7432-S の検量線を使って同時に定量し得る。

### 3. 回収率・精度・感度

1) 血漿: 7432-S および 7432-S-trans を健常人血漿に添加し, それぞれ 0.5~10 µg/ml, 0.25~3 µg/ml の溶液を調製して, 定量し回収率を測定した結果は, Fig. 4, 5 に示すとおりである。両回収率は 100% と見なすことができる。両物質について 1 µg/ml 濃度の試料についてくり返し測定した結果, 変動係数 (C. V.) は 3% (n=5) 以下, 定量下限は, 両物質とも 0.1 µg/ml であった。

2) 尿: 7432-S および 7432-S-trans を健常人尿に添加し, それぞれ 25~300 µg/ml, 10~100 µg/ml の溶液を調製して, 定量し回収率を測定した結果, 両者ともに 97% の回収率が得られた。回収率は日間で変動

しなかった。7432-S, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  濃度の試料についてくり返し測定した結果, C. V. 値は, いずれも3%以下 ( $n=6$ ), 定量下限は, 両物質とも1  $\mu\text{g/ml}$  であった。

3) 胆汁: 尿と同様に添加実験を行い (1~10  $\mu\text{g/ml}$ ), 7432-S の回収率は, 95.9% で日間で変動しなかった。C. V. 値は, 5.4% 以下 (2  $\mu\text{g/ml}$  濃度の試料で  $n=5$ ) で, 定量下限は両物質とも0.1  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 4. HPLC 法とバイオアッセイ法との比較

健康人成人男子に 7432-S 100 mg および 200 mg (いずれも力価) を経口投与し, 投与後採取した血漿・尿を試料として HPLC 法とバンドカルチャー法 (*E. coli* 7437 株を検定菌とする) によるバイオアッセイ法<sup>9)</sup> で同時に測定し, 両定量値を求め, 両者の相関性について検討した。それぞれを Fig. 6, 7 に示したが, 二種試料について両方法間で良好な相関性が得られた。

今回開発した HPLC 定量法により 7432-S と 7432-S-trans を同時に定量し, 別稿でも述べるように 7432-S を投与した健康人の血中濃度, 尿中排泄量を明らかにした。本法は, 感度, 精度に優れ, 再現性も良好であり, ヒト体液中における 7432-S の適正分析法として, その実用性を明らかにした。

#### 文 献

- 1) HAMASHIMA Y : T. KUBOTA, K. MINAMI, K. ISHIKURA, T. KONOIKE, M. YOSHIOKA, T. YOSHIDA, H. NAKASHIMIZU & K. MOTOKAWA : Synthesis and biological properties of 7 $\beta$ -[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-4-carboxy-2-butenoylamino]-3-cephem-4-carboxylic acid (7432-S), a new oral cephem antibiotic. *J. Antibiot.* 40 : 1468~1470, 1987
- 2) NAKASHIMA M: T.UEMATSU, Y. TAKIGUCHI, A. MIZUNO, M. IIDA, T.YOSHIDA, S. YAMAMOTO, T. KITAGAWA, T. OGUMA, H. ISHII & H. YAMADA : Phase I clinical studies of 7432-S, a new oral cephalosporin : safety and pharmacokinetics. *J. Clin. Pharmacol.* 28 : 246~252, 1988
- 3) 木村靖雄, 中野雅夫, 中本省三, 吉田 正: 微生物学的定量法による 7432-S の体液内濃度測定法に関する検討. *Chemotherapy* 37 (S-1) : 738~747, 1989
- 4) KONAKA R : K. KURUMA, R. NISHIMURA, Y. KIMURA & T. YOSHIDA : High-performance liquid chromatographic analysis of a new  $\beta$ -lactam antibiotic, 6059-S (moxalactam). *J. Chromatogr.* 225 : 169~178, 1981
- 5) BRENDEL E : M. ZSCHUNKE & I. MEINEKE : High-performance liquid chromatographic determination of cefonicid in human plasma and urine. *J. Chromatogr.* 339 : 359~365, 1985

## HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF AN ORALLY ACTIVE CEPHEM ANTIBIOTIC 7432-S AND ITS METABOLITE 7432-S-TRANS IN BODY FLUID

AKIO MATSUURA, TAKAKO NAGAYAMA and TAKAYASU KITAGAWA  
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.  
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

We developed a high-performance liquid chromatographic (HPLC) assay method for a new oral cephem antibiotic, 7432-S, and its metabolite, 7432-S-trans. Two assay procedures were used for plasma and urine assays. The plasma sample was deproteinized with isopropyl alcohol, followed by clean-up extraction with dichloromethane. Clean-up for urine and bile samples was performed by manual chromatography using a Bond Elut C<sub>18</sub> column (Part No. 607303, Analytichem International). Treated samples were subjected to HPLC using a reversed-phase (C<sub>18</sub>) column and tetra-*n*-butylammonium biphosphate (Pic A) and tetra-*n*-amylammonium bromide as ion-pairing reagent.

With these methods, 7432-S and 7432-S-trans in plasma (0.1-20  $\mu\text{g/ml}$ ) and in urine (1-500  $\mu\text{g/ml}$ ) were accurately assayed with good precision. The methods were used for the measurement of 7432-S in plasma and urine of healthy volunteers after an oral dose of the drug. There was good correlation between the assay values obtained by HPLC and the bioassay method ( $r=0.995$  and  $r=0.993$ , respectively).

The stability of 7432-S was tested by assaying the spiked samples with human plasma and urine. 7432-S was stable at  $-70^{\circ}\text{C}$  for at least two months.

These methods, which combine high sensitivity, accuracy and precision are suited for pharmacokinetic analyses.

The assay method for the urine sample was also applicable to human bile. Both compounds (0.1-20  $\mu\text{g/ml}$ ) were assayed with the same precision.