

Teicoplanin の生体試料中濃度測定法に関する検討

橋本 泰行・永 富 光

マリオン・メレル・ダウ株式会社 開発研究所 枚方センター*

微生物学的定量法 (bioassay 法) ならびに高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) による teicoplanin (TEIC) の生体試料中濃度測定法を検討した。

Bioassay 法による TEIC 濃度測定は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする agar well 法で行なった。血漿試料はウマ血清で2倍以上希釈した後、また尿試料は2% ウマ血清含有 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で5倍以上希釈した後、測定に供した。定量限界は血漿および尿試料でそれぞれ 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で、測定誤差 10% 以内、変動係数 5% 以内であった。糞中 TEIC は、水 (pH 6.5), アセトン洗浄後、アルカリ水溶液 (pH 10) で抽出し、測定に供した。定量限界は 2.5 $\mu\text{g/g}$ (湿重量) であった。

HPLC 法は Sep-Pak[®]CN による固相抽出後グラジエント分析により主要6成分を分離定量した。定量限界は総 TEIC として血漿試料で約 5 $\mu\text{g/ml}$, 尿試料で約 15 $\mu\text{g/ml}$ であった。

血漿および尿試料における bioassay 法と HPLC 法には良好な相関が認められた。

Key words : Teicoplanin, bioassay, HPLC, bodyfluids

Teicoplanin (TEIC) はマリオン・メレル・ダウ株式会社 (レベティ研究センター) で開発された vancomycin (VCM) に化学構造の類似したグリコペプチド系注射用抗生物質で、 A_{2-1} , A_{2-2} , A_{2-3} , A_{2-4} , A_{2-5} からなる A_2 群および A_{3-1} の6主要構成成分からなり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌に対して優れた抗菌力を有する。その体内動態は VCM に比し長い消失半減期を有し、持続性および組織移行性に優れている¹⁾。

本剤の体内濃度測定法は微生物学的定量法 (bioassay 法)²⁾、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法)³⁾、SPERA 法⁴⁾、RASA 法⁵⁾ および FPIA 法⁶⁾ 等が報告されている。しかし、bioassay 法は、測定精度の検討が十分になされてなく、また予備検討で血漿および尿に個体差が認められた。また、糞中 TEIC の bioassay 法は十分な検討がなされていない。他の定量法は、TEIC に対する特異抗体もしくはアフィニティレジンを必要とし、その適用には制限がある。そこで日本での本剤開発における体内動態検討のため、bioassay 法では個体差の解消を含め、定量精度を改善するための新たな試料調整法を、HPLC 法については簡便な逆相固相抽出法を用いた新たな定量法を開発したので報告する。

I. 実験材料および方法

使用薬剤

TEIC はマリオン・メレル・ダウ株式会社 (レベティ研究センター) が製造した力価 928 $\mu\text{g/mg}$ (Lot No. 86 A 009) および、力価 953 $\mu\text{g/mg}$ (Lot No. 009) のものを使用した。HPLC 法における内標準物質には、3N-(3-methylbenzoyl)-5-fluoro-2'-deoxyuridine を用いた。

< Bioassay 法 >

1. 試料の調整

1) ヒト血漿

試料は市販ウマ血清 (阪大微研) または市販ヒト血清 (Flow Laboratories, Inc.) で希釈後測定に供した。

2) ヒト尿

試料は、2% (v/v) ウマ血清含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), または 1% (v/v) ヒト血清含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈後測定に供した。

3) ヒト糞

試料由来の物質による妨害を除去するため抽出を行

* 〒573 枚方市招提田近3-11

ない、抽出液を測定に供した。

糞試料約 1 g (湿重量) に 0.012 N 塩酸 10 ml を加え、ポリトロン (CH-6010 Kriens-LU, Kinematica) を用い糞ホモジネートを調製した。ホモジネートの pH を薄い水酸化ナトリウム溶液で 6.5 に調整し、ポリトロンで激しく攪拌後、遠心分離 (9,000 g, 10 min) し、上清を除去した。沈渣に同様の操作を再度行なった後、沈渣にアセトン 15 ml を加えポリトロンで激しく攪拌し、遠心分離 (1,500 g, 10 min) した。上清を除去後、沈渣に再度この操作を行なった。上清を除去した後、沈澱が固まらないようかき混ぜながらアセトンを蒸発させた。沈澱に水 5 ml を加えポリトロンで激しく攪拌後、1 N および 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液でホモジネートの pH を 10 に調整した。ホモジネートの pH を 10 に保ちながら、1 時間攪拌抽出した。遠心分離 (9,000 g, 15 min) 後抽出液を回収し、直ちに 1 N および 0.1 N 塩酸で pH を 6.5 に調整した。沈渣に水 3 ml を加え同様に抽出を行なった。得られた 1 回目および 2 回目の抽出液をそれぞれ測定に供した。

2. 測定条件

Erickson らの agar well 法²⁾ を用い測定した。ただし *Bacillus subtilis* ATCC 6633 胞子溶液 (Difco) の添加量および培養温度をそれぞれ、約 3×10^5 CFU/ml, 37°C に変更して測定した。

3. 標準溶液の調整

TEIC 1. パイアルを正確に秤量後、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), または 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解し、約 9 mg (力価)/ml の原液とした。

原液をヒトプール血漿で希釈した溶液を、市販のウマまたはヒト血清で試料血漿と等倍に希釈し、血漿測定用標準溶液として用いた。

原液を 2% (v/v) ウマ血清含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), または 1% (v/v) ヒト血清含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、尿測定用標準溶液として用いた。

非投与健常人より採取した糞からの 1 回目および 2 回目の抽出液 0.5 ml に、原液を 1% (v/v) ヒト血清含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し調製した TEIC 溶液 (10 μ l) を加え、0.16, 0.32, 0.64, 1.28 μ g/ml の標準溶液を調製し、1 回目の抽出液を 1 回目の抽出試料の測定に、2 回目の抽出液を 2 回目の抽出試料の測定に用いた。

<高速液体クロマトグラフィー法>

1. 試料の前処理

1) ヒト血漿

90% メタノール、水それぞれ 5 ml および 0.5 M glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.5) 2 ml で平衡化した Sep-Pak[®]CN (Waters) に血漿 400 μ l, 内標準物質溶液 (50 μ g/ml) 50 μ l および 0.5 M glycine-HCl 緩衝液 (pH 1.8) 500 μ l 混合液を添加し、減圧下で吸引し目的化合物を保持させた。水 5 ml で洗浄後、90% メタノール 2 ml で目的化合物を溶出し、窒素気流下 50°C で溶媒を除去した。残渣に HPLC 用移動相 A 液 (後述) 200 μ l を加えて溶解した。

2) ヒト尿

メタノール、水それぞれ 5 ml および 0.25 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 2 ml で平衡化した Sep-Pak[®]CN に尿 0.4 ml, 内標準物質溶液 (50 μ g/ml) 0.1 ml, 0.25 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 1.0 ml および水 0.4 ml の混合液を添加し、減圧下で吸引し目的化合物を保持させた。水 5 ml で洗浄後、70% メタノール 2 ml で目的化合物を溶出し、血漿と同様に溶媒を除去した後、残渣に HPLC 用移動相 A 液 400 μ l を加えて溶解した。

2. 分析条件

下記の条件でグラジエントで分析した。

分析カラム: Hypersil 5-ODS (4.6 \times 250 mm)

カラム温度: 40°C

移動相:

A 液, 25 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) - アセトニトリル (85:15, v/v)

B 液, 25 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) - アセトニトリル (30:70, v/v)

注入量: 20 μ l

流速: 2.0 ml/min

検出: UV 214 nm

A 液 100% で分析カラムを平衡化後、試料注入と同時に直線的にグラジエントをかけ 27 分後に A 液/B 液=70:30 (v/v) とした。

3. 検量線

血漿試料に対しては、ヒトプール血漿に総 TEIC 量として 2, 5, 10, 20 および 40 μ g/ml を、尿試料についてはプール尿に 4, 10, 20, 40 および 80 μ g/ml を添加し、それぞれ上記の方法で処理した。事前に確認した主要 6 成分 (A_{3-1} および $A_{2-1} \sim A_{2-5}$) の総 TEIC 量に対する構成比より各成分の添加量を算出し、それらの添加量に対する各成分の内標準物質に対するピーク高さ比を用いて直線 (血漿) あるいは両対数 (尿) 最小二乗法により検量線を求めた。

II. 結 果

<Bioassay 法>

1) ヒト血漿

非投与健常人由来の血漿に TEIC を添加し希釈をせず測定し、測定精度を検討した結果、約 30% の測定誤差を認めた (Table 1)。また凍結融解の繰り返しによっても同程度の差が認められた。Erickson ら²⁾ が標準希釈液として用いた市販ヒト血清で 5 倍希釈して測定した結果、添加量に対する検出量は、行なった濃度範囲内で良好な相関を示した (Fig. 1)。この場合の定量限界は 1.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。

ウマ血清で 2 倍希釈した場合、Fig. 2 に示す標準曲線が得られ、試料間の差も認められなかった。6 例の非投与健常人由来の血漿に TEIC を添加後、ウマ

血清で 2 倍希釈し測定した結果、測定誤差 10% 以下、変動係数 5% 以内であった (Table 2)。このとき血漿 1 ml あたりの定量限界は 0.6 μg 、検出限界は 0.4 μg であった。

2) ヒト尿

非投与健常人由来の尿に TEIC を添加し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 10 倍希釈後測定して得られた標準曲線は一致せず、直線性も得られなかった (Fig. 3)。同緩衝液にヒト血清を容量比で 1% 添加したもので 5 倍希釈後測定すると、添加量と検出量は良好な相関を示した (Fig. 4)。血清添加の有無によらず緩衝液を well に注入すると、周辺に白濁を生じるが測定には影響せず、定量限界は尿 1 ml あたり 1.0 μg であった。

Table 1. Individual differences in human plasma on bioassay*

Amount added ($\mu\text{g/ml}$)	Amount found ($\mu\text{g/ml}$) and relative error (%) of amount added			
	Plasma A	Plasma B	Plasma C	Plasma D
14.63	13.87 (- 5.2)	14.91 (+ 8.8)	13.57 (- 7.2)	16.26 (+11.1)
5.68	4.58 (-19.4)	6.37 (+12.1)	5.37 (- 5.5)	6.05 (+ 6.5)
1.89	1.29 (-31.7)	2.09 (+10.6)	1.62 (-14.3)	1.95 (+ 3.2)
0.38	0.31 (-18.4)	0.34 (-10.5)	0.33 (-13.2)	0.40 (+ 5.3)

*: Teicoplanin solutions for standard curve were prepared in plasma mixture. Plasma was collected from four different subjects.

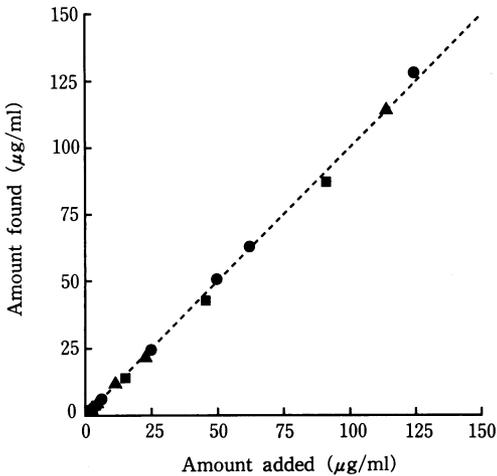


Fig. 1. Correlation between amounts added and found in three different human plasma samples diluted with commercial human serum.

Line shows the theoretical correlation.

●: Plasma A, ▲: Plasma B, ■: Plasma C

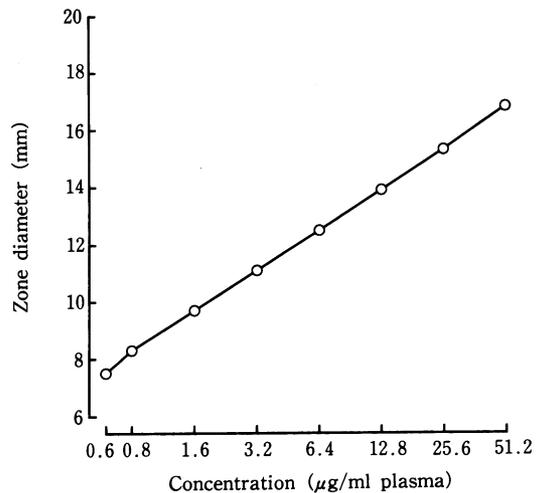


Fig. 2. Standard curve of teicoplanin in human plasma. Teicoplanin solutions for standard curve were prepared in diluted pooled human plasma with commercial horse serum (human plasma : horse serum = 1 : 1, v/v).

Table 2. Method validation of teicoplanin in human plasma* by bioassay

Amount added ($\mu\text{g/ml}$)	Relative recovery (%)						Mean	SD	CV(%)
	A	B	C	D	E	F			
39.38	98.5	103.3	103.3	98.5	103.3	103.3	101.7	2.5	2.4
15.76	104.1	99.0	104.1	99.0	104.1	104.1	102.4	2.6	2.6
3.94	99.0	99.0	104.1	99.0	99.0	99.0	99.9	2.1	2.1
1.98	99.0	103.0	103.0	99.0	99.0	109.1	102.0	4.0	3.9
0.66	100.0	100.0	106.1	100.0	106.1	100.0	102.0	3.2	3.1
0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	—

* : Each sample derived from six subjects was analyzed by 2 times dilution with horse serum.

ND : Not detected

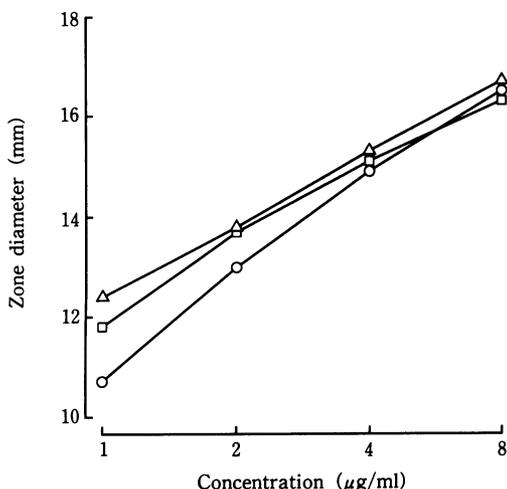


Fig. 3. Comparison of standard curves of teicoplanin in human urine.

Teicoplanin solutions for standard curves were prepared in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) (○), urine A diluted 10 times with the buffer (△), and urine B diluted 10 times with the buffer (□).

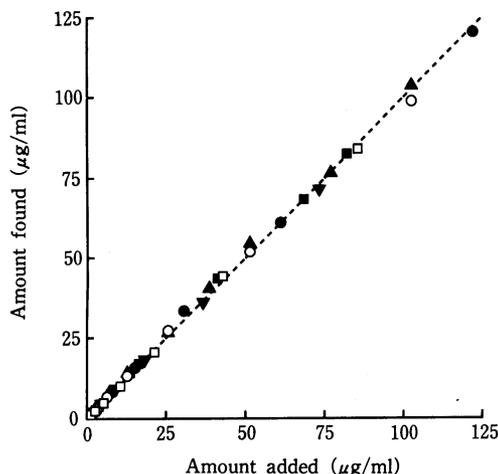


Fig. 4. Correlation between amounts added and found in six different samples of human urine.

Each urine sample was diluted 5 times with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% (v/v) commercial human serum. Line shows the theoretical correlation.

●: Urine A, ▲: Urine B, ■: Urine C, ▼: Urine D, ○: Urine E, □: Urine F

2% (v/v) ウマ血清含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に TEIC を添加し作成した標準曲線 (Fig. 5) により、非投与健常人由来の尿に TEIC を添加後、同緩衝液で 5 倍希釈して作成した試料を定量した結果、測定誤差 10% 以内、変動係数 5% 以内であった (Table 3)。定量限界は 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、検出限界は 0.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3) ヒト糞

非投与健常人由来の糞を弱酸性下 (pH 6.5) 水洗浄、次いでアセトン洗浄後、アルカリ水溶液 (pH 10) で抽出した。TEIC を添加した抽出液を用いて得られ

た標準曲線を Fig. 6 に示す。糞に TEIC を添加後同様に処理して得られた抽出液を試料とし、標準曲線を用いて定量したときの回収率は 67~99% であった (Table 4)。本法において、糞湿重量 1 g あたり定量限界は 2.5 μg 、検出限界は 1.2 μg であった。

<高速液体クロマトグラフィー法>

Fig. 7 に HPLC 法によるクロマトグラムを示した。主要 6 成分および内標準物質はいずれも良好な分離を示し、血漿成分による妨害ピークは認められなかった。内標準物質に対する各成分のピーク高さ比より作成した検量線は、いずれの成分もほぼ原点を通る良

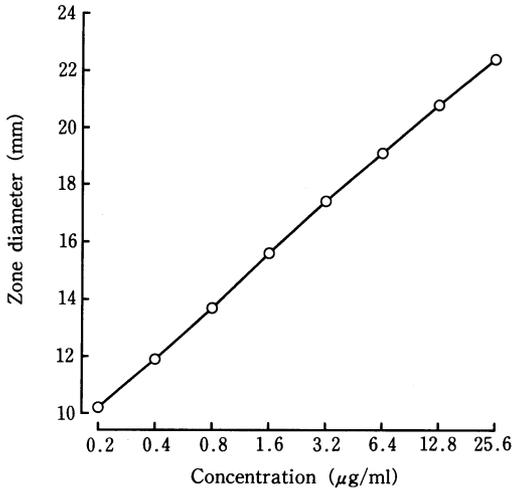


Fig. 5. Standard curve of teicoplanin for human urine. Teicoplanin solutions for standard curve were prepared in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 2% (v/v) commercial horse serum.

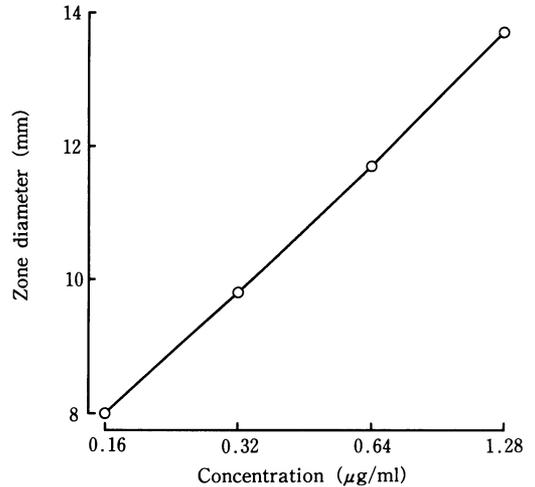


Fig. 6. Standard curve of teicoplanin for human feces. Concentration is presented as that in control feces extract.

Table 3. Method validation of teicoplanin in human urine* by bioassay

Amount added (μg/ml)	Relative recovery (%)					Mean	SD	CV (%)
	A	B	C	D	E			
128.0	99.1	99.5	100.4	101.7	101.7	100.2	1.0	1.0
32.00	106.3	106.7	106.3	107.2	107.7	106.8	0.6	0.6
8.00	101.9	106.3	106.9	104.4	110.6	106.0	3.2	3.0
2.00	100.0	97.5	102.5	102.5	105.0	101.5	2.9	2.8
0.00	ND	ND	ND	ND	ND	—	—	—

* : Each sample derived from five subjects was analyzed by 5 times dilution with 0.1M Tris-HCl buffer of pH 7.4 containing 2% (v/v) horse serum.

ND : Not detected

Table 4. Relative recovery of teicoplanin in human feces by bioassay method

Sample	Amount added (μg/g)	Recovery	
		(μg/g)	(%)
A	5.12	3.74	73.0
	3.84	3.05	79.4
B	6.67	5.35	80.4
	3.07	2.06	67.1
C	5.63	5.12	90.9
	3.07	2.77	90.2
D	6.14	4.66	75.8
	3.58	2.83	79.0
E	5.12	4.93	96.3
	3.32	3.31	99.5
F	5.12	5.07	98.9
	2.56	2.43	94.8

Certified amount of teicoplanin was added to ca. 1 g (wet weight) each.

好な直線性を示し (Fig. 8), 総 TEIC 量として 20 μg/ml 添加時の各成分の抽出率は, 94.8~101.0% であった。また, 2.34~37.5 μg/ml の濃度の測定試料を調製し, 各濃度 6 回の測定により本定量法の再現性, 定量精度を確認した。その結果, 2.34 μg/ml での定量精度が, 特に A₃₋₁ で, 不十分であると考えられ (Table 5), 血漿試料の定量限界を各成分 0.5 μg/ml, 総 TEIC 量として約 5 μg/ml と推定した。

尿試料においても血漿と同様いずれの成分も良好な分離を示し (Fig. 9), 同様に作成した検量線も良好な直線性を示した (Fig. 10)。80 μg/ml 添加時の各成分の抽出率は 85.0~95.6% であった。尿試料については血漿試料と比較して再現性が十分ではないが, 定量限界は各成分 1.5 μg/ml, 総 TEIC 量として約

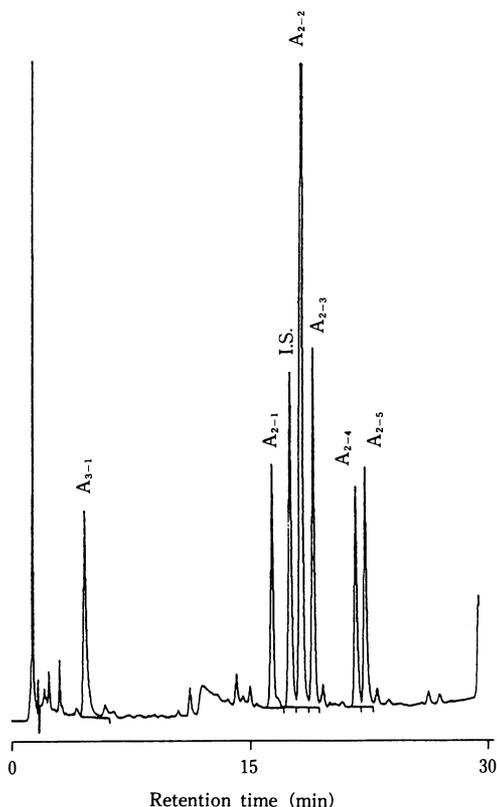


Fig. 7. HPLC chromatogram of teicoplanin at a concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$ in human plasma.

15 $\mu\text{g/ml}$ とした (Table 6)。

<Bioassay 法と HPLC 法との相関>

臨床試験において得られた血漿および尿試料をそれぞれの定量法で測定し bioassay 法と HPLC 法との相関性を検討した。Fig. 11 および 12 に示すように、血漿は相関係数 $r=0.983$ ($Y=1.088 X-0.630$, $n=169$), 尿は $r=0.980$ ($Y=0.918 X-1.470$, $n=117$) といずれも良好な相関が得られた。

III. 考 察

Bioassay 法は、試料中の抗菌活性を有する化合物の総量を検出することが可能であることより、TEIC の体内動態評価における基準となる測定法と考えられ、Erickson らがすでに高感度ヒト血中濃度測定法を報告している²⁾。しかし個々の検体に関する測定精度等は詳しく検討されていない。また、臨床試料等においては他の抗生物質との併用療法によって、この bioassay 法が使用できない場合が想定され他の定量法も必要となる。SPERA 法⁴⁾、RASA 法⁵⁾等は TEIC に対する特異抗体もしくはアフィニティレジンを必要とし、その適用には限界がある。そこで我々は、試料調整法等に検討を加え、bioassay 法を改良するとともに、抽出過程に市販の逆相固相抽出カラムを用いた HPLC 法の開発を検討した。

Bioassay 法において、測定には Erickson らの方法²⁾を用いたが、検定菌の生育の不均一性を避けるため培養温度を 37°C とし、同時に孢子液の添加量を調

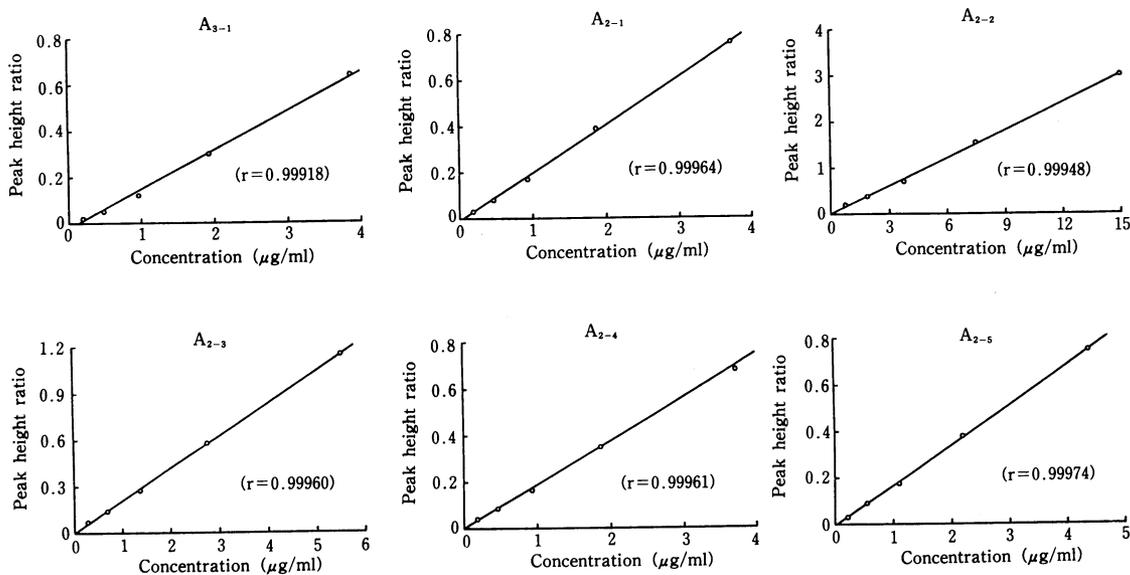


Fig. 8. Calibration curves of teicoplanin components in human plasma by HPLC assay.

Table 5. Relative recovery of teicoplanin from human plasma by HPLC method

Amount added* ($\mu\text{g/ml}$)		Components					
		A ₃₋₁	A ₂₋₁	A ₂₋₂	A ₂₋₃	A ₂₋₄	A ₂₋₅
37.5	Recovery (%)	93.6	93.7	93.7	94.5	95.5	95.1
	CV (%)	3.9	3.2	3.7	3.6	3.7	3.2
22.4	Recovery (%)	96.8	100.4	101.0	101.4	103.1	101.8
	CV (%)	7.5	6.3	6.4	6.9	6.3	6.8
9.37	Recovery (%)	91.9	95.3	96.2	97.7	98.4	103.8
	CV (%)	11.0	4.6	3.5	6.3	4.5	9.1
5.53	Recovery (%)	104.7	107.0	105.3	104.1	107.4	105.9
	CV (%)	7.9	6.9	6.0	6.7	9.7	10.1
2.34	Recovery (%)	114.6	104.6	102.3	103.7	110.1	110.1
	CV (%)	11.6	6.1	6.5	5.7	4.2	7.8

*: Amount of added teicoplanin expressed as total teicoplanin concentration.

(n=6)

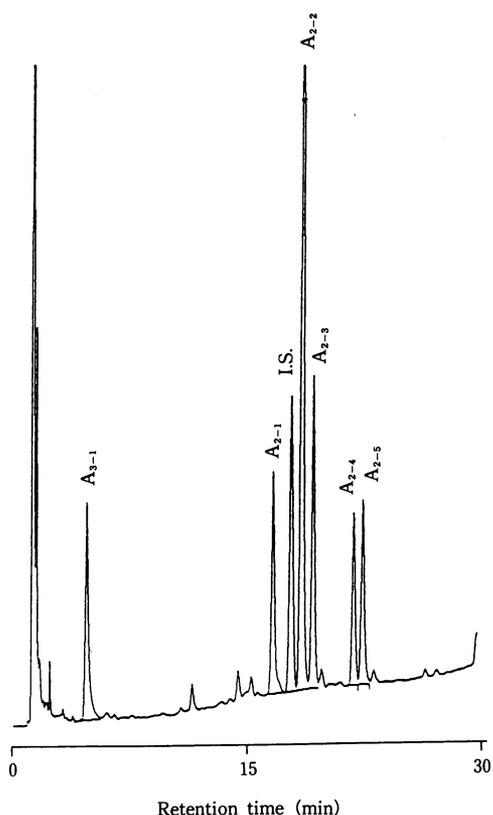


Fig. 9. HPLC chromatogram of teicoplanin at a concentration of 80 $\mu\text{g/ml}$ in human urine.

整した。Erickson らの方法²⁾では、個々の検体に関する測定精度については詳しく検討されていないため、個々の非投与健常人由来血漿を用い、TEICの測定精度を検討した結果、約30%の測定誤差が認められた (Table 1)。また、血漿の凍結融解による測定誤差も同程度認められたことより、血漿の個体差ならびに保存状況の差が阻止円形成に影響を与えるものと思われた。従って、血漿をそのまま測定に供するには問題があると考え、マトリックスの均一化をはかるため市販血清での希釈を行なった。市販血清で希釈することにより試料差は解消され、測定精度は著しく向上した (Fig. 1 および Table 2)。

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に TEIC を添加して作成した標準曲線に直線性が得られず (Fig. 3)、この非直線性は使用試験管材質により異なることから、TEICの試験管壁への吸着が考えられた。この現象は少量の血清を緩衝液に添加することで解消された (Fig. 13)。さらに希釈用緩衝液に血清を同様に添加することで、非添加時に認められた尿試料間の差も解消された (Fig. 4 および Table 3)。血清の添加量は、添加量の増加にともない測定感度が減少するため、必要最小限とした。

希釈および添加用血清として当初用いていた市販ヒト血清は、ヒト血液製剤の安全性が問題となり、入手困難な状況が生じたため、他の市販血清を検討した。その結果、ヒト血清を用いた場合より測定感度が高いウマ血清を採用した。また尿の希釈にリン酸緩衝液を用いた場合、well 周辺に生じる白濁は、測定用培地中

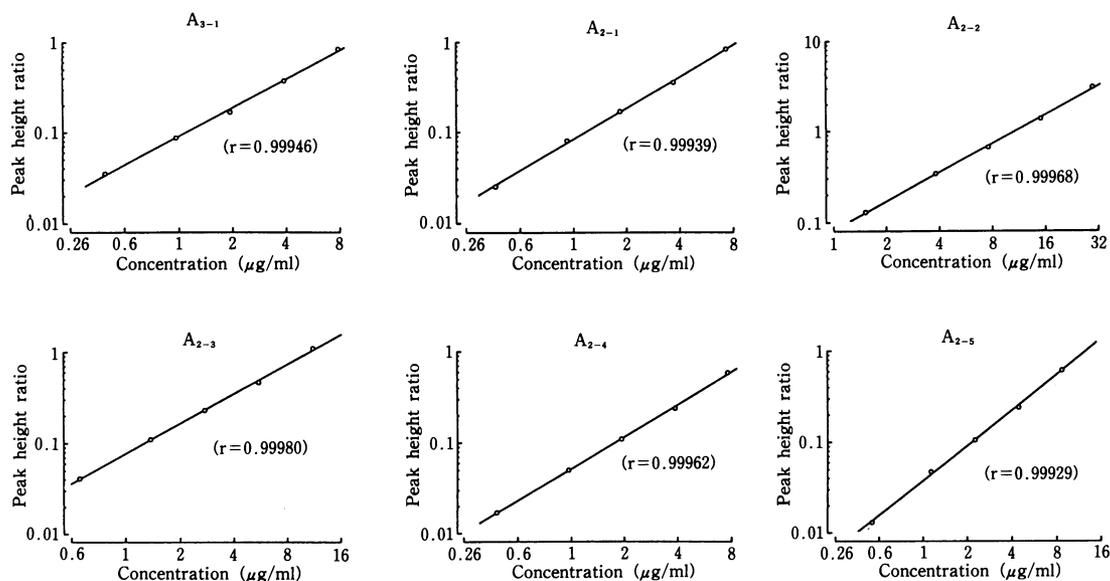


Fig. 10. Calibration curves of teicoplanin components in human urine by HPLC assay.

Table 6. Relative recovery of teicoplanin from human urine by HPLC method

Amount added* (μg/ml)		Components					
		A ₃₋₁	A ₂₋₁	A ₂₋₂	A ₂₋₃	A ₂₋₄	A ₂₋₅
81.2	Recovery (%)	95.5	99.2	97.5	97.4	94.1	90.9
	CV (%)	7.0	9.6	5.6	5.0	4.5	8.3
48.7	Recovery (%)	98.1	100.8	100.4	100.0	101.7	101.6
	CV (%)	8.0	7.5	6.3	6.4	6.5	7.8
16.2	Recovery (%)	101.4	98.8	99.6	98.0	100.4	104.7
	CV (%)	16.3	5.6	10.2	8.2	14.3	11.6
10.1	Recovery (%)	110.1	100.6	100.6	97.8	104.8	110.3
	CV (%)	18.2	5.6	9.1	4.7	7.5	8.3

*: Amount of added teicoplanin expressed as total teicoplanin concentration.

(n=6)

に多量のカルシウムが含まれることから²⁾, リン酸カルシウムの沈澱によるものと考え、白濁を生じない Tris-HCl 緩衝液を採用した。

糞からの TEIC の抽出を、溶媒に対する溶解性⁷⁾ から、アルカリ水溶液で検討したが、多量の測定妨害物質が同時に抽出され測定困難であった。抽出液を妨害物質の影響が無視出来るまで希釈する方法は、TEIC の糞中排泄量が少ないことより⁸⁾, 不適切と考え、抽出前に洗浄操作を導入した。水洗浄時における TEIC の損失を防ぐため、希塩酸 (0.012 N) でホモジナイズする一方、洗浄効果を上げるため遠心時の

pH は 6.5 に保った。この方法による抽出効率を含む測定精度は、血漿、尿に比し低いが、抗菌活性による糞中 TEIC 濃度の測定を可能にした。

今回開発したグラジエント HPLC 法では、血漿、尿ともに生体成分の定量に対する影響はなく (Fig. 7 および 9), 1 試料当たり約 50 分で測定が可能であった。定量限界は血漿 5 μg/ml (Table 5), 尿 15 μg/ml (Table 6) と bioassay 法と比較して高いが、投与後初期のピーク濃度の確認, trough 濃度の測定等の場合, bioassay 法で測定不可能な試料であっても測定を可能とする点で有用と考える。

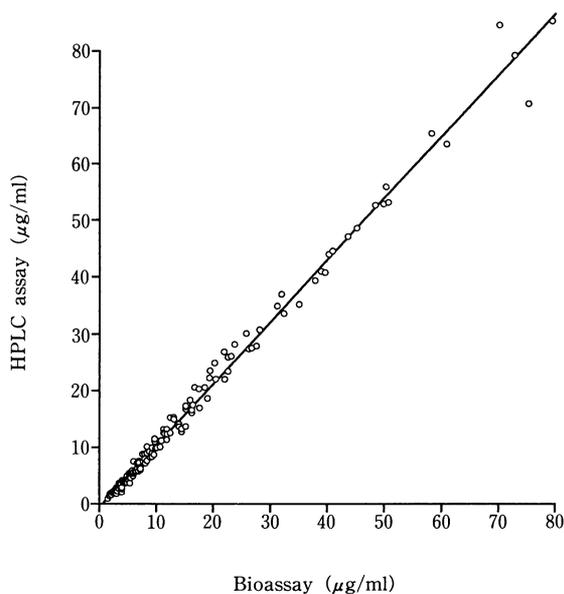


Fig. 11. Correlation between bioassay and HPLC assay of teicoplanin in human plasma.

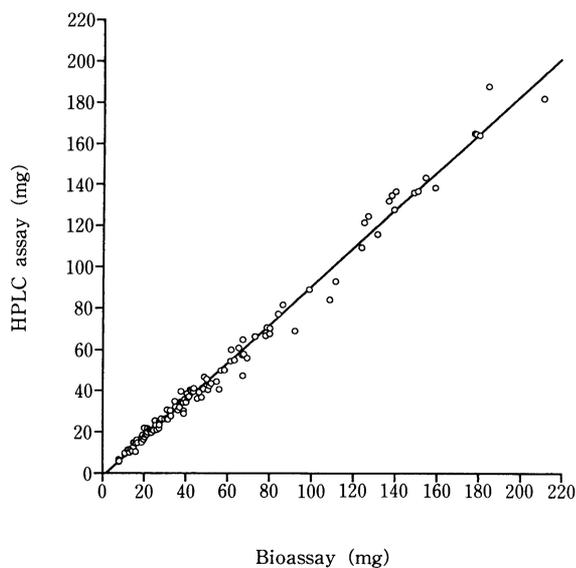


Fig. 12. Correlation between bioassay and HPLC assay of teicoplanin in human urine. Amounts excreted in each urinary sampling interval are plotted.

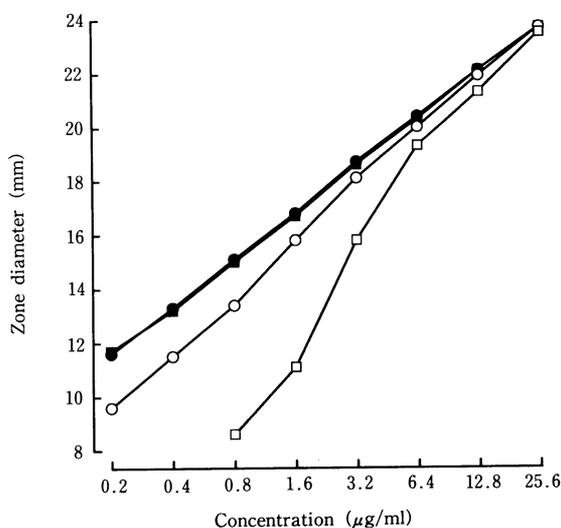


Fig. 13. Effects of tube material and serum addition on bioassay of teicoplanin.

Teicoplanin solutions for standard curves were prepared in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) with polystyrene tube (□) and glass tube (○) or in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% (v/v) commercial human serum with polystyrene (■) and glass (●).

今回改良、開発した bioassay 法および HPLC 法で投与試料を測定した結果の比較において、血漿、尿ともに良好な相関を示した (Fig. 11 および 12) ことは両方法の妥当性を示していると考えられる。

謝 辞

本論文を作成するにあたり貴重な助言をいただいた澤居米市、笠間 透 (マリオン・メレル・ダウ株式会社 開発研究所 枚方センター、薬物動態研究課) 両氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) Campoli-Richards D M, Brogden R N, Faulds D: Teicoplanin a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs* 40: 449~486, 1990
- 2) Erickson R C, Hildebrand A R, Hoffman P F, Gibson C B: A sensitive bioassay for teicoplanin in serum in the presence or absence of other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 12: 235~241, 1989
- 3) Riva E, Ferry N, Cometti A, Cuisinaud G, Gallo G G, Sassard J: Determination of teicoplanin in human plasma and urine by affinity and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 421: 99~110, 1987

- 4) Cavenaghi L, Corti A, Cassani G: Comparison of the solid phase enzyme receptor assay (SPERA) and the microbiological assay for teicoplanin. *J Hosp Infect* 7 (Suppl A) : 85~89, 1986
- 5) Corti A, Cavenaghi L, Giani E, Cassani G: A receptor-antibody sandwich assay for teicoplanin. *Clin Chem* 33: 1615~1618, 1987
- 6) Rybak M J, Bailey E M, Reddy V N: Clinical evaluation of teicoplanin fluorescence polarization immunoassay. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1586~1590, 1991
- 7) Bardone M R, Paternoster M, Coronelli C: Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *J Antibiot* 31: 170~177, 1978
- 8) Buniva G, Del Favero A, Bernareggi A, Patoia L, Palumbo R: Pharmacokinetics of ¹⁴C-teicoplanin in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 21 (Suppl A) : 23~28, 1988

Method examination of teicoplanin in biological samples

Yasuyuki Hashimoto and Hikaru Nagatomi

Marion Merrell Dow K.K. Development Laboratories Hirakata Center
11 Shodai-Tajika 3-Chome, Hirakata-shi, Osaka 573, Japan

We examined the method to analyze teicoplanin (TEIC) concentration in biological samples by both bioassay and high performance liquid chromatography (HPLC).

Bioassay by the agar well method used *Bacillus subtilis* ATCC 6633 as the test microorganism. TEIC was analyzed in plasma with more than 2 times dilution with horse serum and in urine with more than 5 times dilution with Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 2% (v/v) horse serum. The lower limits of quantification (LLQ) in plasma and urine were 0.6 $\mu\text{g/ml}$ and 1.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Both samples could be analyzed within an error of 10% and less than a 5% coefficient of variation. TEIC in feces had 2.5 $\mu\text{g/g}$ wet weight as LLQ when the fecal extract with alkaline (pH 10) was analyzed after washing with water (pH 6.5) followed by acetone.

Six major components were analyzed by HPLC (gradient elution method) using solid phase extraction with Sep-Pak™ CN. LLQs in plasma and urine were about 5 $\mu\text{g/ml}$ and 15 $\mu\text{g/ml}$ as total TEIC, respectively.

Our bioassay and HPLC methods were shown to have a close correlation.