

Azithromycinの体液内濃度測定法に関する研究

沢田安房・武藤秀弥・榎垣一憲・下岡新雄

ファイザー製薬株式会社新薬開発センター*

Azithromycin (AZM) の生体試料中濃度測定法および試料中での安定性について検討した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC法) では電気化学検出器を用いることにより血清および尿中AZMならびに主要代謝物の同時定量が可能となった。HPLC法によるAZMの検出限界は血清; 0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および尿; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

微生物学的定量法 (bioassay) ではAZMに高い感受性を示す *Micrococcus luteus* ATCC9341 を検定菌として用い、検定用培地として Antibiotic medium No. 11 を用いたペーパーディスク法により血清、尿および胆汁中のAZM濃度を測定することが可能であった (検出限界: 血清; 0.006 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 尿; 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および胆汁; 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。今回検討したHPLC法およびBioassay法を用いて健康成人にAZMを経口投与した時の血清中濃度を測定した結果、両測定法による測定値間に高い相関性が認められた (相関係数: 0.998)。

血清および尿中におけるAZMの安定性を検討した結果、凍結保存 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下) 下、血清および尿いずれの試料中でも少なくとも1ヵ月間は安定であった。

Key words : Azithromycin, Bioassay, HPLC, Biological fluid

Azithromycin (AZM) は米国ファイザー社において開発された新規15員環マクロライド系半合成抗生物質であり、erythromycin (EM) のラクトン環の9a位にN-メチル基を導入した構造を持つ (Fig. 1)。EMと比較して胃酸に対して安定¹⁾であり、またグラム陽性菌のみならずグラム陰性菌に対する抗菌力が改善された点で優れている²⁾。

AZMの主要代謝物として、脱クラジノース体 (以下M-1と略す)、3'-N脱メチル体 (以下M-2と略す)、6-N脱メチル体 (以下M-3と略す) が、尿および糞中に検出され (Fig. 1)、その他に脱ジメチル体、クラジノースのO-脱メチル体およびラクトンまたはデソサミンの水酸化体等の微量代謝物の存在が確認されている³⁾。

本報では、AZMの体内動態を検討するにあたって、微生物学的定量法 (Bioassay法) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC法) による定量法 (尿試料では代謝物との同時定量法) ならびに生体試料中での安定性について検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

AZMおよび代謝物の各標準品 (M-1, M-2およびM-3) は米国ファイザー社より供与を受けた。

HPLC測定時に内部標準物質 (I.S.) としてリン酸オレアンドマイシン (ファイザー製薬) を用いた。

2. 試薬

試料の前処理で用いたジエチルエーテル、移動相に用

いたアセトニトリルおよびメタノール等の有機溶媒、ならびに緩衝液の調製等に使用した試薬はいずれも特級品を使用した。

3. 標準試料用生体試料

血清はあらかじめ抗菌薬等の投与のない健康人から採取したものまたは市販のヒト血清 (日本生物材料センター) を用い、尿は健康人数名から採尿しプールしたものをを用いた。また、胆汁は胆道疾患の手術時に得たものを無菌フィルターでろ過して用いた。

4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC法)

1) 試料の前処理

試験管に一定量のI.S. メタノール溶液を加え、窒素気流下で蒸発乾固 (室温) した後、ヒト血清1mlまたは尿0.2mlを加え Fig. 2 に従って前処理し、HPLC分析に供した。

2) 添加検量線

試験管に既知量のAZM (尿測定時にはAZMと代謝物) および一定量のI.S. メタノール溶液を加え、窒素気流下で蒸発乾固 (室温) した。次にブランク血清1mlまたは尿0.2mlを加え、Fig. 2 に従って前処理し、HPLC分析に供した。得られたクロマトグラムにおけるAZM (または代謝物) のI.S. に対するピーク高さ比を求め、添加濃度に対しプロットし検量線 (一次回帰式) を作成した。

3) HPLC測定条件

血清および尿試料についてのHPLC測定条件はTable 1 に示した。

5. 微生物学的定量法(Bioassay法)

1) 検定菌

Micrococcus luteus ATCC9341を検定菌として使用した。

2) 検定用培地

Antibiotic Medium No. 11 (AM11, Difco), Brain heart infusion agar (BHIA, Difco) および Diagnostic sensitivity agar (DST, Difco) を用いた。

3) 検定菌液の調製

Heart infusion agar (HIA, Difco) にて培養した *M. luteus* を Brain heart infusion broth (BHIB, Difco) に接種し、28℃で48時間培養した菌液を650nmにおける透過率が38%前後になるように希釈し検定菌液とした(このときの菌量は約 7×10^7 CFU/ml)。

4) 標準溶液

一定量のAZMを正確に秤量し、少量のメタノールで溶解後、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5, 1% Tween 80含有)で希釈したものをさらに同緩衝液または血清ならびに

尿、胆汁で希釈して標準希釈系列を調製した。

5) 検定方法

検定菌液を接種した検定用培地7mlを直径90mmのプラスチックシャーレに分注し、水平台上で固化させ寒天平板を作成し、4℃で1時間程度保存した。検定液50 μ lを染み込ませたペーパーディスク(8mm, thick, 東洋濾紙株式会社)を検定用培地に貼り付け、4℃で2時間予備拡散した後、28℃で20時間(または37℃で14時間)培養した。形成した阻止円の直径を測定し、作成した検量線から試料中のAZM濃度を求めた。

6. HPLC法およびBioassay法の比較

健康成人男子6名にAZM 500mgを単回経口投与した時に得られた血清をHPLC法およびBioassay法で測定し、両測定法の定量値間の相関を検討した。

7. 生体試料中における安定性

AZMを添加したヒト血清および尿試料を室温、4℃および-20℃で保存した時の経時的な濃度変化をHPLC法によって検討した。

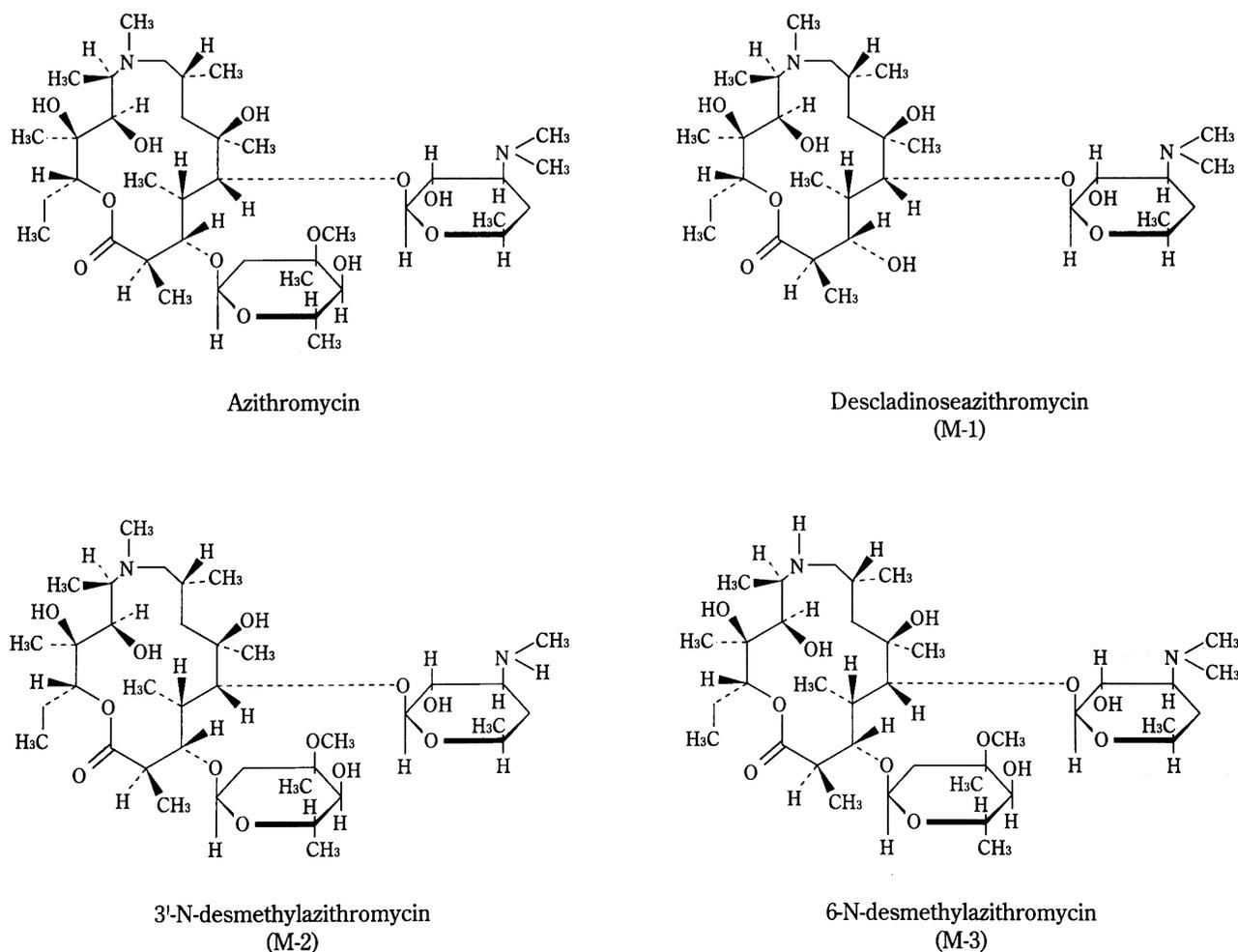


Fig. 1. Chemical structure of azithromycin and its metabolites.

II. 結 果

1. HPLC法

1) HPLC条件

HPLC分析時、AZMおよびその代謝物(M-1, M-2およびM-3)の保持時間は移動相用緩衝液のpHのわずかな変化により大きく左右された(Fig. 3)。AZMおよび上記3つの代謝物はいずれも移動相のpHが6.1から6.9に上がるに従って保持時間が長くなる傾向にあり、I.S.を含むこれら4つの化合物および生体成分由来ピークを最も良

好に分離できるpHは6.6であると考えられた。AZM投与後のヒト尿中にはこれら3つの代謝物が検出されたことから移動相のpHを6.6とし、血清中には代謝物のピークは認められなかったので、測定時間の短いpH 6.3の移動相を用いた。

AZM, 代謝物およびI.S. のボルタモグラムをFig. 4に示した。AZM, 代謝物およびI.S. のピーク高さ(電流量)は、いずれも印加電圧+1.2Vでほぼ定常状態に達した。血清中濃度測定時には印加電圧を+1.2Vに設定し、尿中

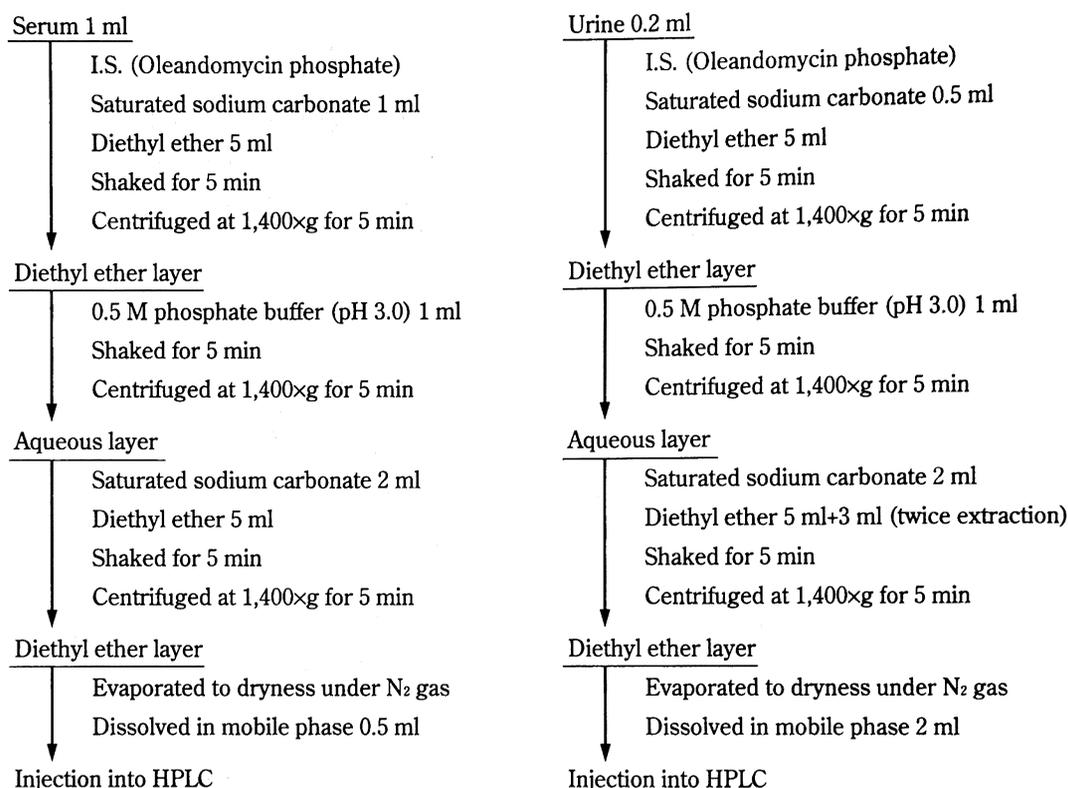


Fig. 2. Pretreatment method of azithromycin in serum and urine.

Table 1. HPLC condition

Instrument	JASCO BIP-I pump SHIMADZU SIL-2A autosampler IRICA E-502 ampero metric detector (equipped carbon working electrode and Ag/AgCl reference electrode) SHIMADZU C-R4A integrator
Column	ODP-50 5 μ m 4.6 mm i.d. \times 250 mm (Asahipak)
Mobile phase	serum; 40 mM phosphate buffer (pH 6.3)/acetonitrile/methanol (70:24:6) urine; 40 mM phosphate buffer (pH 6.6)/acetonitrile/methanol (73:22:5)
Flow rate	0.8 ml/min
Column temperature	room temperature
Detection	applied potential serum: +1.20 V, urine: +1.15 V

濃度測定ではpHの上昇によるバックグラウンド電流の増加ならびにベースライン変動を考慮して印加電圧を+1.15Vに設定した。

2) 血清中AZMの定量

ヒト血清に既知濃度のAZMを添加し、前述のHPLC法

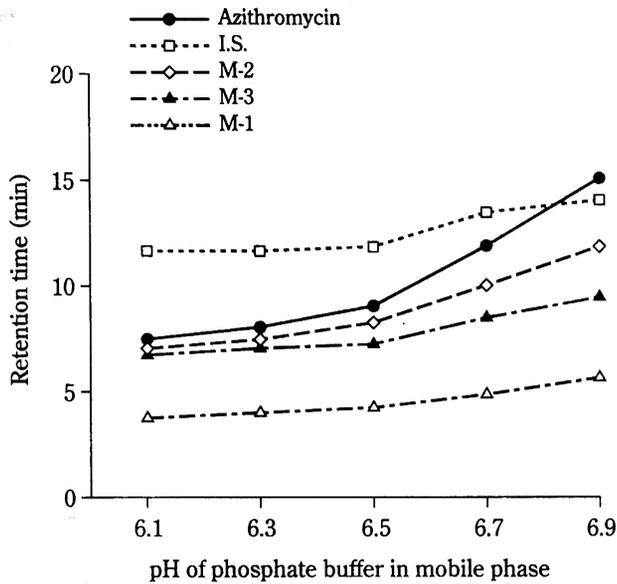
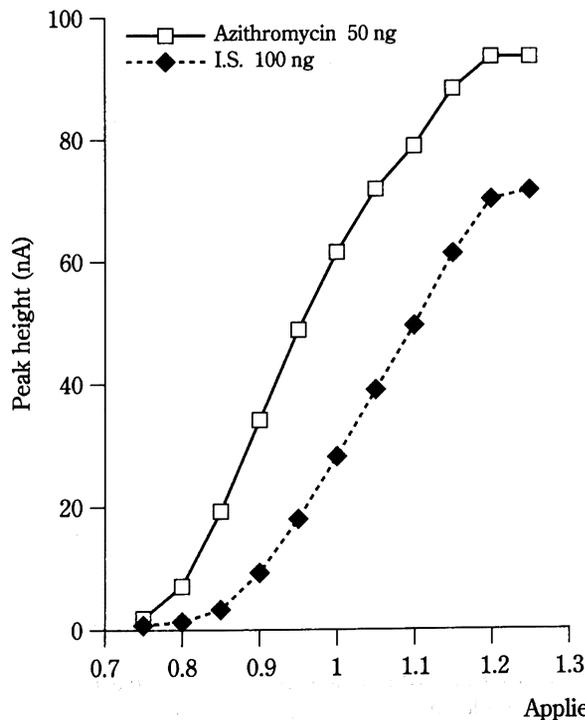


Fig. 3. Correlation between retention times of azithromycin, its metabolites and pH of mobile phase.



に従って抽出後測定し、そのクロマトグラムをFig. 5に示した。血清由来成分による影響は認められず、AZMおよびI.S.の分離は良好であった。回収率はTable 2に示したように高濃度域でやや回収率が低下する傾向が見られたが、いずれの添加濃度においても高い回収率(71.4~92.7%)が得られた。この時の検出限界は0.004 μ g/mlであった。

3) 尿中AZMおよび代謝物(M-1, M-2, M-3)の定量

ヒト尿に既知濃度のAZMおよび各代謝物を添加し、前述のHPLC法に従って抽出後測定した時のクロマトグラムをFig. 6に示した。尿由来成分による影響は認められず、AZM、代謝物およびI.S.の分離は良好であった。この時のAZMおよび各代謝物の前処理操作による回収率をTable 3に示した。いずれの添加濃度においても高い回収率(約70%)が得られた。検出限界はAZM; 0.1 μ g/ml, M-1; 0.05 μ g/ml, M-2; 0.2 μ g/ml, M-3; 0.2 μ g/mlであった。

2. Bioassay法

1) 検定菌

海外の報告^{4,5)}でAZMの定量に検定菌として用いられている*M. luteus* ATCC9341を使用した。

2) 検定用培地の選択

M. luteus ATCC9341を検定菌とするペーパーディスク法により3種の培地(AM11, BHIAおよびDST)について検出感度および定量性を検討した。阻止円径はAM11

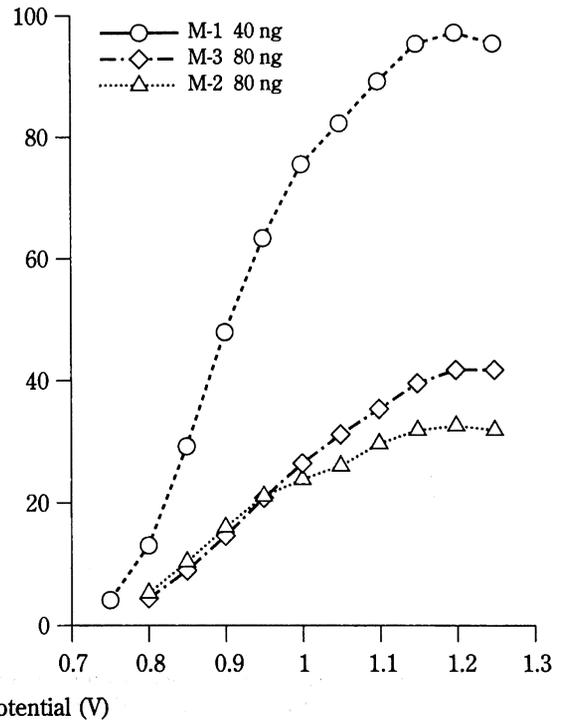


Fig. 4. Voltammograms of azithromycin, its metabolites and internal standard.

が最も大きく鮮明であり、検出感度および定量性に最も優れていた (Fig. 7)。

3) 接種菌量の影響

接種菌量 0.5, 1.0 および 2.0% について比較した。阻止円径は接種菌量が 0.5% のとき最も大きく、1%, 2% と接種菌量が多くなるにつれて阻止円径は小さくなった。阻止円の形成状態については 0.5% ではコロニーが疎となりやや不鮮明であったが、1% および 2% では阻止円は鮮明であった。しかし 2% では若干測定感度が低下するので、接種菌量は 0.5% または 1% が適当であると考えられた (Fig. 8)。

4) 予備拡散の検討

予備拡散について検討した結果、4°C で 2 時間予備拡散を行うことにより形成された阻止円径は大きく鮮明となった。

5) 培地量の影響

阻止円径に対する培地量の影響を 7, 10 および 15 ml で検討した結果、7 ml の時が最も阻止円径が大きく感度が良好であった。

6) 希釈用緩衝液の pH および緩衝液に添加した Tween 80 の影響

0.1 M リン酸緩衝液の pH を 6.0, 7.5 および 8.0 に調整し、AZM の検量線を比較した。pH 7.5 および 8.0 では阻止円径が大きく鮮明であったが、pH 6.0 では阻止円径が小さくなった (Fig. 9)。また、標準溶液の調製に用いた 0.1 M

リン酸緩衝液 (pH 7.5) に 1% Tween 80 を添加した場合と添加しなかった場合を比較した結果、添加した方が阻止円が大きくなった。

7) 血清、尿および胆汁の影響

ヒト血清を用いて作成した検量線を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5, 1% Tween 80 含有) を用いて作成した検量線と比較した。血清で作成した検量線では緩衝液の場合に比べ、低濃度 (0.006 $\mu\text{g}/\text{ml}$) まで測定が可能であった (Fig. 10)。

尿原液および 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5, 1% Tween 80 含有) で希釈した尿を用いて検量線を作成した (Fig. 11)。尿原液で作成した検量線では阻止円径が小さく不鮮明であったが、リン酸緩衝液で少なくとも 4 倍以上希釈することにより尿の影響が抑えられ阻止円径が鮮明となった。

Table 2. Recoveries of azithromycin from spiked human serum

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Recovery (%)	CV (%)
0.05	92.7 \pm 3.1	3.3
0.1	80.3 \pm 2.7	3.4
0.25	73.9 \pm 2.2	3.0
0.5	73.9 \pm 1.7	2.3
1.0	71.4 \pm 1.6	2.2

(Mean \pm SD, n=3)

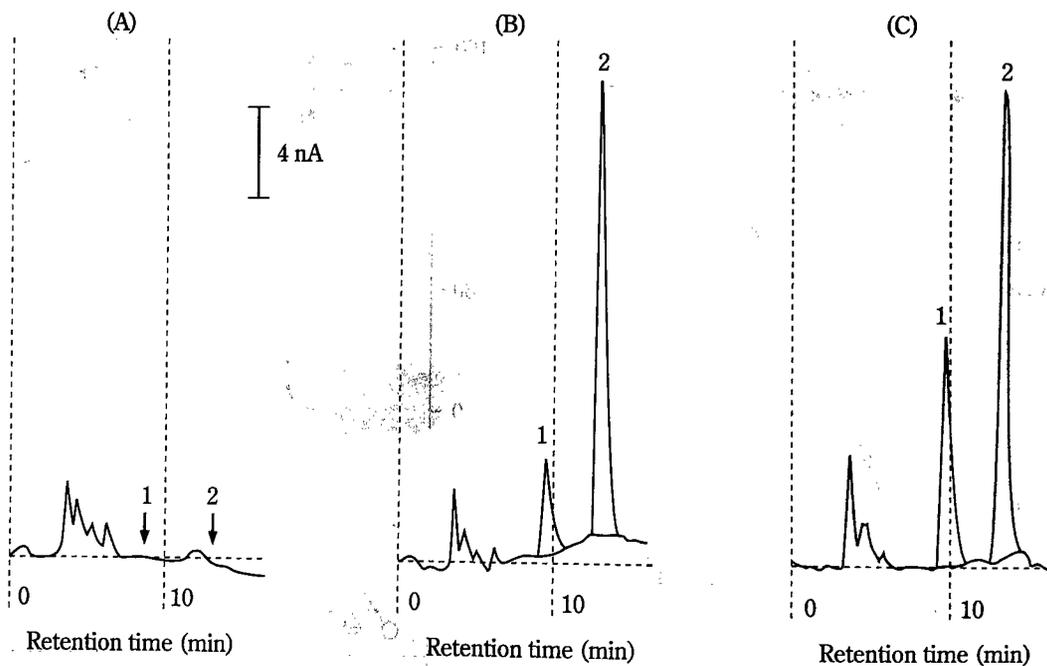


Fig. 5. HPLC chromatograms of extracts from (A) control human serum, (B) human serum spiked with azithromycin and (C) serum collected from a healthy volunteer 3 h after single 500 mg dose of azithromycin.

Peaks 1 = azithromycin, Peaks 2 = internal standard

胆汁原液で作成した検量線ではリン酸緩衝液を用いて作成した検量線よりも阻止円径が大きく鮮明であった。これらBioassay法によるそれぞれの試料の検出限界は血清で0.006 μ g/ml, 尿で0.04 μ g/ml, 胆汁で0.02 μ g/mlであった。

3. HPLC法とBioassay法との比較

健康成人男子にAZM 500mgを経口投与した時の血清試料をHPLC法とBioassay法で測定した。両測定法による測定値の相関図をFig. 12に示した。相関係数は $r=0.998$ と良好であった。回帰直線の傾きは1.038であり、HPLC法の測定値とBioassay法の測定値との間にはほぼ1:1の対応が認められた。

4. ヒト血清および尿中での保存安定性

ヒト血清および尿にAZMを添加し、各温度で保存したときの経時的安定性を検討し、Table 4に示した。AZMは血清中では -20°C で保存した場合少なくとも1ヶ月間安定であることが示された。なお、室温では少なくとも24時間安定であった。また、AZMを尿中で室温保存した時、24時間後の残存率は87.1%と若干低下した。冷蔵保存では24時間安定であった。 -20°C で1ヶ月間保存した時の残存率は約90%であった。

III. 考 察

1. HPLC法

生体液中のAZMのHPLC定量法についてはShepard⁶⁾ら

Table 3. Recoveries of azithromycin and its metabolites from spiked human urine

Compound	Concentration (μ g/ml)	Recovery (%)	CV (%)
Azithromycin	10	83.5 \pm 3.1	3.7
	20	81.9 \pm 4.0	4.9
	50	86.9 —	—
	100	85.9 \pm 2.0	2.4
Descladinose azithromycin (M-1)	2.5	66.0 \pm 1.9	2.9
	5.0	69.7 \pm 1.7	2.4
	12.5	73.9 —	—
	25.0	74.0 \pm 1.6	2.2
3'-N-desmethyl azithromycin (M-2)	3	79.2 \pm 4.8	6.1
	6	74.6 \pm 2.1	2.8
	15	75.3 \pm 2.5	3.3
	30	76.5 \pm 0.7	0.9
6-N-desmethyl azithromycin (M-3)	2.5	77.8 \pm 3.8	4.9
	5.0	66.8 \pm 1.1	1.6
	12.5	65.4 \pm 1.7	2.6
	25.0	63.4 \pm 1.6	2.5

(Mean \pm SD, n=2 or 3)

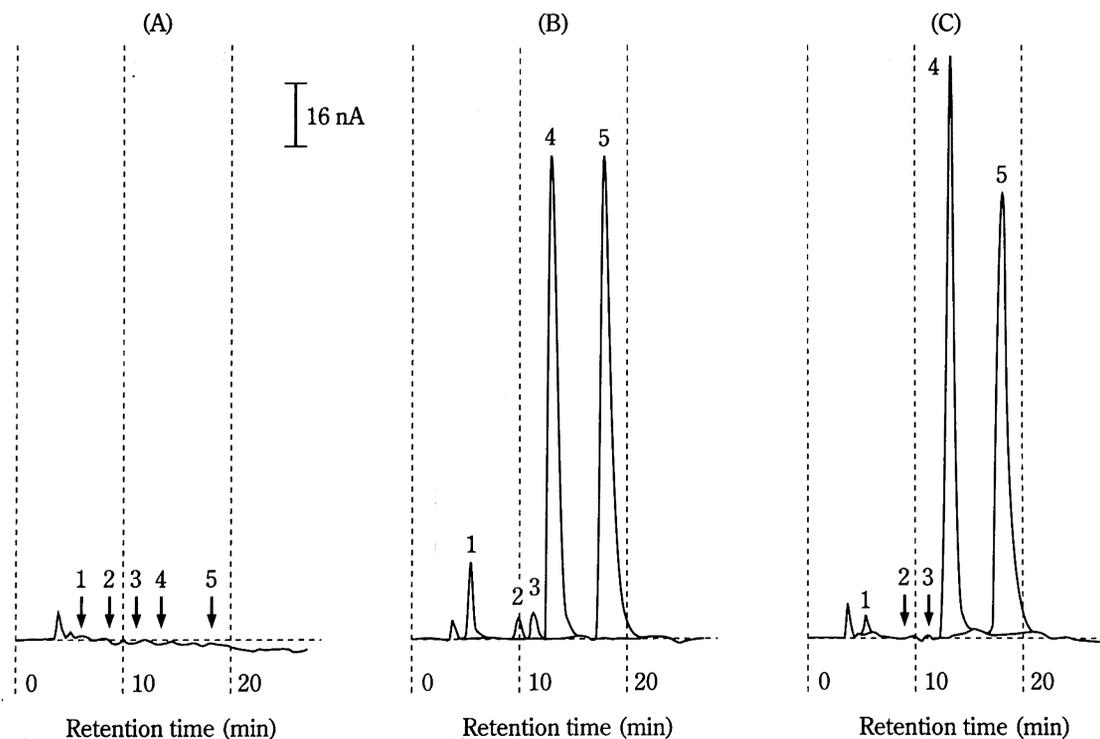


Fig. 6. HPLC chromatograms of extracts from (A) control human urine, (B) human urine spiked with azithromycin and (C) urine collected from a healthy volunteer 0-2 h after single 500 mg dose of azithromycin.

Peaks 1 = M-1, Peaks 2 = M-3, Peaks 3 = M-2, Peaks 4 = azithromycin, Peaks 5 = internal standard

のHPLC-ECD法が報告されているが、移動相に用いる緩衝液のpHが11.0であり、電気化学検出器の特性およびアルカリ耐性カラム入手難易性等を考慮して測定法の改良を試みた。本法ではポリマー系充填剤を用いた逆相カラムを使用し、移動相の条件を改良し、AZMおよび代謝物(M-1, M-2およびM-3)の血清および尿中濃度測定法を確立した。

AZM, M-1, M-2およびM-3についてボルタモグラムを作成した結果、至適印加電圧は1.15~1.20Vと高い電圧を要した。しかしながら、ベースラインの安定性は良好で移動相組成の検討により、血清または尿由来の生体成分とAZM, 各代謝物およびI.S. を良好に分離することができた。

HPLC-ECD法により生体試料中の薬物を高感度に定量

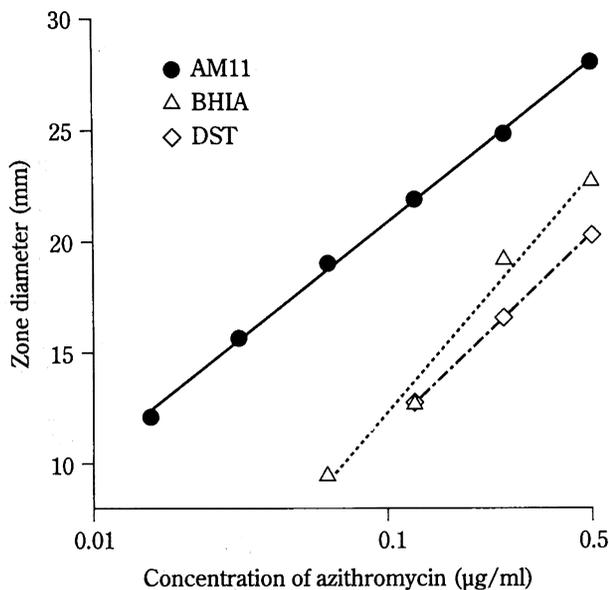


Fig. 7. Comparison of standard curves of azithromycin on various test medium.

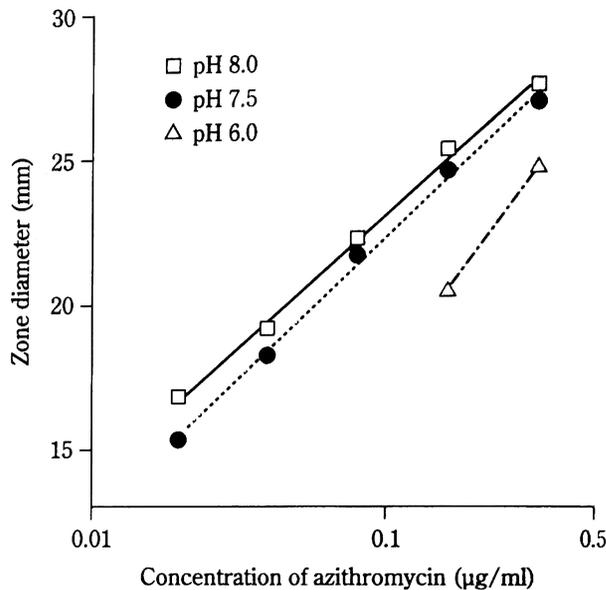


Fig. 9. Effect of pH of diluent on standard curves of azithromycin.

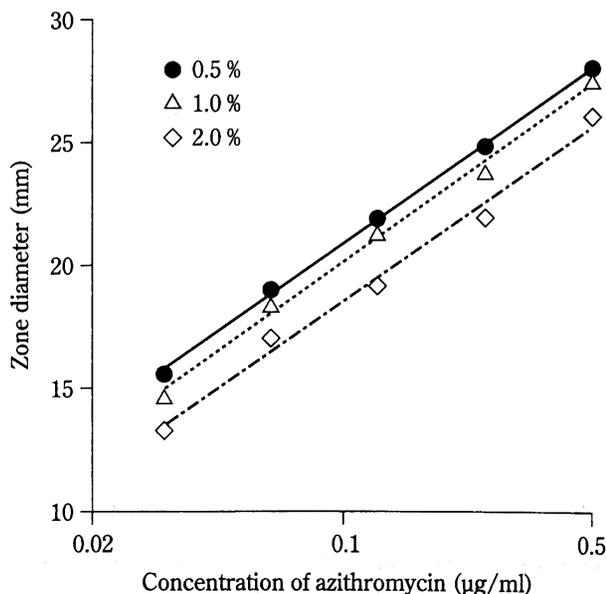


Fig. 8. Effect of inoculum size on standard curves of azithromycin.

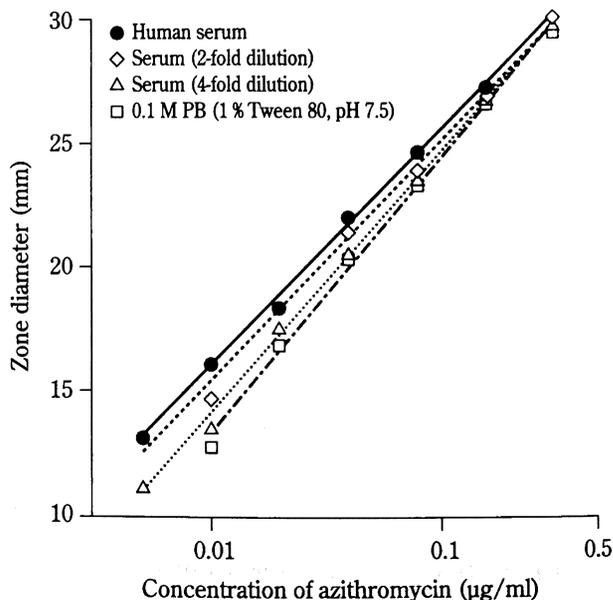


Fig. 10. Effect of human serum on standard curves of azithromycin in 0.1 M phosphate buffer (1% Tween 80, pH 7.5).

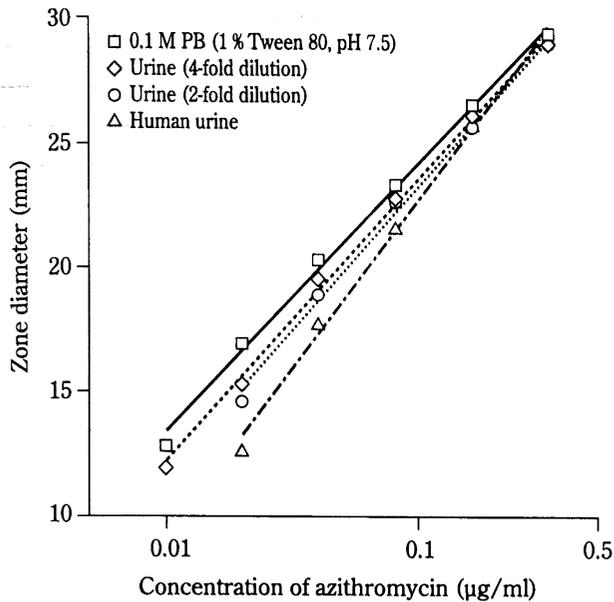


Fig. 11. Effect of human urine on standard curves of azithromycin in 0.1 M phosphate buffer (1% Tween 80, pH 7.5).

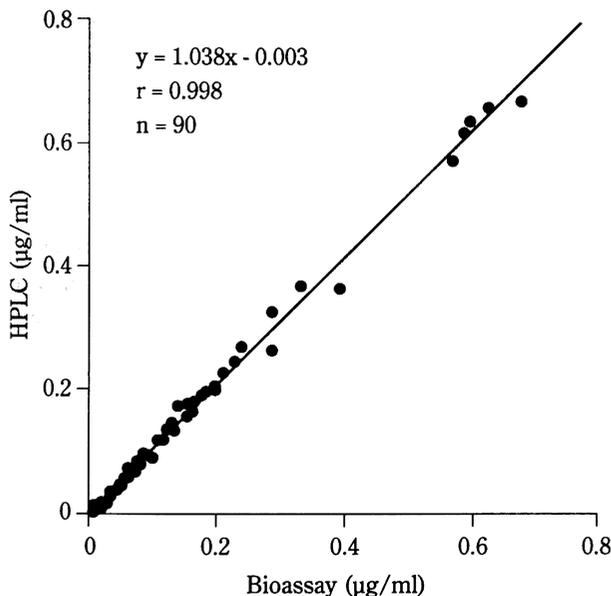


Fig. 12. Correlation between azithromycin concentrations in human serum determined by HPLC and bioassay method.

する際に分析の妨げとなる電気化学的活性を有する内因性物質を取り除くため、試料中の前処理法を検討した。血清の場合、アルカリ(飽和炭酸ナトリウム)条件下でエーテル抽出し、リン酸緩衝液(0.5M, pH 3.0)によって逆抽出した後、再度アルカリ条件下でエーテル抽出することによって内因性物質をほぼ除去することができ、同時に良好な回収率を得た。また、尿についても血清と同様の前処理方法で良好な回収率を得ることができた。

2. Bioassay法

AZMのペーパーディスク法による微生物学的定量法(Bioassay)をTable 5に要約した。本薬の血清中濃度測定にはヒトの臨床投与量での血清中濃度を考慮した場合、0.010 μ g/ml程度まで測定できることが望ましい。そこで検定菌にはAZMに高い感受性を示す*M. luteus* ATCC9341を用いることにより高感度測定が可能となった。測定法はペーパーディスク法で検討したが、Girardら⁴⁾のアガーウェル拡散法と同等の検出感度を得られた。

血清試料の測定に際しては、試料中の血清の割合が高いほど阻止円が大きくなる傾向が認められた。標準溶液は血清の割合が試料溶液と同じになるようにリン酸緩衝液で希釈し測定に供した。

尿試料の測定は、試料を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.5, 1% Tween 80含有)で通常10~500倍希釈して測定するため、同緩衝液で標準希釈系列を調製し定量した。

胆汁試料は、血清試料と同様標準溶液と試料液中の胆汁濃度を50%として条件をそろえた。

臨床第I相試験(500mg単回投与)の血清についてHPLC法およびBioassay法の両測定法で定量したところ、測定値の相関性は高く($r=0.998$)、両法の測定値間に1:1の対応が認められたことから血清中に活性代謝物は存在しないものと考えられた。またHPLCのクロマトグラム上にAZMのピークのみが検出され、代謝物のピークは認められなかったことから血清中には代謝物が存在しないことが示唆された。

血清および尿中AZMは -20°C で凍結保存した場合、1ヶ月(通常分析に要する時間)は安定であることが確認された。室温保存では尿においてわずかに残存率の低下が認められたが通常のHPLC測定またはBioassay法による

Table 4 Stability of azithromycin in human serum and urine under various condition

Sample	Storage condition	Residual content (%)/Storage period					
		0 time	2 h	4 h	6 h	24 h	1 month
Serum	RT	100	97.1 \pm 2.6	96.7 \pm 3.8	101.3 \pm 7.5	97.6 \pm 4.2	
	-20°C						98.8 \pm 1.6
Urine	RT	100	96.7 \pm 1.5	91.9 \pm 0.9	91.3 \pm 0.4	87.1 \pm 0.2	
	4 $^{\circ}\text{C}$	100	99.7 \pm 1.4	99.0 \pm 3.4	105.6 \pm 1.6	101.4 \pm 1.6	
	-20°C						89.7 \pm 2.8

(Mean \pm SD, n=3)

Table 5 Microbiological assay for azithromycin (a summary of assay condition)

Test organism	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341
Inoculum size	7×10^7 CFU/ml
Method	Paper disc method
Test medium	Antibiotic medium No. 11
Minimum detectable concentration	Serum: 0.006 μ g/ml, Urine: 0.04 μ g/ml Bile: 0.02 μ g/ml
Standard solution	Serum: Serum or serum - 0.1M phosphate buffer (1% Tween 80, pH 7.5) (1:3) Urine: 0.1M phosphate buffer (1% Tween 80, pH 7.5) Bile: Bile - 0.1M phosphate buffer (1% Tween 80, pH 7.5) (1:1)
Incubation	28°C, 18~20 h (37°C, 14~16 h)

分析操作に要する時間内では影響ないと考えられた。

文 献

- 1) 第41回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム: Azithromycin, 東京, 1994
- 2) Retsema J, Girard A, Schelkly W, Manousos M, Anderson M, Bright G, Borovoy R, Brennan L, Mason R: Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62, 993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against Gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1939~1947, 1987
- 3) Shepard R M, Fouda H G, Ferraina R A, Mullins M A: Disposition and metabolism of azithromycin in rats, dogs and humans. Abstracts, Proceedings of the 6th international congress of infectious disease, Montreal, July, 1990
- 4) Girard A E, Girard D, English A R, Goots T D, Cimochoowski C R, Faiella J A, Haskell S L, Retsema J A: Pharmacokinetic and *in vivo* studies with azithromycin (CP-62, 993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1948~1954, 1987
- 5) Riedel K D, Wildfeuer A, Laufen H and Zimmerman T: Equivalence of a high-performance liquid chromatographic assay and bioassay of azithromycin in human serum sample. *Journal of chromatography* 576: 358~362, 1992
- 6) Shepard R M, Duthu G S, Ferraina R A and Mullins M A: High-performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection for azithromycin in serum and tissues. *Journal of chromatography* 565: 321~327, 1991

Method of measuring azithromycin concentration in body fluid by bioassay and high-performance liquid chromatography

Yasufusa Sawada, Hideya Muto, Kazunori Enogaki and Kino Shimooka

New Product Development Center, Pfizer Pharmaceuticals Inc.

5-gochi, Taketoyo-cho, Chita-gun, Aichi 470-23, Japan

We established a microbiological assay method and modified shepard's high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitative determination of azithromycin (AZM).

In the bioassay method, the AZM concentration was determined by using *Micrococcus luteus* ATCC9341 as a test organism and antibiotic medium No. 11 as a test medium.

In the HPLC method, the concentrations of AZM and its metabolites in body fluids were determined by HPLC combined with an electrochemical detector. AZM and its metabolites were well separated from organic components, and good linear calibration curves were obtained.

The serum concentrations of AZM in healthy male volunteers after oral dose were determined by HPLC and bioassay. The results showed a high correlation (correlation coefficient: 0.998).