薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (9) 843-847 (1981)

生体試料中のセファレキシンの高速液体クロマトグラフィーによる定量法

高岸 靖,* 岩本健三, 長田光子, 加藤 博

塩野義製薬株式会社製造部

High Performance Liquid Chromatographic Assay of Cephalexin in Biological Fluid

YASUSHI TAKAGISHI,* KENZO IWAMOTO, MITSUKO NAGATA, and HIROSHI KATO

Production Division, Shionogi & Co., Ltd., Imafuku 192, Amagasaki, Hyogo

(Received February 21, 1981)

A rapid and accurate high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of cephalexin in the human serum and urine has been developed.

As internal standard, cephaloglycin and *o*-acetoanisidide are added to the serum and urine specimens, respectively. The serum specimens are deproteinized with trichloroacetic acid and the excess of trichloroacetic acid is removed by extraction with ether. After these pretreatments, cephalexin in the biological fluid is separated with Unisil 10 C 18 column and detected by UV-detector.

It is confirmed that the serum and urine concentrations of cephalexin determined by this method agree well with those by bioassay.

This method may be used more available for a clinical pharmacokinetic study and a bioavailability study of cephalexin.

Keywords—cephalexin; high performance liquid chromatographic assay; bioassay; serum level; urine level; human

緒　　言

セファロsporin系抗生物質であるセファレキシン（以下 CEX と略す）の血中および尿中濃度の測定法として、一般に Bioassay 法が用いられるが、操作が煩雑であり、精度も必ずしも十分とは言えない。

最近、この測定法として蛍光法^{1,2)} や高速液体クロマトグラフ法^{3,4)}（以下 HPLC 法と略す）が報告されているが、これらの測定条件では生体ブランクと CEX との分離が十分でない場合もあり、また生体ブランクが長時間にわたってクロマトグラム上に現われるため、試料を連続測定するとき長時間を要する等の難点があるように思われ、また Bioassay 法との相関性も検討されていない。

今回著者らは、試料の除たんばく法やクロマト条件を詳細に検討した結果、内部標準を用いる精度の高い HPLC 法による測定条件を見い出すことができ、また本法と Bioassay 法との相関性についても検討したのでその結果を報告する。

実　験　の　部

試料および試薬 CEX および内部標準として用いたセファログリシン（以下 CEG と略す）は Eli Lilly 社製を、他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

HPLC 法 HPLC の分析条件を Table I に、血清および尿試料の前処理法を Chart 1 に示した。

Bioassay 法 Table II に示した大型平板による Agar Well 法によった。

投与実験 健常な成人男子の志願者に CEX の 1 g または 0.5 g を投与し、所定の時間に採血または採尿を行なった。血液は採血後室温で約 1 時間放置した後遠心分離を行ない、血清分取後測定まで -20°C で凍結保存した。また尿は採尿後尿量を測定し、その一部を採取し、測定まで -20°C で凍結保存した。

TABLE I. HPLC Conditions

Instrument	Waters HPLC system: Model 6000A Pump, U6K Injector, 440A detector (254 nm)
Column ^{a)}	Unisil 10C18, 4.0 mm ID × 30 cm, Room Temp.
Mobile phase and flow rate	CH ₃ OH/3 mM KH ₂ PO ₄ in 0.5% CH ₃ COOH (25/75), 2.0 ml/min for Serum CH ₃ OH/20 mM H ₃ PO ₄ (20/80), 2.5 ml/min for urine
Injd. volume	10—50 μl

a) Packed by Gasukuro Kogyo Co., LTD.

Chart 1. Pretreatment Procedure of Serum and Urine for HPLC

TABLE II. Conditions of Bioassay by Agar-Well Method

	Serum	Urine
Organism	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Contents of medium		
Bacto beef extract	1.5 g	1.5 g
Bacto yeast extract	3.0	3.0
Bacto peptone	6.0	6.0
Bacto dextrose	1.0	—
Bacto agar	15.0	15.0
Water	1000 ml	1000 ml
Medium of standard solution	Human serum	pH 7.0 Phosphate buffer

結 果 と 考 察

試料の前処理と HPLC 条件

i) 血清 カラムについては市販の μ -Bondapak (Waters), LiChrosorb (Merk), Nucleosil (Nagel), Unisil (ガスクロ工業) 等を, 移動相については水とメタノールまたはアセトニトリルとの混合による逆相系について検討した. 一方, 血清ブランクのピークをできるだけ小さくするため, 血清の前処理に用いる除たんぱく剤として有機溶媒, タングステン酸, トリクロル酢酸, 塩酸等について検討した.

これらの結果の一部のクロマトグラムを Fig. 1 に示したが, メタノールを用いて除たんぱくを行なった場合, いずれのカラムを用いても CEX とブランクピークとは十分に分離し得なかった. 一方, トリクロル酢酸で除たんぱく後, 余剰のトリクロル酢酸をエーテルで抽出, 除去した場合, ブランクピークは短時間内にまとまり, Unisil のカラムを用いるとき CEX と完全に分離することができ, かつ測定時間も 8 分以内に行ない得た. また, CEX とブランクピークが十分に分離されているため, 低濃度試料の場合, HPLC への注入量は 50 μ l でも可能であった. また Unisil のカラムでは, 移動相の pH および塩濃度を変えることにより CEX の保持時間を

Fig. 1. Chromatograms of Aqueous Solution of CEX and Serum Blank of Two Volunteers

A: Unisil 10C18 column.
 B: μ -Bondapak C₁₈ column.
 I: CEX solution.
 II and III: Serum of volunteer I.K. and S.N. deproteinized by methanol, respectively.
 IV and V: Serum of volunteer I.K. and S.N. deproteinized by trichloroacetic acid, respectively.

Fig. 2. Chromatograms of Urine Sample with or without CEX and *o*-Acetoanisidide (I.S.)

試料について、くり返し判定した結果を Table III に示したが、いずれの場合も変動係数は小さく、測定精度はきわめて良好であった。なお検出限界は血清の場合、50 μ l の注入量で 0.05—0.1 μ g/ml, 尿の場合 10 μ l の注入量で 5 μ g/ml であった。

広範囲に変化させ得る特徴がみられ、ブランクピークとの分離に好都合であったが、 μ -Bondapak や Nucreosil, LiChrosorb 等のカラムではそのような傾向は小さかった。さらに、移動相の有機溶媒はアセトニトリルよりもメタノールを用いた場合の方が CEX のピークはよりシャープであった。

ii) 尿 尿の場合、検出感度を血清試料の場合と同一にすると多くのブランクピークが現われ、かつこれらと CEX とを完全に分離することはきわめて困難であった。一方、従来の測定例より、尿中 CEX の検出感度は 0.01 mg/ml 程度で十分であると考えられ、実験の部で述べた条件で良好な精度が得られた。このときのクロマトグラムの例を Fig. 2 に示したが、尿ブランクの影響はほとんど見られなかった。

HPLC 法の検量線と測定精度および検出限界

血清および尿への CEX の添加試料として、血清の場合 2—20 μ g/ml, 尿の場合 0.2—2 mg/ml の濃度範囲の試料を調製し、これらを実験の部で述べた HPLC 法により測定し、水溶液試料の場合と比較した。これらの結果を Fig. 3 に示すが、血清、尿の場合とも直線性はきわめて良好であり、水溶液ともほぼ完全に一致している。

次に血清および尿にそれぞれ二水準の濃度の CEX の添加

Fig. 3. Standard Curves for CEX in Serum and Urine

○: Water $Y=0.126X+0.001$.
●: Serum $Y=0.127X+0.030$.

○: Water $Y=0.912X+0.004$.
●: Urine $Y=0.918X+0.004$.

TABLE III. Precision of HPLC Method for Serum and Urine

Sample	Mean of conc. of CEX ($\mu\text{g/ml}$, $n=6$)	Coefficient of variation (%)
Serum	1.86	1.82
	18.6	1.29
Urine	191.2	0.53
	1920.3	0.30

Fig. 4. Correlation between CEX Concentrations Determined by HPLC and Bioassay for Serum Samples after Oral Administration of 1 g CEX to Volunteers

Slope=0.980, intercept= -0.074, $r=0.971$, $n=24$.

Fig. 5. Correlation between CEX Concentrations Determined by HPLC and Bioassay for Urine Samples after Oral Administration of 0.5 g CEX to Volunteers

Slope=1.002, intercept= -0.009, $r=0.997$, $n=48$.

HPLC 法と Bioassay 法との関係

健康な成人男子 4 名の志願者に CEX 1 g を投与し、投与後 1, 2, 3, 5, 7, 9 時間目の血清濃度を HPLC 法と Bioassay 法とで測定した。また別の 8 名の志願者に CEX 0.5 g を投与し、投与後 12 時間まで 2 時間毎の尿中排泄濃度を両方法で測定した。血清濃度および尿中濃度の両方法による測定値の相関関係を Fig. 4, 5 に示したが血清および尿の場合とも回帰係数はほぼ 1 を示し、両測定法間に良好な一致性が見られた。

結 論

HPLC 法による CEX の血清中および尿中濃度の定量法を検討した結果、CEX とブランクとの十分な分離、および内部標準の使用により、感度、精度とも優れた測定条件を見出すことができ、また本法と Bioassay 法との相関性はきわめて良好であった。

この方法は高い正確さを必要とする薬動学的研究や、バイオアベイラビリティ実験に適したものである。

引用文献および注

- 1) K. Miyazaki, O. Ogino, T. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2273 (1979).
- 2) A. Csiba, H. Graber, *Proc. 17th. Hung. Ann. Meet. Biochem.*, Kecskemet, 1977, p. 173
- 3) T. Nakagawa, J. Haginaka, K. Yamaoka, T. Uno, *J. Antibiot. (Tokyo)*, *Ser. A*, **31**, 769 (1978).
- 4) M.A. Carroll, E.R. White, Z. Jancsik, J.E. Zarembo, *J. Antibiot. (Tokyo)*, *Ser. A*, **30**, 397 (1977).