

高速液体クロマトグラフィーによる アミノ配糖体系抗生物質の測定法

Determination of Aminoglycosides by
High Performance Liquid Chromatography

中野 道晴

Michiharu Nakano

アミノ配糖体系抗生物質(aminoglycosides; AG)は、グラム陰性桿菌などによる感染症の治療薬として広く用いられている。しかし、この抗生物質は、僅かな過剰投与により腎機能や聴力に障害を引き起こすことが知られており、薬剤投与に際しては、適正な血中濃度を保つよう十分な注意が必要とされている¹⁾。このため血液をはじめとする生体試料中のAG濃度の測定法の開発が進められている。これまでに微生物学的手法や免疫学的手法など²⁾が報告されているが、近年、HPLCを用いる測定法が経済性や多種類のAGへの応用性の上で優れていることから注目されている。この方法では、AG自身に紫外部吸収がないために発色剤を用いて修飾反応を行ない、AGを検出する必要がある。既に数種の発色剤に関して報告されているが^{3)~7)}、AG修飾体の化学構造に言及した例は少ない。本報では、化学的に安定な修飾体を与える2,4-ジニトロフルオロベンゼン(FDNB)を発色剤として用い、修飾反応条件並びにジニトロフェニル(DNP)化された修飾体(AG-DNP)の構造について検討するとともに、6種のAGについてHPLCによる分離分析を行ない、良好な結果を得たので以下報告する。

標準品、試薬および装置

AG: カナマイシンA(Km)、ネオマイシンB(Nm)は、常用標準品(国立予防衛生研究所)を、ジベカシン(Db、明治製薬)、トブラマイシン(Tb、塩野義製薬)、アミカシン(Am、萬有製薬)、およびゲンタマイシンのC₁、C₂、C_{1a}混合製剤(Gm、エッセクス日本)は、それぞれ注射用製剤を適宜、水で希釈して用いた。用いたAGは、すべて硫酸塩である。

FDNB(半井化学)は、試薬特級をアセトニトリルに溶解して用いた。水は、脱イオン水をミリQ(ミリポア)に通したもの、他の溶媒、試薬は試薬特級をそのまま用いた。

装置: 日立655型ポンプに日立638-0410型UVモニターを接続し、日立D-2000型クロマトイントインテグレーターによってピーク面積を算出した。

HPLCの測定条件

カラム: TSK80TM ODS(東洋ソーダ)

4 i. d. × 250 mm

溶離液: 50~75%アセトニトリル-0.1%酢酸(アセトニトリル含量は、試料によって適宜増減して用了いた。)

流速: 1 ml/min

温度: 50 °C

検出波長: 365 nm

試料注入量: 10 μl

FDNBによるAGの修飾反応条件の検討

FDNBは、アミノ基や水酸基と反応するが、AG分子中には、数個のアミノ基と水酸基があり、修飾反応の条件により必ずしも単一の修飾体とはならない⁷⁾。そこでDb(Fig. 1)を例に取り、修飾反応条件の検討を行なった。

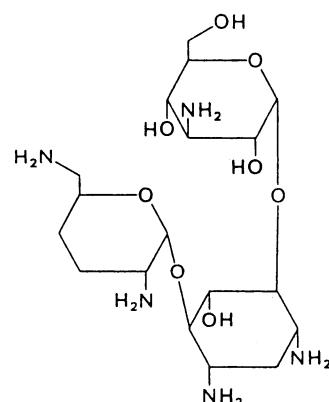


Fig. 1 Structure of dibekacin (Db)

修飾反応は、Db (100 mg/l) 50 μ l に pH 8.0 の 0.5M トリス (ハイドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH 8.0) 100 μ l, アセトニトリル 150 μ l, FDNB (170 g/l) 20 μ l を順次加え、80 °C で20分間加熱することによって行なった。以下、この条件を基本とし、その一部を適宜変更して反応条件の検討を行なった。

A pH

0.5M トリス (ハイドロキシメチル) アミノメタンに塩酸を加えることにより pH 7~11 の緩衝液を調製し、各緩衝液を用いて反応を行なった。Fig. 2-A に示したように、pH 8.0 以上では、修飾体 (N-DNP 体) に対応するピークの測定値は一定となった。また、pH 10, 11 では、さらに水酸基が修飾された (N, O-DNP 体) と考えられるピークが認められた。pH 11 で数時間反応を行なうと (N-DNP 体) の測定値の減少が観測されたが、20分間の反応時間では、測定値に有意な差は認められなかった。

B FDNB の添加量

アセトニトリルで希釈した FDNB 10~510 g/l を 20 μ l 加え反応を行なった。Fig. 2-B に示したように 80 g/l 以上では、測定値は一定となった。この添加量は、Db に対して 125 倍当量にあたる。

C 反応時間

反応液を 5~60 分加熱し、水水で冷却後、室温にもどし、試料液とした。Fig. 2-C に示したように 15 分以上では、測

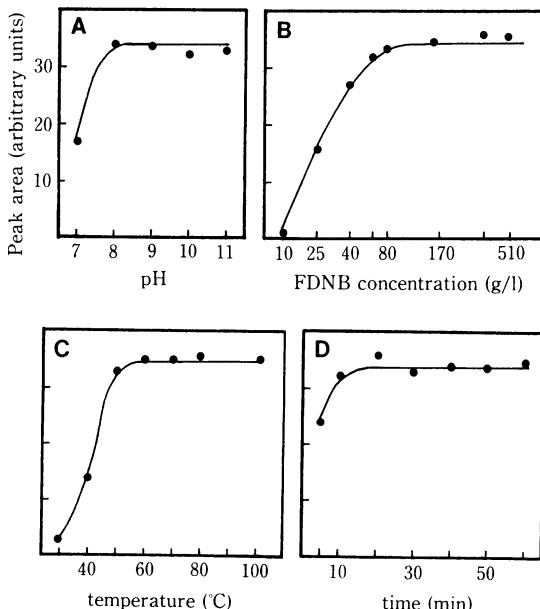


Fig. 2 Effects of pH (A), concentration of FDNB (B), reaction temperature (C), and reaction time (D) on derivatization of dibekacin with FDNB.

定値は一定となった。

D 反応温度

30~115 °C の間で温度を変え、反応を行なった。Fig. 2-D に示したように 60 °C 以上では、測定値は一定となった。

以上の結果から、反応の pH は、8.0, FDNB の添加量は、170 g/l を 20 μ l, 反応時間は、20 分間、温度は、80 °C とした。

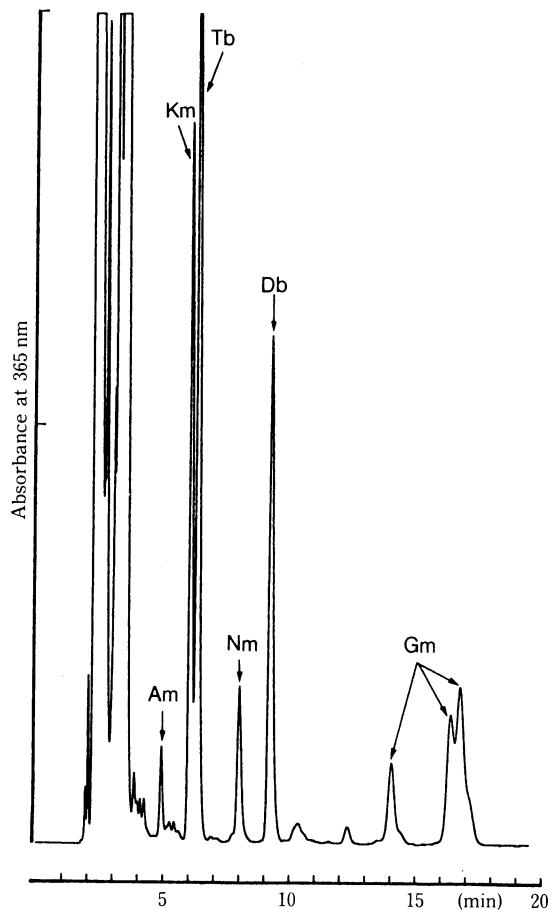


Fig. 3 Typical chromatogram of aminoglycosides derivatized with FDNB.

Am; amikacin, Km; kanamycin A, Tb; tobramycin, Nm; neomycin B, Db; dibekacin, Gm; gentamicin C₁, C₂, C_{1a}. Reaction conditions: initial concentration of AG; 2×10^{-5} M, initial concentration of FDNB; 1×10^{-2} M, reaction temperature; 80 °C, hydrogen-ion activity, pH 8.0, reation time; 20 min. Columns; TSK 80TM ODS 4 i. d. \times 250mm, solvent; 63% CH₃CN-0.1% acetic acid, flow rate; 1 ml/min, temperature; 50 °C.

この反応条件に従い、6種のAGの混合試料について修飾反応を行ない、HPLCに供したところFig.3に示したように各AGがよく分離したクロマトグラムを得た。特にGmについては、製剤中に含まれる3成分がそれぞれ分離したピークを与えた。

検出限界

各AGの測定値による検量線は、5~100mg/lの範囲で0点を通る直線となり、検出限界は、1mg/lであった。

修飾体の化学構造

Db 50 mgを2mlのトリス緩衝液に溶かし、アセトニトリル2ml、ついでFDNB 1gを含むアセトニトリル溶液3mlを加え、80°Cで30分間加熱した。反応液を放冷した後、アセトニトルを留去し、酢酸エチルで修飾体を抽出した。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで脱水し、減圧下乾固後、残渣をアセトニトリルに溶かしながら分取HPLCに供し、修飾体に該当するピークを分取した。分画液を乾固し、重アセトンに溶解し核磁気共鳴スペクトル(NMR)を測定した。その結果、ジニトロフェニル基(Fig.4)の3, 5, 6位のプロトンに由来するシグナルをそれぞれ、3位: δ(テトラメチルシランよりの化学シフト、ppm), 8.82, 8.85, 8.89, 9.02, 9.08(doublet, J=2.4 Hz), 5位: δ: 8.15, 8.24, 8.31, 8.35, 8.46(doublet-doublet, J=9.8 Hz, 2.4Hz), 6位: δ: 7.14, 7.17, 7.36, 7.63, 7.73(doublet, J=9.8 Hz)にそれぞれ5プロトン分ずつ認めたことから5個のアミノ基すべてが修飾された構造であることが推定された。

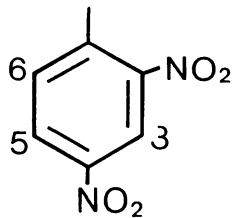


Fig. 4 Structure of dinitrophenyl (DNP) group.

以上、Dbを例により、FDNBを発色剤としてその反応条件を詳細に検討するとともに、修飾体(AG-DNP)について、NMRを解析することによりその化学構造を推定した。また、同条件下で6種のAG類のHPLCによる分離分析が可能となった。FDNBによる修飾体(AG-DNP)は、反応2週間後においてもHPLC上のピーク面積に変化はなく、化学的に安定であり、検出も汎用性の高いUV検出器を使用できる。これらのことから、この方法は、AG類の分析法

として有用なものであると考える。

今後は、生体試料中のAGの分析法について検討を進めたい。

最後にあたり、NMR測定に際して御協力いただいた北海道大学薬学部生薬学講座の西澤信博士に感謝いたします。

文 献

- 1) D. Reeves: Infection, 8, Supp. 3, S313 (1980)
- 2) S. Maitra *et al.*: Clin. Chem. 25, 1861 (1979)
- 3) B. Shadkh *et al.*: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, 29 (1985)
- 4) S. Baek *et al.*: Clin. Chem., 25, 1222 (1979)
- 5) N. Larsen *et al.*: J. Chromatogr., 221, 1982 (1980)
- 6) K. Tsuji *et al.*: *ibid.*, 175, 141 (1979)
- 7) D. Barends *et al.*: *ibid.*, 323, 321 (1985)