

[原著] 松本歯学 6 : 169~172, 1980

螢光法による体液中セファレキシンの定量法の検討

倉橋 寿, 都築新太郎, 前橋 浩

松本歯科大学 歯科薬理学教室 (主任 前橋 浩 教授)

北村 豊, 坂本 茂, 有賀 功, 鹿毛俊孝, 千野武広

松本歯科大学 口腔外科学第1講座 (主任 千野武広 教授)

Fluorometric Determination of Cephalexin in Body Fluids

HISASHI KURAHASHI, SHINTARO TSUZUKI and HIROSHI MAEHASHI

Department of Pharmacology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. H. Maehashi)

YUTAKA KITAMURA, SHIGERU SAKAMOTO, ISAO ARIGA TOSHITAKA KAGE
and TAKEHIRO CHINO

Department of Oral Surgery I, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. T. Chino)

Summary

A fluorometric method has been developed for the determination of cephalexin in plasma and urine. A fluorescent product was formed when samples containing cephalexin were heated for an hour at 100°C and pH 1.0. The fluorescence was determined in sodium hydroxide solution (pH 13.0) at excitation and emission wavelengths of 355 and 432 nm, respectively. Only 0.1 ml of plasma or urine was required, and concentrations of cephalexin as small as 0.1 mcg/ml might be determined. In plasma samples from male rabbits taken over a 6-hr-period after an oral administration of 100 mg/kg of cephalexin, and urinary samples from human male volunteers taken over a 6-hr-period after an oral administration of 500 mg of cephalexin, were investigated using this new method.

結 言

従来、抗生物質の体内における動態の測定法としては、抗菌活性を利用した細菌学的測定法が多く用いられてきたが、最近では機器分析化学の進歩により、生体中の微量の薬物濃度が精度良く迅速に定量されるようになりつつある。今回われわれは、蛍光法による Cephalexin の測定条件について種々の検討を加えた後、経口投与における Cephalexin のウサギ血中濃度とヒト尿中濃度の経時変化について測定を行なったところ、比較的簡単で迅速、かつ、従来の測定法に劣らない感度で、その濃度を測定しうる事が判明したので、測定方法および概要を報告する。

材料および方法

(1) 血漿中の Cephalexin の定量

本研究には体重約 4 kg の雄ウサギ 2 羽を使用し、前日の夕方 17 時より絶食させ、翌日の午前 10 時に Cephalexin 100 mg/kg を経口投与した。採血は耳静脈より行ない、投与 3 時間後までは 30 分毎に、以後 6 時間までは 1 時間毎に約 1 ml ずつを採血した。

定量は血漿 0.1 ml に蒸留水 1.4 ml と 10% トリクロル酢酸 1 ml を加えてよく振とうした後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清 1 ml を別の試験管に採り、0.2 M KCl-HCl buffer (pH 1.0) 1 ml を加

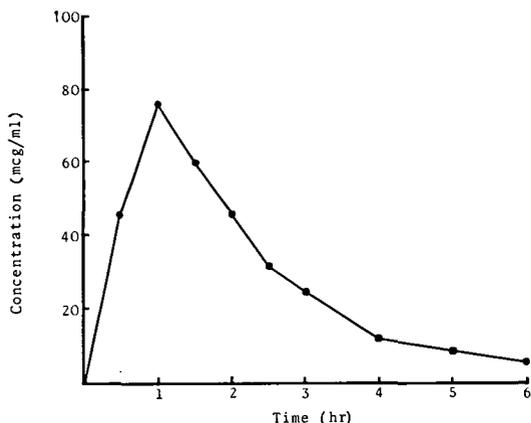


Fig. 1 Concentrations of cephalexin in plasma from two male rabbits after oral administration (100 mg/kg).

Data are means of two experiments.

えて 100°C の温浴中で 60 分間加温する。次に室温まで冷却し、1 ml の 1 N NaOH を加えた後、日立蛍光分光光度計 650-10S を用い、excitation 355 nm, emission 432 nm で fluorescence を測定した。standard としては Cephalexin の 100 mcg/ml 0.1 ml を、blank としては蒸留水 0.1 ml を、血漿に代えて加えた。

(2) 尿中の Cephalexin の定量

尿は健康な成人男子 3 名に Cephalexin 500 mg (力価) を経口投与した後、3 時間までは 30 分毎に、以後 6 時間までは 1 時間毎に採尿し、その量も記録した。

定量は、尿 0.1 ml に蒸留水 1.9 ml を加えてよく振とう後、その 0.5 ml を別の試験管に採り 0.2 M KCl-HCl buffer (pH 1.0) 1 ml を加えて 100°C の温浴中で 60 分間加温する。その後室温まで冷却し、1 ml の 1 N NaOH を加えた後、excitation 355 nm, emission 432 nm で fluorescence を測定した。standard としては Cephalexin の 1 mg/ml 0.1 ml を、blank としては蒸留水の 0.1 ml を尿に代えて加えた。

結 果

Cephalexin 100 mg/kg を経口投与した雄ウサギの血中 Cephalexin 濃度を 2 羽の平均値として Fig. 1 に示した。投与後 30 分ですでに高い血中濃度が見られ、1 時間で peak に達した後、4 時間

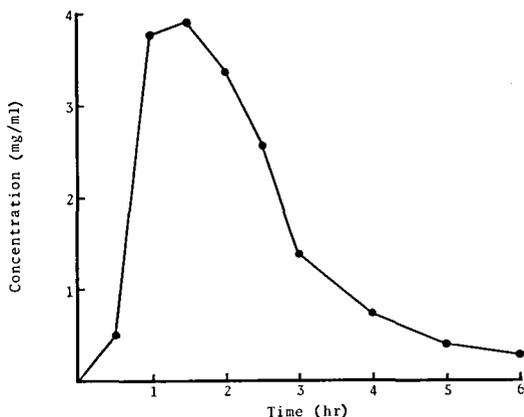


Fig. 2 Urinary excretory concentration of cephalexin following oral administration (500 mg) to three healthy male volunteers.

Data are means of three experiments.

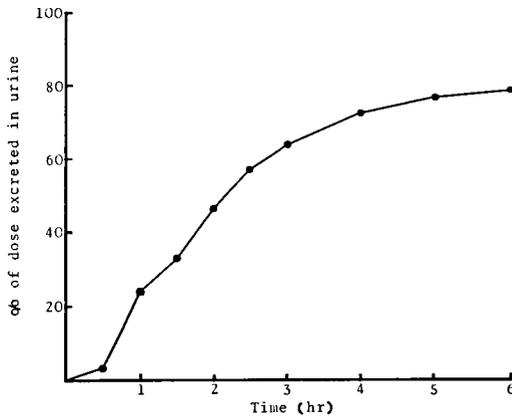


Fig. 3 Accumulative urinary excretion of cephalixin following oral administration (500 mg) to three healthy male volunteers.

Data are means of three experiments.

までは急激に、以後は徐々に減少した。

Cephalexin 500 mg(力価)を経口投与した成人男子の尿中 Cephalexin 濃度を3人の平均値として Fig.2 に示した。投与後1時間から1時間半に高い尿中濃度の peak が見られ、3時間までは急激に、以後は徐々に減少が見られた。

Cephalexin の尿中排泄量は、Cephalexin の尿中濃度に単位時間あたりの尿量を乗じて求め、その値を積算した結果、Fig. 3 に示したように投与量の78.9±5.0%が投与後6時間までに排泄された。

考 察

蛍光法による Cephalosporin 系抗生物質の定量法についてはすでに Barbhaiya ら¹⁾、Heald ら²⁾、Miyazaki ら³⁾などの報告が見られる。Barbhaiya らによれば、Sample 液に 1 N NaOH を加えて溶解し、1 N HCl を加えて中和後、2.5% (v/v) の formaldehyde を含む pH 5 の 0.2 M Sørensen sodium citrate buffer を加えて 100°C で30分間加熱後、蛍光分光光度計の excitation 345 nm, emission 425 nm で測定している。この方法は蛍光物質生成促進のため formaldehyde を加えており、pH 5 で30分間という短い加熱反応時間に特色がある。われわれはこの方法を用い、Cephalexin の定量を行ない追試したところ、1 mcg/

ml の感度は良好であったが、蒸留水を対照とする blank で妨害物質の生成が見られ、formaldehyde を加えない時も同様であったので、pH 5 という点に問題があるものと思われた。

また、血漿の Cephadrine を定量した Heald らの報告では、sample 液に 0.2 M の KCl-HCl buffer (pH 1.0) を加えて 100°C で3時間加熱後、蒸留水を加えて一定量とし、4 N の NaOH 液を加えてアルカリ性とし、蛍光分光光度計の excitation 350 nm, emission 445 nm で測定している。この方法では加熱時間が長いため、われわれはそれを60分間に短縮した方法で、Cephalexin を定量し比較したところ Heald らの方法による結果と大差なく、むしろ加熱による水分の蒸発が少なく、1 mcg/ml の感度も良好で、blank での妨害物質の生成が非常に少ないという利点があった。

更に Miyazaki らの報告では、sample 液に H₂O₂ を含んだ 0.1 M の citric acid-HCl-NaOH (pH 2.0) を加えて 100°C で70分間加熱後、冷却し、0.5 M のリン酸 2 ナトリウム液を加え、次いで acetone-chloroform 混液を加えて混和後、有機層を取り、0.1 M borate buffer (pH 11.0) を加えて混和後、水層を取り、蛍光分光光度計の excitation 340 nm, emission 420 nm で測定している。この方法は、蛍光物質生成促進のため H₂O₂ を加え、pH 2.0 で加熱後、抽出溶剤を用いることが特色である。われわれは念のためこの方法でも検索を試みたところ、他の方法に較べて感度がかかなり低下し、また妨害物質を除去する目的で行なった溶剤抽出は、血漿において良好な結果を得たが、尿では Cephalexin と同層に移動する妨害物質が認められた。

以上の方法を検討した結果、今回われわれは Cephalexin を含む sample は pH 1.0 で 100°C、60分間の加熱を行ない、蛍光物質生成促進剤の添加および溶剤抽出を行なわない方法が、本剤の定量に適しているものと推察した。なお本剤の測定に関しては検量線は一応作成するが、多少の測定条件の変化に対応させるため blank (蒸留水) と standard (Cephalexin の標準液) を測定に必ず加えて、これを基準に Cephalexin 量を計算した。また体液中には少量の妨害物質が含まれるので、Cephalexin 投与前の sample を必ず採取し、その測定値を投与後の測定値から差し引くこととし

た。

このように本研究で試みた測定法は、従来の Cephalexin 測定法の測定条件に多少変化を加えただけであるが、これにより抽出剤を使用することなく、体液に buffer 等を加えるだけの簡単な方法となり、また sample を迅速かつ大量に処理することができ、体液中の Cephalexin が 0.1 mcg/ml でも定量可能であり、Cephalexin の定量法としては有用な測定法ではないかと思われる。

近年、生体中の薬物の迅速な定量に高速液体クロマトグラフが多用されるようになり、体液中の Cephalexin についても、高速液体クロマトグラフおよび紫外外部吸収検出器を用いて短時間内に感度よく定量している報告^{4) 5)}もある。

本研究も、臨床上重要な薬物投与量と効果との関係を追求めるための一つの検索法として試みたわけであるが、更に本測定法に検討を加えながら、前記のような新しい方法をも取り入れ検討を重ねてゆきたい。

ま と め

蛍光法による Cephalexin の測定条件について、従来の方法に種々の検討を加えた。

Cephalexin を含む溶液を pH 1.0 で 1 時間加熱した後、1N NaOH を加えて pH 13.0 とし、蛍光分光光度計の excitation 355 nm, emission 432

nm で fluorescence を測定し、0.1 mcg/ml の感度で良好な結果を得た。

本方法により経口投与における Cephalexin のウサギ血中濃度とヒト尿中濃度の経時的変化について測定を行なったところ、従来の測定法に劣らない感度で簡単かつ迅速に定量しうることが判明した。

文 献

- 1) Barbhaiya, R. H. and Turner, P. (1977) Fluorimetric assay of cephradine, cephalexin and cephaloglycin. *Br. J. clin. Pharmac.* 4: 427—431.
- 2) Heald, A. F., Ita, C. E. and Schreiber, E. C. (1976) Fluorometric determination of cephradine in plasma. *J. Pharm. Sci.* 65: 768—769.
- 3) Miyazaki, K., Ogino, O. and Arita, T. (1979) Fluorometric determination of cephalexin, cephradine and cephatrizine in biological fluids. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 2273—2280.
- 4) Carroll, M. A., White, E. R., Jancsik, Z. and Zarembo, E. (1977) The determination of cephradine and cephalexin by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Antibiotics.* 30: 397—403.
- 5) Yamana, T. and Tsuji, A. (1976) Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: Kinetics and mechanisms of degradation. *J. Pharm. Sci.*, 65: 1563—1574.