



## QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF CEPHRADINE IN BIOLOGICAL MATERIALS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-24<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 鈴木, 真一<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1346">http://hdl.handle.net/10271/1346</a>                                |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

|       |   |         |             |
|-------|---|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博論第 69号  | 学位授与年月日 | 平成 元年 3月17日 |
| 氏 名   | 鈴木 真 一  |         |             |
| 論文題目  | QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF CEPHRADINE<br>IN BIOLOGICAL MATERIALS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID<br>CHROMATOGRAPHY<br>(高速液体クロマトグラフィーによる各種生体試料中のセフラジンの<br>定性及び定量分析について) |         |             |

# QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF CEPHRADINE IN BIOLOGICAL MATERIALS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

(高速液体クロマトグラフィーによる各種生体試料中のセフラジンの定性及び定量  
分析について)

## 論文の内容の要旨

生体試料中の薬物・毒物の分析では、一般に種々の有機溶媒による液-液抽出法が広く行われている。しかし、薬物の中には有機溶媒に難移行性のものがあり、このような薬物の分析は極めて難しい。汎用される抗生物質の一種であるセフラジン(7-[D-2-amino-2-(1,4-cycloheptadiene-1-yl)acetamido]-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid)はこのような水溶性で有機溶媒に難溶性の薬物である。この薬物の分析はこれまで、比色法、蛍光法が用いられていたが、選択性が低く、近年になって高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた尿、血漿中同薬物分析の報告がなされているが抽出法、精製法及び機器分析による同定法に関する報告はない。今回、逆相系のカラムを用いたHPLCによる胃内容物中のセフラジンの分析法についての検討を行い、さらにSep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジを用いた生体試料の精製法、質量分析による確認法についての検討も行った。

HPLCによるセフラジンの検出限界は0.01 µg(0.02 AFS)であり、検量線は0.01 µg-0.6 µgの間で直線性を示し、回帰直線式は $Y=1.6632X-0.0056$  ( $r=0.9998$ )であった。セフラジンは塩基性条件下で分解することが既に報告されていることから、試料の保存条件、溶媒についての検討を行った。セフラジンのメタノール溶液を調製し、室温で保存した場合には、試料溶液調製後24時間で約40%のセフラジンが消失した。しかし、水溶液として5℃で保存した場合は安定で溶液調製後2週間を経ても分解は認められなかった。直接胃内容物をHPLCにより分析した場合、妨害となるピークが多く分析が不可能であったためSep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジを用いた精製法についての検討を行った。各種緩衝液を用いてpH 2-9に調製したセフラジン水溶液を用いて、試料溶液pHのセフラジンの保持に対する影響を検討した。このpH範囲でセフラジンはほぼ完全にカートリッジ内に保持され、メタノールにより溶離されたが、安定性の点から生体試料はpH 5に調製した後、精製、分析操作を行うこととした。また、セフラジンの溶離は、水-メタノール(7:3, v/v)を用いることにより、回収率は約95%と良好であった。胃内容物の模擬試料を作成して、セフラジンを添加し、Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジを用いた試料の精製法による妨害成分の除去及びセフラジンの回収率についての検討を行った。精製物のHPLCの結果得られたクロマトグラムにはセフラジンの分析上妨害となるピークは認められず、回収率も約97%であった。また、尿及び血清中のセフラジン濃度は比較的高いことから、上述の方法によりHPLCの試料を作成した。これらの処理による回収率は95~97%であった。実際の胃内容試料について、クロロホルムによる有機溶媒可溶成分の除去、凍結乾燥による濃縮、除タンパク、Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジによる前処理の後、HPLC、薄層クロマトグラフィーによる分析を行い、さらに質量分析法により含有されるセフラジンの確認を行った。セフラジンは難揮発性物質であることから、通常行われている試料導入方法による質量分析は不可能であった。今回、操作が比較的簡単な、インビーム試料導入法による電子衝撃イオン化及びイソブタンを反応ガスとする化学イオン化質量スペクトルの測定を行ったところ、電子衝撃イオン化質量スペクトルにおいても分子イオンピークが $m/z$  349に観察され、主なフラグメントイオンとして $m/z$  304 [ $M-CO_2, H$ ]<sup>+</sup>、44 [ $CO_2$ ]<sup>+</sup> が認められた。また化学イオン化質量スペクトルでは、 $m/z$  350に擬分子イオンピークが観察され、ベースイオンピークは $m/z$  306 [ $MH-CO_2$ ]<sup>+</sup>であった。また、HPLCによる定量分析の結果、胃内容試料中のセフラジン濃度は47.0 µg/gであった。

難揮発性で有機溶媒に難移行性の水溶性薬物のひとつであるセフラジンの、胃内容物を試料とする定性、

定量分析では Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジによる試料前処理が有効であり、HPLCによる定性・定量分析が可能であった。さらに、確認試験には、インビーム試料導入質量分析法により構造上の知見が得られ、確実な同定が可能であることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

従来、生体試料中の水溶性薬物の分析法については定量性、同定法に選択性が低いなどの問題があった。申請者は胃内容物中の難揮発性水溶性薬物セフラジンを逆相系樹脂による抽出・精製法、高速液体クロマトグラフによる定性・定量及び質量分析による同定法を用いた分析法を検討した。その結果、セフラジンなどの抗生物質の分析は水溶液で低温保存すれば安定であり、抽出・精製法としては逆相系樹脂である Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジを用いた固-液抽出法が効果的であり、高速液体クロマトグラフィーは水溶性薬物分析に有効であること、同定法として難揮発性薬物にはインビーム質量分析が必要不可欠であることを明らかにした。そして、本論文は高い特異性と高感度・精度を有する分析法であり、広く生体試料中の難揮発性水溶性薬物に適用できることが評価された。

研究発表は質問を交えつつ行われ、発表後も質問が続行された。それらのうち主なものは以下のとおりである。

1. 本分析法の独創性
2. セフラジンをを用いた理由
3. セフラジンと他のセファロsporin系抗生物質の差異
4. 水溶性薬物の抽出・精製法
5. セフラジンの pH、特に塩基性条件下における安定性
6. 回収率算出の際の胃内容物模擬試料と実試料処理法の相異の妥当性

以上の質問に対する申請者の応答はおおむね適切であり、本審査委員会では全員一致でこの研究が医学博士の学位授与にふさわしいものと判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 井 喜一郎

副査 教授 浅 野 稔 副査 教授 五十嵐 良 雄

副査 教授 中 島 光 好 副査 講師 松 島 肇