

Cinoxacin ヒト尿中代謝物の定量法

坂野 俊行・増田佐智子・天野 為之
塩野義製薬株式会社研究所

Cinoxacin 投与ヒト尿中の代謝物である 1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxo-6-methoxy-7-hydroxycinnoline-3-carboxylic acid (MCINX) の定量法を設定した。

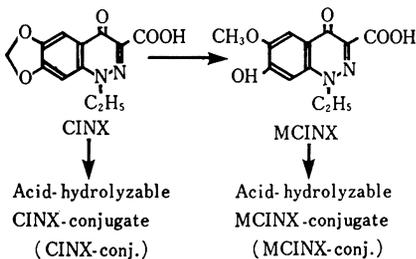
すなわち、尿試料を塩酸性でクロロホルム抽出後、pH 9.0 のほう酸緩衝液に転溶したのち、Nucleosil₁₀ C-8 と 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) メタノール (7:3, v/v) の系による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。

Cinoxacin と MCINX の各抱合体は尿試料を塩酸性下加熱加水分解することによって生成する各遊離体を、それぞれけい光法および本 HPLC 法によって測定することができる。

緒 言

ヒトに経口投与された Cinoxacin (1-ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo [1,3] dioxolo-[4,5-g] cinnoline-3-carboxylic acid 以下 CINX と略す) は、その大部分が未変化のまま尿中に排泄されるが、一部は 1-ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-6-methoxy-7-hydroxycinnoline-3-carboxylic acid (以下 MCINX と略す) および CINX と MCINX のそれぞれ酸で加水分解される抱合体 (以下それぞれ CINX-conj. および MCINX-conj. と略す) に代謝されることが知られている (Fig. 1)¹⁾。

Fig. 1 Metabolic pattern of CINX in normal male volunteers



本報告は、ヒト尿中のこれら代謝物の定量法について述べる。

実験材料と実験方法

1. 使用薬剤と試料

CINX と MCINX は米国 Eli Lilly 社で合成された。

CINX-conj. と MCINX-conj. は標品が未だ単離されていないので、CINX 400 mg を空腹時健康成人男子

に経口投与したときの 1 時間尿を、これら抱合体の含有試料として用いた。

試薬および溶媒はすべて市販特級品を使用した。

2. 測定機器

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分離管は、Nucleosil₁₀ C-8 を充填した内径 4.0 mm, 長さ 25 cm のステンレスカラムを用い、室温で操作した。移動相の送液には Waters M-6000A ポンプを用い、検出器は Waters Model 440, 波長 254 nm を使用した。

けい光測定は日立 MPF-2A を使用し、10×10 mm の石英セルを用いた。

3. MCINX の定量法

尿試料 1 ml に N 塩酸 0.5 ml およびクロロホルム 6 ml を加えて 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心する。クロロホルム抽出液 5 ml に 0.015 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0) 5 ml を加えて 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心する。上層 10 μl を HPLC カラムに注入し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.8)・メタノール (7:3, v/v) 混合溶媒で逆相クロマトグラフィーを行なう。流速 1 ml/min., 保持時間約 2.2 分における MCINX のピーク高さを測定し、標準 MCINX 溶液* の検量線から定量値を算出する。

* MCINX 濃度 0.4 μg/ml ~ 4 μg/ml の 0.015 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0) 溶液 10 μl 使用。

4. CINX-conjugate の定量法

水で希釈した尿試料 1 ml に N 塩酸 0.5 ml を加えて沸騰水浴中で 30 分間加熱する。冷後、クロロホルム 6 ml を加えて 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠

心する。クロロホルム抽出液 5 ml に 0.015 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0) 5 ml を加えて 5 分間振とう後、3,000 rpm で 5 分間遠心する。上層 4 ml をとり N 硫酸 1 ml を加えて混和したのち、354 nm の励起光を用いて 432 nm のけい光極大波長におけるけい光強度を測定する。標準 CINX 溶液* による検量線から定量値を算出したのち、別に ANDERSSON らのけい光法²⁾ によって求めた未変化 CINX の値を差し引いて CINX-conj. 濃度を求める。

* CINX 濃度 12.5 ng/ml ~ 1.25 µg/ml の 0.015 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0) 溶液 4 ml に N 硫酸 1 ml を加える。

5. MCINX-conjugate の定量法

尿試料 1 ml に N 塩酸 0.5 ml を加えて沸騰水浴中で 30 分間加熱する。冷後クロロホルム 6 ml を加えて、以下 MCINX の定量法と同様に処理して得た全 MCINX の定量値から、3. で得た MCINX の値を差し引いて MCINX-conj. 濃度を求める。

結 果

1. HPLC 条件の検討

MCINX と CINX および尿中成分の分離を目的として Nucleosil₁₀ SB, Partisil₁₀ SAX, Zipax SAX, Permaphase AAX および µ-Bondapak NH₂ のイオン交換体、ならびに µ-Bondapak C-18, Nucleosil₁₀ C-8 および Nucleosil₁₀ C-18 の逆相系について、pH 2~10 の緩衝液、メタノールと緩衝液の混液および PIC 試薬 (tetrabutyl ammonium hydroxide, 1-heptane-sulfonic acid) を用いて検討した結果、Nucleosil₁₀ C-8 の分離カラムを用いて 0.05 M Na₂HPO₄·KH₂PO₄ 緩衝液 (pH 7.8)・メタノール (7:3, v/v) 混合溶媒で流出する方法が最もよい分離能を示した。流速 1 ml/min. における保持時間は MCINX 約 2.2 分、CINX 約 3.6 分であった。MCINX の定量法に従い、前処理後の尿中 MCINX および CINX のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

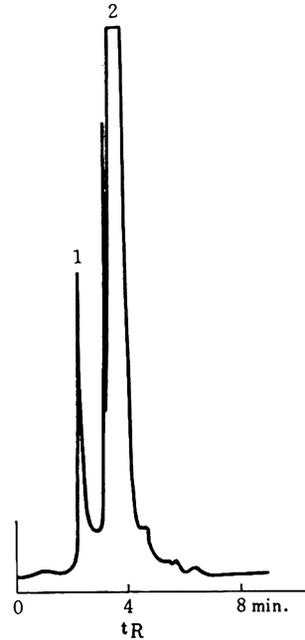
本定量条件下、MCINX の保持時間 2.2 分付近におけるヒト尿ブランクの個体差はほとんどなく、MCINX のピーク高さ読み取りに対する尿成分の影響は無視し得るものであった。

なお、尿試料をミリポアフィルターで濾過後 HPLC に直接注入する方式についても検討したが、この場合は尿中成分による障害が著しく MCINX の検出は困難であった。

2. MCINX の検量線

MCINX の 0.015 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0) 溶液

Fig. 2 Chromatogram of human urine extract



1: Added MCINX 8 µg/ml in urine

2: Added CINX 200 µg/ml in urine

について定量条件で検量線を求めた結果、1~2,500 ng/10 µl の範囲内で MCINX 濃度とピーク高さ間に直線性が成立した。回帰式の変動係数は 1~3% である。検出限界は 0.5 ng/10 µl であり、尿中 MCINX に対する定量下限は 0.5 µg/ml であった。

Table 1 Recoveries of MCINX in human urine

| Sample No. | Added MCINX and CINX in urine (µg/ml) | | Found MCINX (µg/ml) (y) | Recovery (%) |
|------------|---------------------------------------|--------|-------------------------|--------------|
| | MCINX(x) | CINX | | |
| 1 | 2.20 | 50.37 | 2.00 | 90.9 |
| 2 | 2.20 | 50.37 | 1.61 | 73.2 |
| 3 | 4.39 | 100.75 | 4.10 | 93.4 |
| 4 | 4.39 | 100.75 | 4.13 | 94.1 |
| 5 | 8.79 | 201.49 | 8.17 | 92.9 |
| 6 | 8.79 | 201.49 | 8.81 | 100.2 |
| 7 | 13.18 | 302.24 | 12.24 | 92.9 |
| 8 | 13.18 | 302.24 | 12.79 | 97.0 |
| 9 | 17.57 | 402.98 | 17.27 | 98.3 |
| 10 | 17.57 | 402.98 | 17.50 | 99.6 |
| 11 | 21.97 | 503.73 | 21.12 | 96.1 |

Regression equation: $y = 0.9881x - 0.285$, $s = 0.313$

3. ヒト尿中 MCINX の回収率

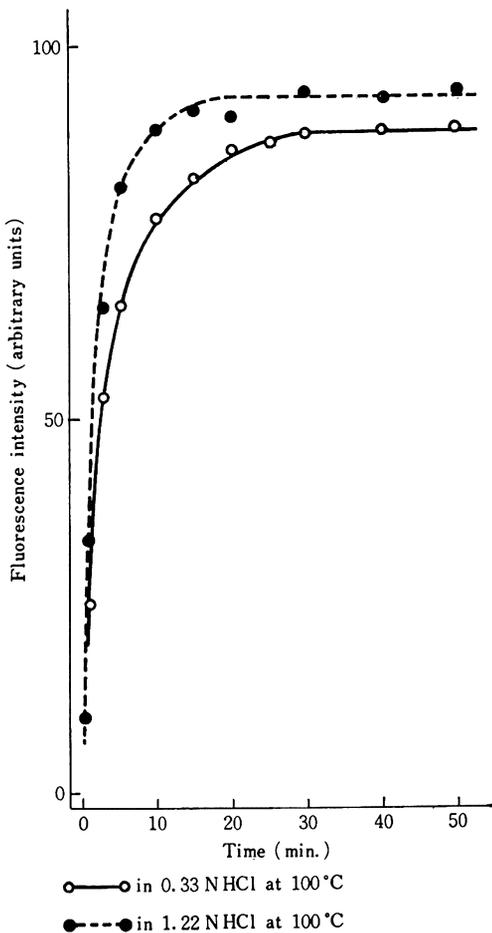
健康成人男子尿に 1 ml 当り MCINX 2~22 μg と CINX 50 ~ 500 μg を添加した尿合成試料溶液を調製し、本法による MCINX の回収率を検討して Table 1 を得た。

すなわち、尿合成試料中 MCINX の回収率は約 94% であり、変動係数は約 8% であった。

4. 抱合体の加水分解条件

CINX 400 mg を経口投与した健康成人男子の 1 時間尿を水で 100 倍希釈したのち、その 5 ml に N 塩酸 2.5 ml とクロロホルム 30 ml を加えて振とう抽出する。尿試料中の未変化 CINX をクロロホルム層に抽出除去した残りの水層 1.5 ml (0.33 N 塩酸溶液に相当する)、および水層 1 ml に 3 N 塩酸 0.5 ml を加えた溶液 (1.22 N 塩酸溶液に相当する) をそれぞれ沸騰水浴中で一定時間加熱加水分解し、冷却後クロロホルム 6 ml

Fig. 3 Hydrolysis conditions of CINX-conjugate



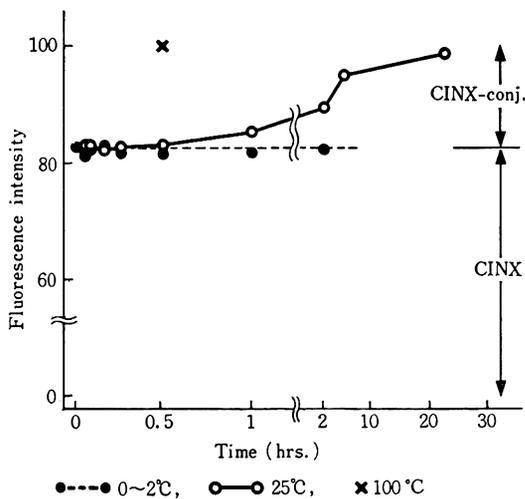
ずつを加えて抱合体から遊離した CINX を抽出する。抽出した CINX を次に 0.015 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0) 5 ml に転溶後、N 硫酸 1 ml を加えて励起波長 354 nm けい光波長 432 nm におけるけい光強度を測定し Fig. 3 を得た。

すなわち、CINX 投与ヒト尿中の CINX-conj. は 0.33 N 塩酸中では 100 °C 30 分で、また 1.22 N 塩酸中では 100 °C 15 分で加水分解が終了することを示した。

5. 抱合体の安定性

0.33 N 塩酸中、25 °C および 0 ~ 2 °C における CINX-conj. の安定性を検討した。すなわち、CINX を投与した健康人の 1 時間尿試料 1 ml を水で 50 倍希釈したのち、その 1 ml に N 塩酸 0.5 ml を加えて 0.33 N 塩酸溶液とし、25 °C および 0 ~ 2 °C に放置したときの CINX-conj. の加水分解による CINX の増量を経時的に追跡した結果、Fig. 4 に示すように CINX-conj. は 0.33 N 塩酸中、0 ~ 2 °C では少なくとも 2 時間は安定であり、25 °C においても 30 分間は安定であるとみなし得た。

Fig. 4 Stability of CINX conjugate in 0.33 N HCl



6. 測定例

健康成人男子に CINX 200 ~ 800 mg を空腹時 1 回経口投与したときの 6 時間尿あるいは 12 時間尿に本法を適用して、尿中排泄率を求めた測定例を Table 2 に示す。

投与 CINX の大部分は未変化体として尿中に排泄され、ついで CINX-conj. が多く、MCINX と MCINX-conj. はともに少量であった。

Table 2 Urinary excretion of CINX, CINX-conjugate, MCINX and MCINX-conjugate, after oral administration of CINX

| Volunteer No. | Dose (mg) | Urinary recovery(%) | | | | |
|---------------|-----------|---------------------|------------|-------|-------------|-------|
| | | CINX | CINX-conj. | MCINX | MCINX-conj. | Total |
| 1 | 200 | 73.36 | 15.51 | 0.98 | 0.75 | 90.59 |
| 2 | 200 | 77.66 | 12.43 | 1.81 | 0.79 | 92.68 |
| 3 | 400 | 58.20 | 29.50 | 1.54 | 1.30 | 90.54 |
| 4 | 400 | 85.98 | 11.10 | 1.74 | 0.64 | 99.46 |
| 5 | 400 | 50.57 | 35.03 | 2.17 | 1.46 | 89.23 |
| 6 | 400 | 68.46 | 14.23 | 0.56 | 0.42 | 83.67 |
| 7 | 800 | 64.94 | 22.86 | 1.16 | 1.24 | 90.19 |
| 8 | 800 | 73.37 | 17.68 | 0.83 | 0.57 | 92.46 |
| 9 | 800 | 80.01 | 15.93 | 1.13 | 0.61 | 97.67 |

まとめと考察

逆相 HPLC によるヒト尿中の MCINX の定量法を設定した。本法においては、尿中成分の障害を除去するために、溶媒抽出による若干の前処理を必要とするが、比較的簡易かつ迅速な定量法として実試料の測定に有効に利用し得るものであった。CINX と MCINX の各抱合体は加水分解後生成する各遊離体を、それぞれけい光法および逆相 HPLC によって測定できる。健常成人男子

に CINX 経口投与時の尿中排泄率の測定に本法を適用した。

文 献

- 1) WOLEN, R. L.; B. D. OBERMEYER, E. A. ZIEGE & H. R. BLACK: Metabolic fate of cinoxacin in man. *Clin. Pharmacol. & Ther.* 19(1): 119, 1976
- 2) ANDERSSON, K.-E.; S. COLLEN & P.-A. M^oRDH: Studies on cinoxacin. 2. Assay of cinoxacin in body fluids and tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* 3: 417~422, 1977

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CINOXACIN METABOLITES IN HUMAN URINE

TOSHIYUKI SAKANO, SACHIKO MASUDA and TAMEYUKI AMANO

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

A quantitative method for the estimation of the 1-ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-6-methoxy-7-hydroxycinnoline-3-carboxylic acid (MCINX) in human urine has been developed by using high-performance liquid chromatography (HPLC). MCINX can be separated by HPLC and quantitated with a 4 mm × 25 cm Nucleosil₁₀ C-8 column in methanol/0.05 M phosphate buffer (pH 7.8) 3:7, coupled to a uv flow detector set at 254 nm wavelength. Detection limit was 0.5 ng for the MCINX. The conjugates of MCINX and cinoxacin were determined by this HPLC method and by the fluorometric method respectively, after hydrolyzed with hydrochloric acid.