

NY-198の体内動態II

—HPLC法とBioassay法によるイヌにおける吸収、排泄—

桶崎 英一・牧野 栄一・大道 光一・

永田 治・山田 健久・高橋 和余

北陸製薬株式会社 中央研究所

寺崎 哲也・辻 彰

金沢大学 薬学部 製剤学教室

NY-198をイヌに20mg/kg経口投与した際の血清中濃度および尿中排泄についてHPLC法およびBioassay法により測定した。

NY-198の平均血清中濃度は投与後1hで最高濃度8.95 μ g/mlに達し、以後半減期7.1hで消失した。経口投与した際のNY-198の尿中への排泄は速やかであり、尿中濃度は6~12h尿で343 μ g/mlと最も高く、24~48h尿においても50 μ g/ml以上の高濃度であった。尿中排泄率は投与後24hで投与量の40.3%、72hで51.8%であった。

NY-198の血清および尿中濃度についてHPLC法及びbioassay法により測定した結果、両測定方法における定量値はほぼ同一であり、良好な相関性を示した。このことから、NY-198経口投与後の血清および尿中に抗菌活性を有する活性代謝物はほとんど存在していないものと推察された。

NY-198 [(±)-1-ethyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7- (3-methyl-1-piperazinyl) -4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride] は北陸製薬株式会社で新規に開発された合成抗菌剤であり、優れた *in vitro* 抗菌力とともに経口投与後の吸収も極めて良好であることが知られている¹⁾。

今回、著者らは体液中の未変化体の定量を行なう目的で、高速液体クロマトグラフ (以下HPLCと略す) を用いた定量法について検討した。また、本定量法を用いてイヌにNY-198を経口投与後の血清、尿中NY-198濃度を測定し、Bioassayによる測定結果と比較した。

I 実験方法

1. 定量法

1) HPLC法

操作のフローチャートをFig. 1に示した。イヌ血清、尿 (適宜希釈して使用) に内標準溶液 (内標準物質としてKK-123を含有) および0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、中性条件下、5%イソアミルアルコール含有クロロホルムで抽出した。有機層を分取後減圧留去し、残渣をHPLC用移動相溶液に溶解し、HPLCに注入した。尚、血清試料については溶解液を0.2 μ mのフィルターでろ過し、ろ液をHPLCに注入した。

HPLCの測定条件は以下の通りである。装置として日本分光BIP-I型を用い、カラムはNucleosil 10C₁₈ (4mm $\times$ 30cm, ナーゲル) を使用した。移動相としてアセトニトリル-0.05Mクエン酸溶液-1M酢酸アンモニウム溶液 (22:77:1, v/v) を用い、流速1.5ml/minで溶出させた。また、検出器として日本分光FP-210型蛍光検出器を用い、励起波長280nm、蛍光波長455nmで測定を行なった。

2) Bioassay法

検定菌には *Escherichia coli* NIHJ JC-2 を用い、カップ法で測定した。検定菌をHeart infusion agar (日本水), 37 $^{\circ}$ C一夜斜面培養後、滅菌生理食塩水で浮遊させて接種菌液とした。この菌液をMueller-Hinton agar (Difco) に0.5%の割合に混釈し、その4mlをあらかじめ滅菌同培地20mlを基層として分注、凝固させておいた内径90mmのプラスチックシャーレに分注し、水平凝固させた。この寒天平板上のカップ内に血清、希釈尿試料および標準液を満たし、37 $^{\circ}$ C一夜培養後、得られた阻止円径から標準曲線法により濃度を算出した。標準液は血清の場合にはイヌ血清、尿の場合には1/15Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて調製した。また、尿試料の希釈には同緩衝液を用いた。

(Clean-up)

Serum 0.2ml

Urine(diluted) 0.1ml

← 0.2M phosphate buffer (pH 7.0)

0.7 ml (serum), 0.8 ml (urine)

← internal standard solution* 0.1ml

(serum : 12 μ g/ml, urine : 20 μ g/ml)extracted with 5ml of CHCl₃ containing 5% isoamyl alcohol

Organic layer

Aqueous layer

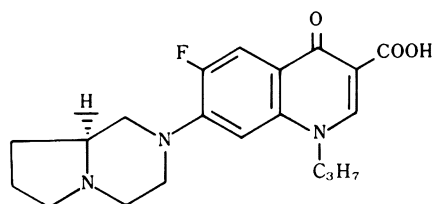
evaporated to dryness

Residue

← mobile phase 0.5ml

filtrated with membrane filter (FG type 0.2 μ m) serum onlyHPLC 20 μ l injected

* internal standard (KK-123)



(HPLC operating conditions)

Apparatus : BIP-I Liquid Chromatograph (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)

Column : Nucleosil 10C₁₈ (Nagel, 4mm ϕ ×30cm)Mobile phase : CH₃CN - 0.05M citric acid soln. 1M ammonium acetate soln. (22 : 77 : 1, v/v)

Flow rate : 1.5ml/min

Detection : FP-210 Spectrofluorometer (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)

Ex 280nm, Em 455nm

Fig. 1. Determination procedure of NY-198 by HPLC method

2. イヌ投与試験

体重 9～13kg (生後 2～3 年) の雄性ビーグル犬 (三協ラボ) を 24h 絶食後使用した。尚, 実験環境下 (室温 22～27°C, 湿度 35～75%) で約 2 週間予備飼育し, 健康状態の良好なものを選び実験に供した。食餌は薬物投与後 4 h に摂取させた。予備飼育期間および非絶食実験期間中は固型飼料 (CD-5, 日本クレア) 約 250g を 1 日 1 回摂取させた。水はすべての期間において自由に摂取させた。イヌに NY-198 水溶液 (10mg/ml) を 20mg/kg 経口投与後, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24h に前肢静脈より血液を採取した。血液は約 1 h 室温に放置後遠心分離し, 血清を得た。尿は 0～6, 6～12, 12～24, 24～48, 48～72h の間隔で自然排泄された尿を採取した。尚, 血清, 尿は定量時まで, -20°C で保存した。

II 実験成績

1. HPLC 法の検討

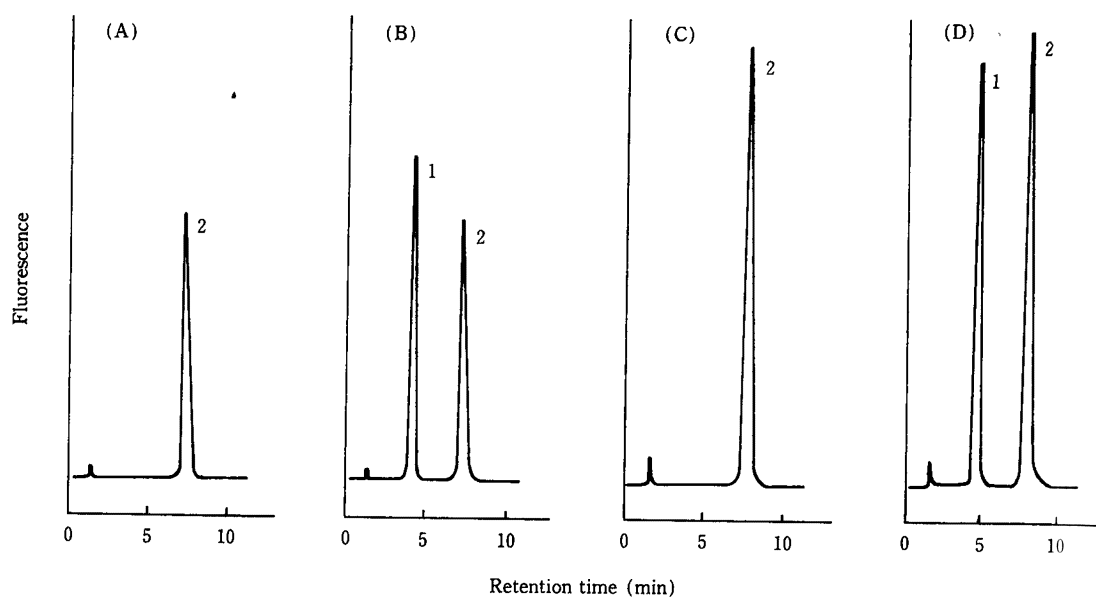
既知量添加試料およびコントロールの HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

本法による NY-198 および内標準物質 (I.S.) の保持時間はそれぞれ約 5 分および約 8 分であり, 生体常成分の妨害はほとんど認められなかった。

検量線は血清 (1～20 μ g/ml), 尿 (1～50 μ g/ml) ともに良好な直線性を示した (Fig. 3)。さらに添加回収実験では平均 99～102%, 標準偏差 0.6～2.2% と良好な結果が得られ, 本法は定量精度の点でも問題がないことが示された (Table 1)。

2. イヌ投与試験

1) 血清中濃度



- (A) Dog serum containing internal standard (I. S., $6\mu\text{g/ml}$)
 (B) Dog serum containing NY-198 ($10\mu\text{g/ml}$) and I. S. ($6\mu\text{g/ml}$)
 (C) Dog urine containing I. S. ($20\mu\text{g/ml}$)
 (D) Dog urine containing NY-198 ($25\mu\text{g/ml}$) and I. S. ($20\mu\text{g/ml}$)
 Peaks: 1=NY-198, 2=I. S.

Fig. 2. HPLC chromatograms of NY-198 from determination procedure

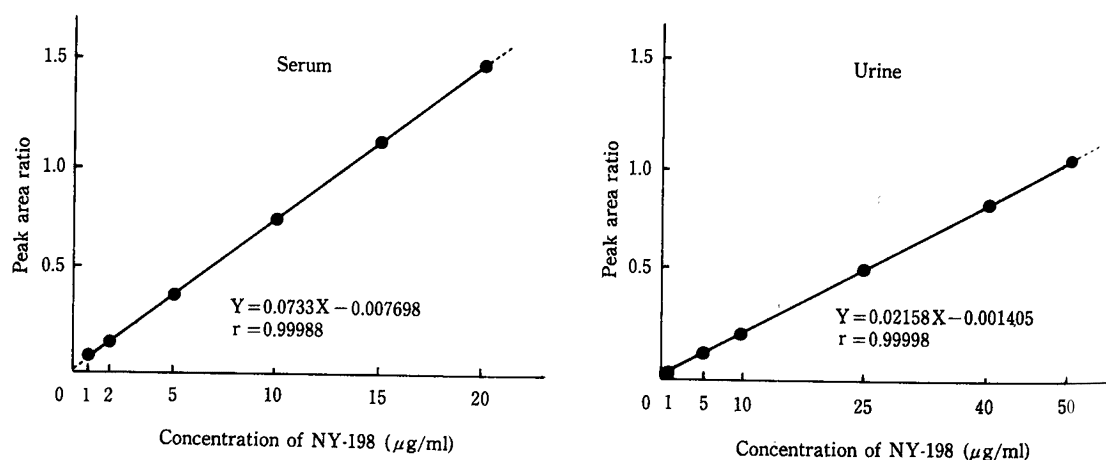


Fig. 3. Calibration curves for NY-198 by HPLC method

HPLC法による5例の平均血清中濃度を Fig. 4 に示した。NY-198経口投与後、1 h で最高濃度 $8.95\mu\text{g/ml}$ に達し、以後半減期 7.1h で消失した。投与後 8 h の濃度は $4.53\mu\text{g/ml}$ であった。

2) 尿中排泄

HPLC による 5 例の平均尿中濃度および排泄率を

Table 2 に示した。尿中濃度は 6~12h 尿で最も高く、 $343\mu\text{g/ml}$ であり、24~48h でも $50\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度が認められた。また、尿中排泄率は 24h で投与量の 40.3%、72h で 51.8%であった。

3. HPLC 法と bioassay 法による測定値の相関性

イヌ血清中 NY-198 濃度に関する相関性を Fig. 5 に

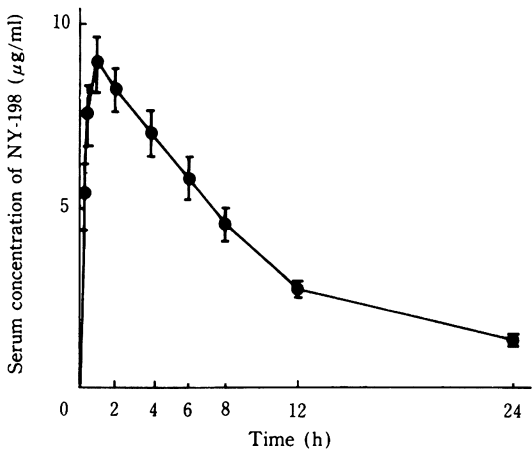
Table 1. Precision of the determination procedure for NY-198 by HPLC method

Sample	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Number of runs	Recovery (%)	S. D. (%)	C. V. (%)
Serum	2	5	102.1	1.3	1.3
	10	5	100.1	1.6	1.6
	15	5	100.4	2.2	2.2
Urine	5	5	99.2	0.6	0.6
	25	5	99.4	0.9	0.9
	40	5	100.3	0.9	0.9

Table 2. Urinary concentration and cumulative urinary excretion of NY-198 after oral administration of NY-198 to dogs at a dose of 20mg/kg

Time (h)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Time (h)	Cumulative excretion (% of dose)
0 - 6	201.3 ± 58.8	0 - 6	8.7 ± 3.5
6 - 12	343.0 ± 61.1	0 - 12	24.7 ± 3.5
12 - 24	274.5 ± 56.2	0 - 24	40.3 ± 2.3
24 - 48	56.6 ± 7.1	0 - 48	49.4 ± 2.0
48 - 72	17.7 ± 3.2	0 - 72	51.8 ± 1.7

Each value represents the mean $\pm$ S. E. of five dogs.



Each point represents the mean $\pm$ S. E. of five dogs.

Fig. 4. Serum concentration of NY-198 after oral administration of NY-198 to dogs at a dose of 20mg/kg

示した。HPLC 値と bioassay 値には良好な相関性が認められ、 $[\text{HPLC 値}] = 0.951 [\text{Bioassay 値}] - 0.23$ ($r = 0.989$) であり、1 : 1 の相関性が認められた。イヌ尿中 NY-198 濃度に関する相関性を Fig. 6 に示した。

$[\text{HPLC 値}] = 1.021 [\text{Bioassay 値}] - 1.17$ ($r = 0.981$) であり、血清と同様 HPLC 値と bioassay 値との間に 1 : 1 の相関性が認められた。

さらに相関性を統計的に評価する目的でこれらの相関直線の傾き (理論値 = 1) および切片 (理論値 = 0) について t 検定を行なった。その結果、血清および尿の相関直線がともに原点を通り、しかも傾きが 1 であることが統計的に証明された (危険率 1%)。

III 考 察

最近、合成抗菌剤の体液中濃度の定量方法として高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) を用いる方法がいくつか報告されている²⁻⁷⁾。その抽出方法は各薬剤によって様々であるが、HPLC に用いるカラムは逆相系の化学結合型 (ODS 系) が主流であり、検出器には UV もしくは蛍光検出器が使用されている。

著者らは、抽出溶媒としてクロロホルム、ヘキサン、酢酸エチル等種々の溶媒で検討した結果、抽出率およびクロマトグラム上の妨害の有無を考慮し、クロロホルムが最適であると判断した。しかしながら、クロロホルムは血清試料抽出時にエマルジョン形成がしばしば観察されたため、イソアミルアルコールをクロロホルムに 5% 添加するという改良を加えた。これにより、エマルジョ

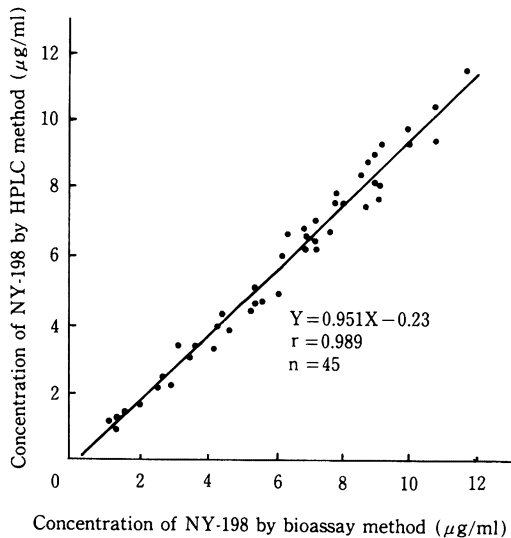


Fig. 5. Correlation between serum concentrations measured by HPLC method and by bioassay method

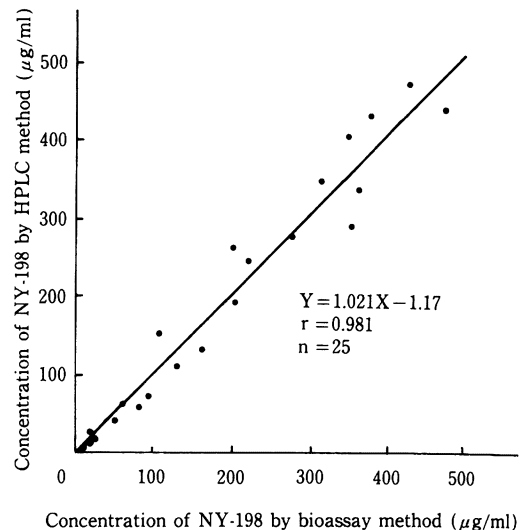


Fig. 6. Correlation between urinary concentrations measured by HPLC method and by bioassay method

ンを回避できたのに加え抽出率も約90%になり、クロロホルム単独（抽出率約80%）と比較し約10%程度上昇した。検出器としては蛍光検出器を使用したが生体の濃度であれば UV280nmでも充分検出可能である。しかし、UV 検出器では生体成分等によるクロマト上の妨害などの危険性があることや、低濃度（約0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下）の検出が困難であることなどを考えると、蛍光検出器の方が有利であると推察された。

また、本報には示さなかったが、ヒトのコントロール血清、尿において今回と同様な方法で検討したところ、ビーグル犬での結果とほぼ同様な結果が得られ、本報は Phase I 時のヒト血清、尿中の NY-198 未変化体の定量法として利用できるものと思われる。

著者らは、 ^{14}C -標識 NY-198 を用いた実験でイヌの血清および尿中濃度の約90%が未変化体であり、代謝物は極めて少ないことを確認している⁹⁾。今回の実験結果で bioassay 値が HPLC 値とほぼ等しかったことから、血清および尿中に抗菌活性を有する活性代謝物がほとんど存在していないものと考えられる。このことは、前述した ^{14}C -標識化合物での実験結果と良く一致しており、NY-198 は体内で極めて代謝を受けにくく、大部分が未変化体として存在していることが確認された。

（試験実施期間 昭和59年12月～昭和60年5月）

文 献

- 1) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態IV— ^{14}C -NY-198によるラット, イヌにおける吸収, 分布, 排泄—。Chemotherapy 36 (S-2): 151~173, 1988
- 2) MONTAY, G.; Y. BLAIN, F. ROQUET & A. LEHIR: High-performance liquid chromatography of pefloxacin and its main active metabolites in biological fluids. J. Chromatogr. 272: 359~365, 1983
- 3) NAKAMURA, R.; T. YAMAGUCHI, Y. SEKINE & M. HASHIMOTO: Determination of a new antibacterial agent (AT-2266) and its metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 278: 321~328, 1983
- 4) PAULIUKONIS, L.T.; D.G. MUSSON & W.F. BAYNE: Quantitation of norfloxacin, a new antibacterial agent in human plasma and urine by ion-pair reverse-phase chromatography. J. Pharm. Sci. 73: 99~102, 1984
- 5) 津村光義, 佐藤敬喜, 采 孟, 立澤晴男: DL-8280の体内動態, 第一報 Bioassay 法と HPLC 法によるイヌとサルにおける吸収, 排泄の比較。Chemotherapy 32 (S-1): 1179~1184, 1984
- 6) MONTAY, G. & J.P. TASSEL: Improved high-performance liquid chromatographic determination of pefloxacin and its metabolite norfloxacin in human plasma and tissue. J. Chromatogr. 339

- : 214~218, 1985
- 7) JEHL, F. ; C.GALLION & J.DEBS : High-performance liquid chromatographic method for determination of ciprofloxacin in biological fluids. J. Chromatogr. 339 : 347~357, 1985
- 8) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 長谷川洋通, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰 : NY-198の体内動態V-¹⁴C-NY-198によるラット, イヌにおける代謝。Chemotherapy 36 (S-2) : 174~187, 1988

DISPOSITION AND METABOLISM OF NY-198 II. HPLC AND BIOASSAY STUDIES OF ABSORPTION AND EXCRETION IN THE DOG

EIICHI OKEZAKI, EIICHI MAKINO, KOHICHI OHMICH, OSAMU NAGATA,
TAKEHISA YAMADA and KAZUYO TAKAHASHI

Central Research Laboratory, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

TESTUYA TERASAKI and AKIRA TSUJI

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa

We investigated serum levels and urinary excretion of NY-198 using HPLC and bioassay methods after oral administration to dogs at a dose of 20mg/kg.

Average serum levels of NY-198 reached a peak concentration of 8.95 μ g/ml at 1 h after oral dosing, and then declined with a half-life of 7.1 h.

NY-198 was excreted rapidly in urine after oral dosing, and the peak concentration was obtained in 6-12 h urine. A high urinary concentration of more than 50 μ g/ml was maintained up to 48h. Urinary excretion was 40.3 % at 24 h and 51.8% at 72 h.

Concentrations of NY-198 in serum and urine were measured by both HPLC and bioassay, and good correlation between the two assays was obtained. These results suggest that active metabolites possessing antimicrobial activity are not present in serum or urine after oral administration of NY-198.