

## Cefozopran の高速液体クロマトグラフィーによる定量法

山下 健治・本橋 道生・前田 憲一・竹田 益雄

矢敷 孝司

株式会社 武田分析研究所\*

生体試料中 cefozopran (CZOP) 及び類縁物質の imidazo [1,2-*b*] pyridazine (IP) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による同時定量法を確立した。ヒト血清及び尿をリン酸塩緩衝液で希釈した後、カラムスイッチングにより前処理を自動化した HPLC に直接注入し、UV 検出 (254 nm) で CZOP を、蛍光検出 (Ex 300 nm, Em 410 nm) で IP をそれぞれ定量した。定量限界は、血清中 CZOP は 0.05 µg/ml, IP は 0.01 µg/ml, 尿中 CZOP は 0.5 µg/ml, IP は 0.1 µg/ml であった。本法は CZOP の臨床試験に適用された。

**Key words:** cefozopran, IP, HPLC 定量法

Cefozopran (CZOP; Fig. 1) は、武田薬品工業株式会社において開発されたグラム陽性菌から緑膿菌を含むグラム陰性菌にまで強い抗菌活性を有する新規セフェム系抗生物質である<sup>1-3)</sup>。CZOP の臨床試験に対応するために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による生体試料中 CZOP の定量法の確立が求められた。CZOP は、極性が高いため、生体試料の前処理法としてよく用いられる溶媒による抽出はできなかった。また除タンパク法では、生体成分由来の妨害ピークとの分離が困難であった。そこで種々検討の結果、カラムスイッチングにより前処理を自動化した HPLC<sup>4-14)</sup> を用いて、生体試料中 CZOP 及び類縁物質の imidazo [1,2-*b*] pyridazine (IP) の同時定量法を確立したので報告する。

## 材料と方法

## 1. 試薬及び試液

CZOP (HCl) (Lot No. M 433-S 02) 及び IP (Lot

No. A 6855-094-18) は、武田薬品工業株式会社より入手した。アセトニトリル及びメタノールは液体クロマトグラフ用 (和光純薬製)、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

## 2. 測定機器

主として下記の HPLC 装置を用いた。SCL-6 A コントローラー、LC-6 A ポンプ、FCV-2 AH 高圧流路切り替えバルブ (六方バルブ)、SIL-6 A オートサンプラー [冷却器 WIG-111 A (イシド社製) により試料室を 4°C にコントロールした]、SPD-6 A UV 検出器 (いずれも島津製作所製)、F-1050 (日立製作所製) あるいは RF-550 蛍光検出器 (島津製作所製)、C-R 3 A あるいは C-R 4 AX データ処理装置 (いずれも島津製作所製) 及び U-228 記録計 (日本電子科学社製)。

## 3. HPLC 条件

後述のように、六方バルブの操作により前処理用及び分析用カラムに流れる移動相をコントロールし、前処理及び分析を行った。前処理及び分析用 HPLC 条件を以下に示す。

(前処理用 HPLC 条件)

カラム 1 (C1) : Guard Pak µ Bondapak C18 (Waters 社製)

温度 : 25°C

移動相 1 (MP 1) : 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7)

2 (MP 2) : アセトニトリル/水 (6 : 4, V/V)

流量 : 1.0 ml/min

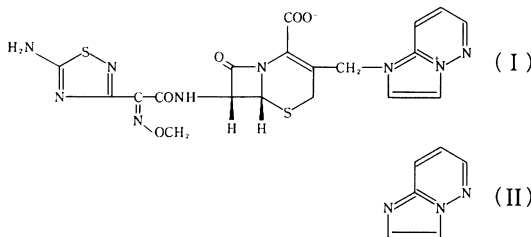


Fig. 1. Structures of (I) CZOP and (II) IP.

## (分析用 HPLC 条件)

カラム 2 (C2) : YMC-ODS (5  $\mu\text{m}$ , 150 mm $\times$ 4.6 mm I.D.; 山村化学製)  
 温度 : 40°C  
 移動相 3 (MP3) : 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7)/メタノール (88:12, V/V)  
 流量 : 1.0 ml/min  
 検出 : UV 254 nm (CZOP 分析用)  
 : FL (Ex 300 nm, Em 410 nm) (IP 分析用)

## 4. カラムスイッチングのタイミング

HPLC 装置の概略図を Fig. 2 に、カラムスイッチングのタイミングを Fig. 3 に示す。分析開始時には、バルブは 1 の位置にあり、C1 には MP1, C2 には MP3 が流れている。注入された試料中の IP, CZOP は C1 に保持され、タンパク質及び極性の高い生体成分由来の物質は、C1 に保持されず溶出廃棄される。4 分後、バルブは 2 の位置に変わり、IP 及び CZOP は MP3 により C1 から C2 に溶出され、C2 による分析が開始される。3 分後、バルブは 1 の位置にもどり、C1 と C2 は切り離されるが、引き続き C2 で分析される。その

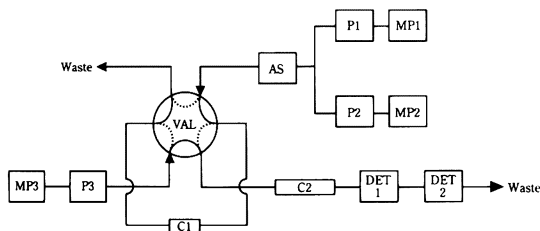


Fig. 2. Schematic diagram of the HPLC system. P1-3: pumps 1-3, MP1-3: mobile phases 1-3, AS: autosampler, VAL: six-port valve, C1, 2: columns 1 and 2, DET1: UV detector, DET2: fluorescence detector. The solid and dotted lines in the six-port valve indicate valve positions 1 and 2, respectively.

Operation time (min)	0	4	7	12	30
Valve position	1	2	1		
Mobile phase for C1	MP1	MP3	MP2	MP1	
Mobile phase for C2	MP3				

Fig. 3. Timing of column switching.

MP1-3: mobile phases 1-3, C1, 2: columns 1 and 2

間、C1 は MP2 で 5 分間洗浄された後、MP1 で平衡化される。

## 5. HPLC 用試料の調製法

血清については、0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 3) で 10~20 倍希釈し、その 100  $\mu\text{l}$  を直接 HPLC に注入した。尿については、0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 3) で 20~4000 倍希釈し、その 20~100  $\mu\text{l}$  を直接 HPLC に注入した。

## 6. 添加検量線

既知量の CZOP 及び IP をブランク血清及び尿に添加し、上記の方法に従って測定し、得られたクロマトグラムにおけるそれぞれのピーク高さを添加濃度に対しプロットし検量線を作成した。

## 結果及び考察

## 1. HPLC 条件

CZOP は極性が高く、生体試料の前処理法としてよく用いられる有機溶媒による抽出はできなかった。また、メタノールあるいはアセトニトリルによる除タンパク法では、生体成分由来の妨害ピークとの分離が困難であった。そこでカラムスイッチングを用いた直接注入法<sup>(4)</sup>に着目し、種々検討を行った結果、上記の条件のとき、緩衝液による希釈のみで血清及び尿試料の直接注入が可能であることが判った。Fig. 4 及び 5 に示すように CZOP については UV 検出 (254 nm) で、血清、尿とも妨害物質の影響のない良好なクロマトグ

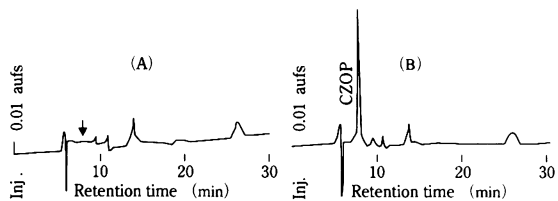


Fig. 4. HPLC chromatograms of (A) drug-free serum and (B) serum spiked with CZOP (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

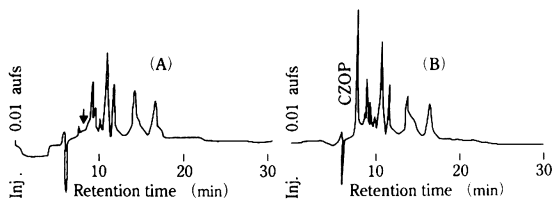


Fig. 5. HPLC chromatograms of (A) drug-free urine and (B) urine spiked with CZOP (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

ラムを得る事ができた。しかし IP については UV 吸収が弱い為、UV 検出では感度及び妨害ピークとの分離とも不十分であった。IP は自然蛍光を有していることに着目し、CZOP と同一 HPLC 条件下、UV 検出器と直列に蛍光検出器を接続して、蛍光による IP の検出を試みた (Fig. 2)。その結果、Fig. 6 及び 7 に示すように IP についても、血清、尿とも妨害物質の影響のない良好なクロマトグラムを得る事ができ、CZOP との同時定量が可能となった。

## 2. 添加検量線及び添加回収率

既知量の CZOP 及び IP を添加した血清及び尿試料について求めた添加検量線はすべてほぼ原点を通る良

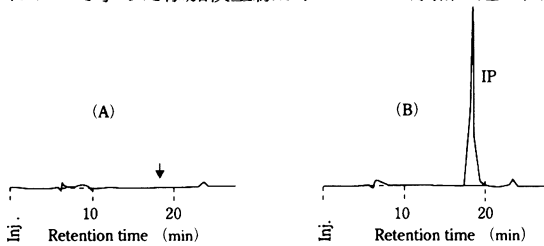


Fig. 6. HPLC chromatograms of (A) drug-free serum and (B) serum spiked with IP (0.15 µg/ml).

好な直線性を示した (Table 1)。また同様にして処理した水溶液試料との比較より求めた平均回収率及びそのバラツキは Table 2 に示すように良好であった。

定量限界は、希釈倍率により多少変動するが、特に断らない限り血清中 CZOP は 0.05 µg/ml, IP は 0.01 µg/ml, 尿中 CZOP は 0.5 µg/ml, IP は 0.1 µg/ml であった。

## 3. 血清及び尿試料中での安定性

既知量の CZOP 及び IP を添加した血清及び尿試料について -20°C での保存安定性を調べた。Table 3 に示すように、CZOP, IP とも 1~2 カ月は安定であった。

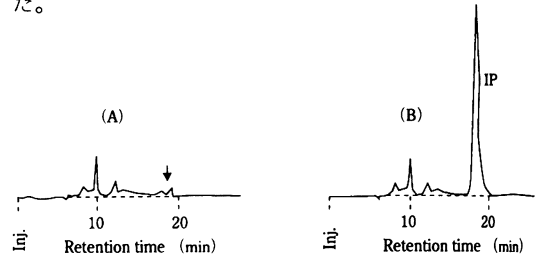


Fig. 7. HPLC chromatograms of (A) drug-free urine and (B) urine spiked with IP (1.5 µg/ml).

Table 1. Linearity of calibration curves of CZOP and IP in serum and urine

Sample	Compound	Concentration (µg/ml)	r
Serum	Cefozopran	0.25-100	0.999
	imidazo[1,2- <i>b</i> ]pyridazine	0.05-3	0.999
Urine	Cefozopran	2.5-1000	0.999
	imidazo[1,2- <i>b</i> ]pyridazine	0.5-30	0.999

r: Correlation coefficient

Table 2. Recoveries of CZOP and IP from spiked serum and urine

Sample	Compound	Concentration (µg/ml)	Recovery (%)	C.V. (%)	n
Serum	Cefozopran	2.5	100.5	0.6	5
	imidazo[1,2- <i>b</i> ]pyridazine	0.75	92.3	0.7	5
Urine	Cefozopran	25	99.5	0.6	5
	imidazo[1,2- <i>b</i> ]pyridazine	7.5	98.6	0.3	5

n: Number of experiments

Table 3. Stability of CZOP and IP in serum and urine at -20°C

Sample	Compound	Concentration (µg/ml)	Duration (month)	Residual content (%)
Serum	Cefozopran	5	1	100.4
			2	96.4
	imidazo[1,2- <i>b</i> ]pyridazine	1	106.6	
Urine	Cefozopran	50	1	96.2
			2	102.8
	imidazo[1,2- <i>b</i> ]pyridazine	1	100.0	

## 4. HPLC 法と Bioassay 法の相関性

CZOP の臨床試験で得られた血清及び尿について HPLC 法で求めた CZOP 濃度は、Bioassay 法での定量値と良好な相関性が認められた<sup>15)</sup>。

## 文 献

- 1) Miyake A, Yoshimura Y, Yamaoka M, Nishimura T, Hashimoto N, Imada A: Studies on condensed-heterocyclic azolium cephalosporins IV. *J Antibiot* 45: 709~720, 1992
- 2) Iwahi T, Okonogi K, Yamazaki T, Shiki S, Kondo M, Miyake A, Imada A: *In vitro* and *in vivo* activities of SCE-2787, a new parenteral cephalosporin with a broad antibacterial spectrum. *Antimicrob Agent Chemother* 36: 1358~1366, 1992
- 3) Nakao M, Noji Y, Iwahi T, Yamazaki T: Antibacterial properties of SCE-2787, a new cephem antibiotic. *J Antimicrob Chemother* 29: 509~518, 1992
- 4) Roth W, Beschke K, Jauch R, Zimmer A, Koss FW: Fully automated high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 222: 13 ~ 22, 1981
- 5) Roth W: Rapid, sensitive and fully automated high-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for sulmazole and metabolites. *J Chromatogr* 278: 347~357, 1983
- 6) Dow J, Lemar M, Frydman A, Gaillet J: Automated high-performance liquid chromatographic determination of spiramycin by direct injection of plasma, using column-switching for sample clean-up. *J Chromatogr* 344: 275~283, 1985
- 7) Oldfield S, Berg JD, Stiles HJ, Buckley BM: Measurement of rifampicin and 25-desacetyl-rifampicin in biological fluids using high-performance liquid chromatography with direct sample injection. *J Chromatogr* 377: 423~429, 1986
- 8) Arnold PJ, Stetten OV: High-performance liquid chromatographic analysis of mefloquine and its main metabolite by direct plasma injection with pre-column enrichment and column switching techniques. *J Chromatogr* 353: 193~200, 1986
- 9) Zech K, Huber R: Determination of urapidil and its metabolites in human serum and urine. *J Chromatogr* 353: 351~360, 1986
- 10) Bargar EM: Application of column switching in high-performance liquid chromatographic analysis of medroxoalol in plasma. *J Chromatogr* 417: 143~150, 1987
- 11) Wyss R, Bucheli F: Quantitative analysis of retinoids in biological fluids by high-performance liquid chromatography using column switching. *J Chromatogr* 431: 297~307, 1988
- 12) Crawmer BP, Cook JA, Brown RR: Determination of amifloxacin and two of its principal metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography using automated column switching. *J Chromatogr* 530: 407~417, 1990
- 13) Tamai G, Edani M, Imai H: Determination of ketoprofen enantiomers in plasma by solid phase extraction and column switching high-performance liquid chromatography. *Anal Sci* 7: 29~32, 1991
- 14) Yamashita K, Motohashi M, Yashiki T: Automated high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of cefotiam and  $\Delta^3$ -cefotiam in human plasma using column switching. *J Chromatogr* 577: 174~179, 1992
- 15) 竹田益雄, 前田憲一: 生体試料中の cefozopran の微生物学的定量法. *Chemotherapy* 41(S-4): 135~141, 1993

High-performance liquid chromatographic method for  
the determination of cefozopran

Kenji Yamashita, Michio Motohashi, Ken'ichi Maeda,  
Masuo Takeda and Takatsuka Yashiki

Takeda Analytical Research Laboratories, Ltd.  
2-17-85 Jusohonmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

An HPLC method for the simultaneous determination of cefozopran (CZOP) and imidazo [1, 2-b] pyridazine (IP) in biological fluids was established. Human serum or urine was diluted with phosphate buffer and directly injected to the HPLC system. Detection was carried out at UV 254 nm for CZOP and fluorometrically (Ex at 300 nm and Em at 410 nm) for IP. The lower detection limits for CZOP were 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in serum and 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in urine, and those for IP were 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in serum and 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in urine. The method was applied to CZOP clinical trials.