

## TemafloracinのHPLC法による体液内濃度測定法

武田勝男・矢野 茂・佐久間由光・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所\*\*

(\*現 田辺製薬株式会社薬理研究所)

ヒト血清および尿中のtemafloxacin濃度を測定するための簡便で精度の高い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を設定した。血清の前処理は薬剤の蛋白との結合を解離する目的で、SDS、アセトニトリル、内部標準物質を含む解離液を血清に加え、その後に遠心限外濾過を行った。この限外濾過液を直接逆相カラムに注入し蛍光検出器で測定した。変動係数は血清が5.0~0.01 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で2.6%以下、希釈尿が4.0~0.02 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で1.0%以下であった。第I相臨床試験におけるヒト血清と尿のHPLCとbioassay法の測定値は良好な相関性を示した。

**Key words** : temafloxacin, キノロン剤, HPLC, 血清, 尿

Temafloracin (TMFX, Fig.1)は米国アボット社(Abbott Lab., North Chicago)で合成された広域スペクトルをもつニューキノロン剤である<sup>1-3)</sup>。本論文ではTMFXの第I相臨床試験<sup>4)</sup>に関連して検討したHPLC法による体液内濃度測定法について報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 試薬および試料

TMFXおよびHPLCの内部標準物質A57084は米国アボット社より供与された。アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用を用いた。他の試薬は市販の試薬の特級品を用いた。血清および尿は健康成人男子から採取し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存したものを用いた。

## 2. 標準液の作製

TMFXを蒸留水で溶解し1,000 $\mu\text{g/ml}$ (力価)の原液を作製した。この原液を1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)で所定の濃度(5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.05, 0.02, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ )に

希釈し、この希釈液に血清を等量加えたものを血清の標準液とした。一方、ヒト尿の標準液はTMFXの原液を希釈尿で所定の濃度(4, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 $\mu\text{g/ml}$ )となるよう作製した。希釈尿は特に断わらない限り、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)で200倍に希釈したものを用いた。なお、標準液の作製にはポリプロピレン製チューブを用いた。また、標準液は用事調製するが、標準原液は $-20^{\circ}\text{C}$ 、約1ヶ月保存が可能である。

## 3. 内部標準液の作製

内部標準物質(A57084, Fig. 1)は50%アセトニトリルで溶解し100 $\mu\text{g/ml}$ の原液を作製した。この原液を薬剤と蛋白との解離を目的とした解離液で所定の濃度(血清:0.2 $\mu\text{g/ml}$ , 尿:0.4 $\mu\text{g/ml}$ )に希釈して作製した。解離液には30%アセトニトリル, 0.5%1-ラウリル硫酸ナトリウム(SDS), 0.075Mリン酸二ナトリウム(リン

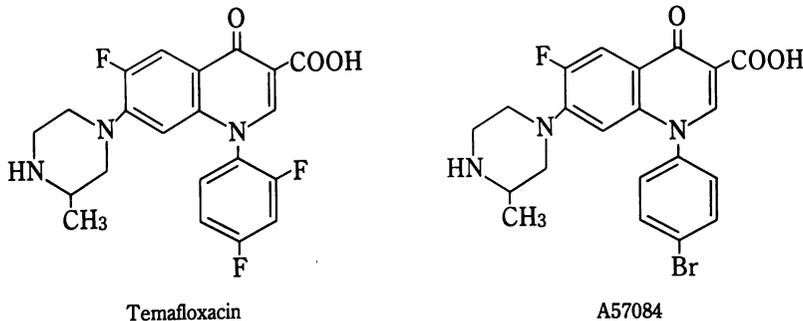


Fig. 1. Chemical structure of temafloracin and its bromophenyl derivative, A57084.

酸でpH7.4に調整)を用いた。

#### 4. 前処理

血清、尿試料または各々の標準液に上記の内部標準液を等量加えVortex mixerでよく混和した。血清はこの混液をセントリフリー(MPS-3, Amicon社)に移し、 $2,000 \times g$ で20分間遠心し、この遠心濾液(50 $\mu$ l)をHPLCに直接注入した。一方、尿はフィルターで濾過し、この濾液(25 $\mu$ l)をHPLCに直接注入した(Fig. 2)。なお、凍結保存(-20°C)した臨床検体の前処理は血清試料については室温で溶解し、また、薬剤濃度が高い尿試料については60°C、30分間加温溶解後、上記の操作を行った。

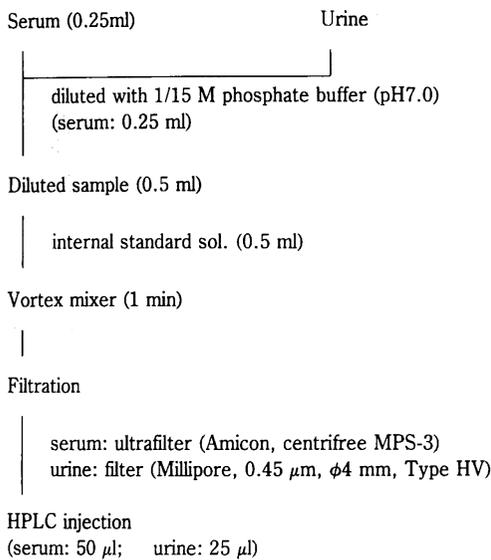


Fig. 2. Pretreatment of samples for HPLC.

#### 5. 濃度の算定

TMFXの濃度はピーク面積比(TMFX/内部標準物質)による内部標準検量線法で求めた。検量線はピーク面積比をY軸に添加濃度をX軸にとり最小二乗法で一次回帰( $Y = aX + b$ )した。

#### 6. 高速液体クロマトグラフ装置

高速液体クロマトグラフはポンプ(島津製LC-6A型)、オートサンプラー(島津製SIL-6A型)、蛍光検出器(島津製RF-535型)よりなる島津高速液体クロマトグラフLC-6Aシステムを用いた。

#### 7. 測定条件

Table 1に示した逆相イオンペア-分配クロマトグラフィーにて測定した。

## II. 結 果

### 1. クロマトグラフィー

ヒト血清と尿にTMFXと内部標準物質を添加した時のクロマトグラムをFig. 3に示した。TMFXと生体成分由来の定量障害ピークおよび内部標準物質との分離は良好であった。

### 2. 検量線

Fig. 4aにヒト血清に5~0.01 $\mu$ g/mlのTMFXを添加し、これらの測定値を一次回帰した時の検量線を示した。また、同じ測定値を用い、低濃度域(0.2~0.01 $\mu$ g/ml)で再度一次回帰した時の検量線をFig. 4bに示した。いずれの検量線も良好な直線性を示した。同様に、ヒト希釈尿(200倍)にTMFXを添加した時の検量線2つを作成した。いずれの検量線も良好な直線性を示した(Fig. 5)。

### 3. 正確度と精密度

上記の血清検量線作成時に別に、5, 0.5, 0.05, 0.01 $\mu$ g/mlの濃度の試料を作製し先の検量線(Fig. 4a)より各々の定量値を求めて正確度と精密度を検討した。ヒ

Table 1. HPLC conditions for the assay of temafloxacin in human serum and urine

Apparatus	Shimazu LC-6A Liquid Chromatograph
Column	TSK gel ODS-80T <sub>M</sub> ( $\phi$ 4.6 mm $\times$ 150 mm, Tosoh)
Column temp.	40°C
Mobile phase	acetonitrile: buffer* = 45:55 (v/v)
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	Shimazu RF-535 spectrofluorometer Ex. 280 nm, Em. 460 nm
Internal standard	A57084

\*buffer: 0.08M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4% SDS, 0.01M acetohydroxamic acid

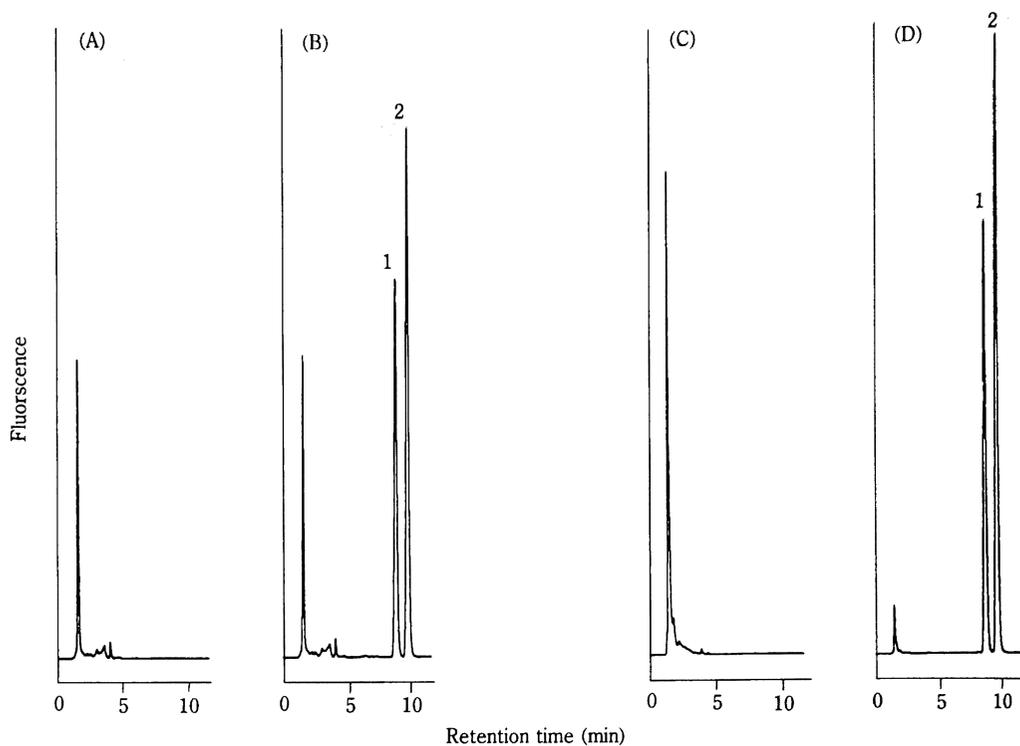


Fig. 3. HPLC chromatograms of temafloxacin in human serum and urine.

(A): Blank serum.

(B): Serum spiked with temafloxacin (0.5 µg/ml) and internal standard (IS).

(C): Blank urine (20-fold diluted).

(D): Blank urine (200-fold diluted) spiked with temafloxacin and IS.

Peak 1: temafloxacin, Peak 2: IS.

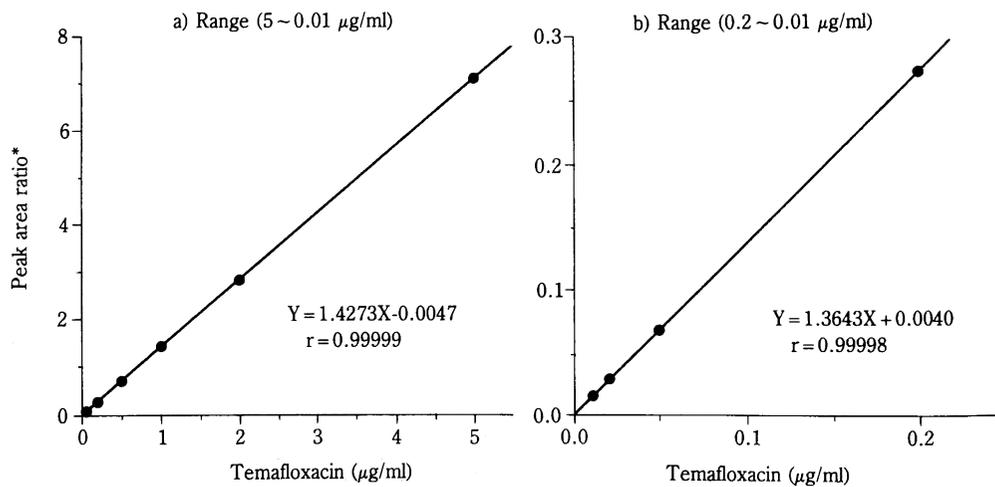


Fig. 4. Calibration curves of temafloxacin spiked in control serum.

\*Temafoxacin/Internal standard (A57084).

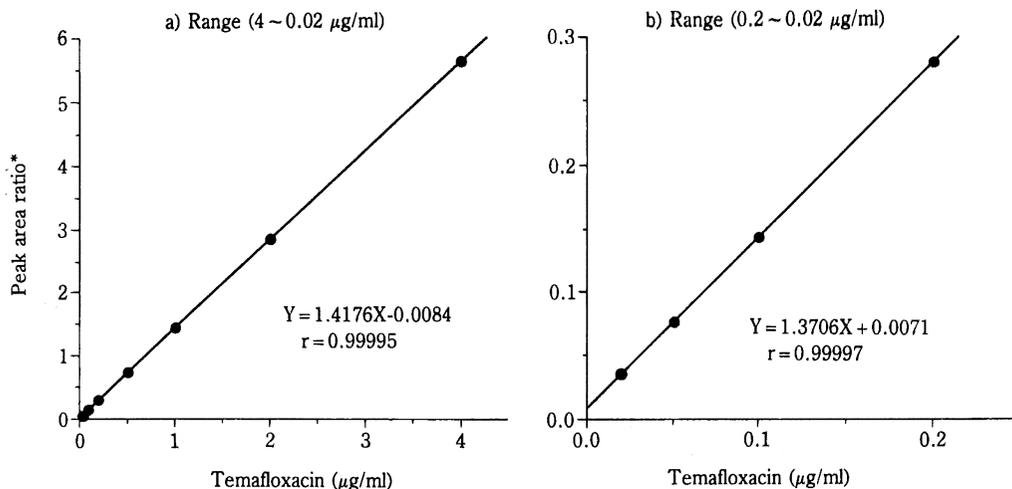


Fig. 5. Calibration curves of temafloxacin spiked in control urine\*\*.

\*Temafloxacin/Internal standard (A57084).

\*\*Urine diluted 200-fold with 1/15 M phosphate buffer (pH7.0).

Table 2. Accuracy and precision of the HPLC procedure for determination of temafloxacin in body fluids

Temafloxacin ( $\mu\text{g/ml}$ )		Calibration range ( $\mu\text{g/ml}$ )	Accuracy <sup>a)</sup> (%)	Precision <sup>b)</sup> (CV%)
Added	Detected (mean $\pm$ SD)			
Serum (n=5)				
5.0	5.00 $\pm$ 0.013	5.0~0.01	100	0.3
0.5	0.49 $\pm$ 0.001		98	0.2
0.05	0.054 $\pm$ 0.0002		108	0.4
0.01	0.016 $\pm$ 0.0004		160	2.6
0.05				
0.050 $\pm$ 0.0002		0.2~0.01	100	0.4
0.010 $\pm$ 0.0004			100	4.0
Urine <sup>c)</sup> (n=5)				
4.0	3.98 $\pm$ 0.018	4.0~0.02	99.5	0.4
0.5	0.50 $\pm$ 0.003		100	0.6
0.05	0.059 $\pm$ 0.0002		118	0.3
0.2				
0.21 $\pm$ 0.001		0.2~0.02	105	0.5
0.021 $\pm$ 0.0002			105	1.0

<sup>a)</sup> Accuracy (%): detected/added  $\times$  100<sup>b)</sup> Coefficient of variation (CV%): SD/mean  $\times$  100<sup>c)</sup> Urine diluted with 1/15M phosphate buffer (pH7.0)Range 4.0~0.02  $\mu\text{g/ml}$ : 200-fold, 0.2~0.02  $\mu\text{g/ml}$ : 20-fold

ト血清は5~0.05  $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な正確度と精密度を示した(Table 2)。しかし、これより低濃度域の試料(添加濃度 0.01  $\mu\text{g/ml}$ )は正確度が低下(160%)したため再度、低濃度域の検量線(Fig. 4b)で定量値を求めた。その結果、良好な正確度(100%)を得た。

同様に、上記の希釈尿(200倍)の検量線作成時に別に4, 0.5, 0.05  $\mu\text{g/ml}$ の濃度の試料を作製し、先の検量線(Fig. 5a)より各々の定量値を求めて正確度と精密度

を検討した。希釈尿は4~0.05  $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な正確度と精密度を示した。次に、薬剤濃度が低い尿試料の測定を目的として、低濃度域での正確度と精密度を求めるため、希釈尿(20倍)にTMFXを添加し0.2, 0.02  $\mu\text{g/ml}$ の濃度の試料を作製し、先の検量線(Fig. 5b)より各々の定量値を求めた。Table 2に示したように、低濃度域での正確度と精密度は満足するものであった。

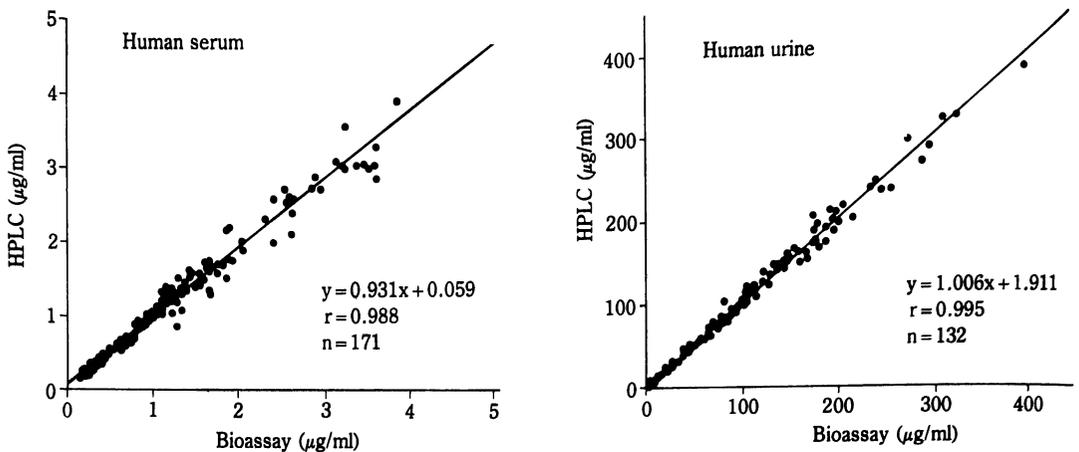


Fig. 6. Correlation between HPLC and bioassay analysis of temafloxacin in human serum and urine.

#### 4. HPLC法とbioassay法との比較

TMFXを健康成人男子に単回経口投与し、投与後採取した血清および尿中のTMFX濃度をそれぞれHPLCとbioassay法<sup>6)</sup>で測定し両測定法の相関を検討した。その結果、血清および尿とも両測定法に良好な相関性が認められた(Fig.6)。

### Ⅲ. 考 察

臨床検体を対象としたHPLC法による体内濃度測定法は、クロマトグラム上の生体由来の定量障害ピークを如何に分離するかにある。通常、ニューキノロン剤はその常用量における尿中濃度が非常に高く(ピーク時で100 µg/ml以上)、臨床検体の尿中濃度は20~200倍希釈して測定するためクロマトグラム上の障害ピークは余り問題とならない。一方、ニューキノロン剤は経口投与時の血清中濃度が比較的低いため(10 µg/ml以下)、測定時に血清蛋白を除く工夫を要する。一般に、上市または開発中のニューキノロン剤<sup>7-10)</sup>は血清試料の前処理法にクロロホルムなどによって除蛋白する溶媒抽出法が用いられてきた。しかし、これらの抽出法は多数の臨床検体を扱う時、多くの労力と時間を必要とする。

我々はTMFXの第I相試験<sup>5)</sup>における臨床検体の濃度測定に当り、除蛋白に限外濾過膜を用いたGrannemanら<sup>11)</sup>の方法を検討した。本法は血清試料の前処理が簡便で、カラムの劣化が少なく連続測定に耐え、検体の飛散を最少限に抑えることができ安全面においても優れた方法である。本法は試料の前処理の段階で血清に結合した薬剤を解離させる目的で、内部標準液にSDSとアセトニトリルを加えてある(Fig. 2)。また、測定時には、この内部標準液の限外濾過膜への影響を考

慮し、限外濾過膜との接触時間は30分以内とするように心掛けた。また、本論文中には血清と尿の各2本の検量線を示したが、実際の臨床検体の測定は広範囲濃度域の検量線で問題はなく、特に試料中の薬剤濃度が低い場合は低濃度域の検量線でその値を確認した。本測定法は精密度が優れ変動係数は血清が5.0~0.01 µg/mlの範囲で2.6%以下、希釈尿が4.0~0.02 µg/mlの範囲で1.0%以下であった(Table 2)。また、血清中のTMFX濃度の測定限界は0.01 µg/ml(正確度100%, 精密度4%)と推定された。一方、200倍希釈尿の測定限界は0.05 µg/ml(正確度118%, 精密度0.3%), 20倍希釈尿のそれは0.02 µg/ml(正確度105%, 精密度1.0%)と推定された(Table 2)。第I相臨床試験におけるヒト血清と尿のHPLCとbioassay法の測定値はほぼ等しく良好な相関性を示したが、この結果はヒト血清および尿試料中には抗菌活性を示すTMFXの代謝物が殆どないことを示唆した。

### 文 献

- 1) 松下忠弘, 押田忠弘, 恩田時男, 内藤真智子, 山口東太郎: Temafloxacin の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 41 (S-5): 67~80, 1993
- 2) 谷 佳都, 芝田和夫, 恩田時男, 山口東太郎: Temafloxacin のマウス実験感染症に対する治療効果. *Chemotherapy* 41 (S-5): 89~101, 1993
- 3) Hardy DJ, Swanson RN, Hensley DM, Ramer NR, Bower R R, Hanson CW, Chu DTW and Fernandes PB: Comparative antibacterial activities of temafloxacin hydrochloride (A-62254) and two reference fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1768~1774, 1987

- 4) Swanson RN, Hardy DJ, Chu DTW, Shipkowitz N L and Clement J J: Activity of temafloxacin against respiratory pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 423~429, 1991
- 5) 中島光好, 植松俊彦, 長嶋 悟, 小菅和仁, 金丸光隆: Temafloxacin の臨床第 I 相試験。 *Chemotherapy* 41 (S-5): 242~259, 1993
- 6) 武田勝男, 佐久間由光, 矢野 茂, 小山八重子, 山口東太郎: Temafloxacin の bioassay 法による体液中濃度測定法。 *Chemotherapy* 41 (S-5): 116~121, 1993
- 7) 山口俊和, 鈴木玲子, 関根 豊: AT-2266 の体内動態 III, ヒトにおける AT-2266 と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄。 *Chemotherapy* 32(S-3): 109~116, 1984
- 8) 一原規方, 立澤晴男, 津村光義, 采 孟, 佐藤 敬喜: DL-8280 の第一相臨床試験: *Chemotherapy* 32(S-1): 118~149, 1984
- 9) 中島光好, 植松俊彦, 滝口祥令, 水野淳宏, 久保信治, 高原義男, 桶崎英一, 永田 治: NY-198 の第 I 相臨床試験。 *Chemotherapy* 36(S-2): 201~239, 1988
- 10) 中島光好, 植松俊彦, 滝口祥令, 水野淳宏, 板谷武彦, 金丸光隆, 川原富美男, 大家 毅, 斉藤静樹, 保坂雅喜, 内田 広, 増澤国泰: Fleroxacin の第 I 相臨床試験 I。 *Chemotherapy* 38(S-2): 280~311, 1990
- 11) Granneman G R, Carpentier P, Morrison P J and Pernet A G: Pharmacokinetics of temafloxacin in humans after single oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 436~441, 1991

### High-performance liquid chromatography method for temafloxacin in body fluids

Katsuo Takeda, Shigeru Yano, Yoshimitsu Sakuma and Totaro Yamaguchi  
Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.  
2-2-50 Kawagishi, Toda 335, Japan

A simple and precise high-performance liquid-chromatography procedure has been developed for the determination of temafloxacin in human serum and urine. Pretreatment of serum samples was carried out by ultrafiltration after addition of an internal standard in a displacing reagent containing sodium dodecyl sulfate and acetonitrile. The ultrafiltrates are directly analyzed using a reverse-phase analytical column and fluorescence detection. The mean intra-assay coefficient of variation for serum was less than 2.6% in the 5.0~0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  range, whereas for diluted urine it was less than 1.0% in the 4.0~0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  range. Serum and urine samples in phase I studies were analyzed by HPLC and the bioassay method to determine the precision of each. A good correlation was observed between the two.