

Grepafloxacinの体液内濃度測定法の検討

向井典江・大森和則・玉岡 寿・菊地幹雄

大塚製薬株式会社微生物研究所*

秋山 仁・小富正昭

大塚製薬株式会社徳島研究所

Grepafloxacin (GPFX) の体液内濃度測定法をbioassay法及びHPLC法を用いて検討した。Bioassay法では被検菌に*Bacillus subtilis* ATCC6633を、検定培地に普通寒天培地を用いた薄層カップ法を標準法と設定した。血漿中濃度測定には正常ヒト血漿及び1/15Mリン酸緩衝液pH7.4を用い、尿中濃度測定には1/15Mリン酸緩衝液pH7.0を用い検量線を作成することとした。本法での測定下限濃度は0.012~0.025 $\mu\text{g/ml}$ であった。HPLC法では血漿及び尿サンプルにクロロホルムを添加し、GPFXを抽出した。この抽出されたGPFXを逆相カラムに注入し、蛍光検出器で測定した。変動係数は血漿中濃度が0.01~1.00 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で4.4%以下、0.025~5.00 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で3.5%以下であった。尿中濃度では0.25~50.00 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で4.0%以下であった。第一相臨床試験におけるヒト血漿中濃度及び尿中濃度ともにbioassay法とHPLC法の間に良好な相関性が確認された。

Key words : grepafloxacin, キノロン薬, bioassay法, HPLC法

Grepafloxacin (GPFX) は広域スペクトルの新キノロン薬で、特にグラム陽性菌に強い抗菌力を示す薬剤である¹⁾。また、本剤はクラミジア、マイコプラズマに対しても強い抗菌力を示し^{2,3)}、組織移行性に優れた薬剤である⁴⁾。今回GPFXのbioassay法ならびにHPLC法による体液内濃度測定法を検討したので報告する。

I. 実験材料及び方法

1. 使用薬剤

GPFX (Fig. 1A) は大塚製薬(株)第二工場で作成された標準品を用いた。内部標準物質(OPC-17203, Fig. 1B)は大塚製薬(株)新薬第二研究所にて合成されたものを使用した。他の試薬は市販の特級品またはクロマトグラフ用を用いた。

2. Bioassay法

1) 検定菌

大塚製薬微生物研究所保存の*Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* NIHJ JC-2及び*E. coli* Kp株を用いた。

2) 測定用培地

Nutrient agar (NA; 栄研化学), Mueller hinton agar (MHA; Difco) 及びHeart infusion agar (HIA; Difco) を用いた。

3) 検定菌の調製法

B. subtilis ATCC6633の場合OD₆₆₀=0.20に調製した孢子液(約4×10⁷cfu/ml)を保存孢子液とし、各測定培地

に1%の割合で接種した。*E. coli* NIHJ JC-2及び*E. coli* Kpの場合、Mueller hinton broth (MHB; Difco) で37℃18時間、培養した菌をOD₆₆₀=0.5に調製し、測定用培地に5%接種した。

4) 濃度測定法

薄層カップ法及びペーパーディスク法を用い測定した。検定菌を接種した測定培地6mlをシャーレ(直径90×15mm, テルモ)に分注し、固化させた。*B. subtilis* ATCC6633の場合4℃に16~18時間、*E. coli* NIHJ JC-2及び*E. coli* Kp株の場合は4℃に4時間、含菌平板を保存後試験に供した。薄層カップ法の場合は、専用カップドロップパーにて測定培地上にペニシリンカップを置き、標準液または試料をカップ内充填した。ペーパーディスク法の場合は、8mmの厚手ペーパーディスク(アドバンテック東洋)に標準液または試料を含有させ、平板上に貼付した。室温で30分拡散後、37℃にて18時間培養した。培養後生じた阻止円の直径をノギスで0.01mmまで測定し、検量線または試料濃度を求めた。各試料濃度は3枚の平板より得られた阻止円直径の平均値にて算出した。

5) 標準液の調製

GPFXを1000 $\mu\text{g/ml}$ になるように蒸留水に溶解し、標準原液を作製した。標準液はこの標準原液を①1/15Mリン酸緩衝液(P.B.)pH7.0, ②1/15Mリン酸緩衝液(P.B.)pH7.4, ③正常ヒト血漿, ④標準血清(コンセーラ; 日水製薬), ⑤健常人尿で0.0125~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲

になるように希釈した。これら標準液は用時調製した。

3. HPLC法

1) 装置

HPLCポンプ：Model 510(日本ウォーターズ，東京)

検出器：RF-535型蛍光検出器(島津製作所，京都)

インジェクター：WISP 712(日本ウォーターズ)

データ処理装置：クロマトパック C-R5A(島津製作所)

カラム：TSK gel ODS-80T_M (4.6mmI.D. × 15cm，東ソー，東京)

2) 測定条件

移動相：アセトニトリル：0.1% H₃PO₄，20mM硫酸ナトリウム=28:72 (V/V)

流速：0.8ml/min

検出波長：励起波長 (Ex) 285nm，蛍光波長 (Em) 448nm

カラム温度：室温

3) 血漿からの抽出法

血漿 (0.2ml) に内部標準物質 (OPC-17203, Fig. 1B, 100ng/10 μ l メタノール) および 25mM リン酸緩衝液 (pH 6.86, 1.0ml) を加え Vortex ミキサーで攪拌後，クロロホルム (5.0ml) を加えた。十分振盪後，約 1700 $\times$ g で 10 分間遠心分離した。クロロホルム層 (3.5ml) を分取し，クロロホルムを窒素気流下で蒸発乾固した。残渣を移動相 (1.0ml) に溶解し，10 $\sim$ 25 μ l を HPLC に注入した。

4) 尿からの抽出法

10 倍に希釈した尿 (0.2ml) を用いて血漿の場合と同様の操作にて抽出を行い HPLC に注入した。

II. 結 果

1. Bioassay法

1) 検定菌の検討

B. subtilis ATCC6633, *E. coli* NIHJ JC-2 及び *E. coli* Kp 株を用い，GPFX の濃度と阻止円直径の関係を，薄層カップ法にて検討した (Fig. 2, 3)。 *B. subtilis* ATCC6633 を検定菌とした場合，0.0125 μ g/ml $\sim$ 6.25 μ g/ml の濃度範囲内で，阻止円直径と薬剤濃度 (対数) の間に良好な直線性が得られ，測定下限は 0.0125 μ g/ml と優れていた。

また阻止円は鮮明であった。

E. coli NIHJ JC-2 株を使用した場合，検量線の傾きは *B. subtilis* ATCC 6633 株を検定菌とした場合と比較し小さく，また測定下限は 0.025 μ g/ml であった。なお，その阻止円は *B. subtilis* ATCC6633 株に比較するとやや不鮮明であった。

E. coli Kp 株を用いた場合，直線性および検出感度共に *B. subtilis* ATCC6633 の場合と同様であったが，阻止円の鮮明度は *B. subtilis* ATCC6633 株より劣っていた。検量線の傾き，検出感度並びに阻止円の鮮明度から，*B. subtilis* ATCC6633 を GPFX の標準的な検定菌として選択した。

2. 測定培地の検討

B. subtilis ATCC6633 を検定菌とする薄層カップ法で，検量線に与える培地の影響を検討した。NA, MHA, HIA を測定培地とした時の検量線を Fig. 4 に示した。同一濃度での阻止円直径は NA 培地を用いた場合が最も大きく，MHA, HIA の順であった。検量線の直線性は，いずれの培地を用いた場合も優れていた。測定下限は NA 及び MHA 培地が 0.025 μ g/ml であり，HIA 培地は 0.05 μ g/ml であった。阻止円の鮮明度は NA, HIA が優れ，MHA はやや劣っていた。以上の成績から検定培地として NA (普通寒天培地；栄研化学) を選択した。

3. 接種菌量の検討

B. subtilis ATCC6633 の保存胞子液を NA 培地に 0.5, 1.0, 2.0% (培地あたり約 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 CFU/ml に相当する) 接種し，薄層カップ法にて検量線に与える接種菌量の影響を検討した。各菌量の検量線を Fig. 5 に示した。いずれの接種菌量でもほぼ同じ検量線が得られたが，測定下限は接種菌量の増加とともに上昇した。また 0.5% の保存胞子液を添加した場合は，菌の生育及び阻止円の鮮明さがやや劣っていた。測定感度及び阻止円の鮮明さより，接種菌量は保存胞子液を 1.0% 添加 (4×10^5 CFU/ml) することにした。

4) 希釈液の pH の影響

pH 6.0, 7.0, 7.4, 8.0 の 1/15M リン酸緩衝液を用い，GPFX の検量線に及ぼす pH の影響について検討した成績

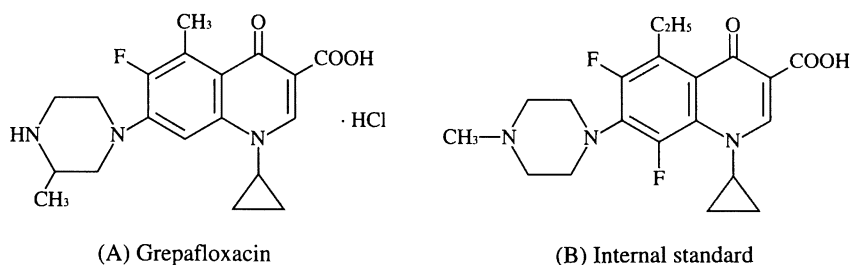


Fig. 1. Chemical structures of grepafloxacin (A) and the internal standard (B).

をFig. 6に示した。各検量線はそれぞれ次の一次回帰式で表すことができる。pH6.0; $Y = 4.78 \times \log X + 29.16$, pH7.0; $Y = 4.23 \times \log X + 27.51$, pH7.4; $Y = 4.13 \times \log X + 27.87$, pH8.0; $Y = 4.31 \times \log X + 29.10$ 。pH7.0~8.0の間では検量線の傾きはほぼ一定であったが、pH6.0では傾きがやや大きかった。測定下限はpH6.0, 7.0, 7.4, 8.0でそれぞれ0.05, 0.025, 0.0125, 0.0125 $\mu\text{g/ml}$ であり、酸性側pHでやや上昇する傾向がみられた。

5) 血漿の検量線に及ぼす影響

健常人血漿、コンセーラ(標準血清, 日水製薬), 及びpH7.4の1/15Mリン酸緩衝液にて標準液を調製し、検量線を作成した(Fig. 7)。1/15Mリン酸緩衝液による検量線とヒト血漿による検量線に差異は見られなかった。一

方、コンセーラを用いて検量線を求めた場合、健常人血漿の検量線と比較して、傾きはほぼ同じであるが、同一濃度での阻止円は小さくなり、検出下限も0.0125 $\mu\text{g/ml}$ から0.025 $\mu\text{g/ml}$ となった。また、コンセーラには*B. subtilis* ATCC6633に対して抗菌力を示すロットが含まれていた。したがって、血漿中GFPX濃度測定には、健常人血漿を用いて検量線を作成することとした。

6) 尿の検量線に及ぼす影響

健常人尿及び1/15Mリン酸緩衝液pH7.0の検量線を比較した(Fig. 8)。その結果、尿及び緩衝液の検量線はほぼ同様の直線性及び傾きを示した。したがって、尿中GFPX濃度を測定する場合、1/15Mリン酸緩衝液pH7.0の検量線を用いることにした。

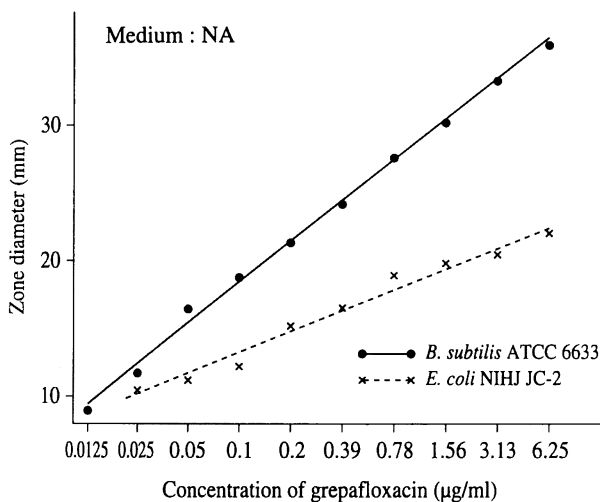


Fig. 2. Standard curves of grepafloxacin using various test organisms.

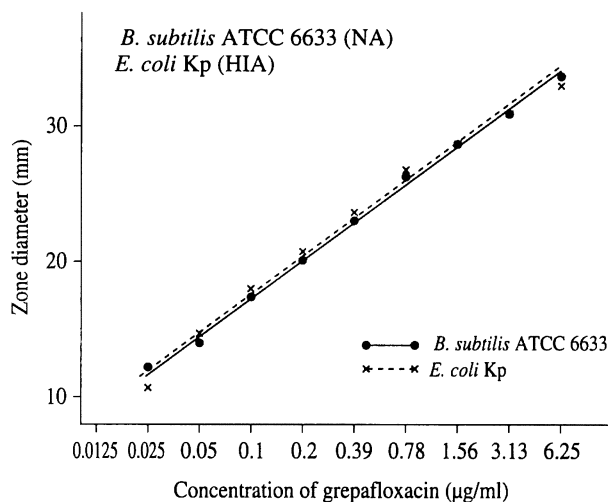


Fig. 3. Standard curves of grepafloxacin using various test organisms.

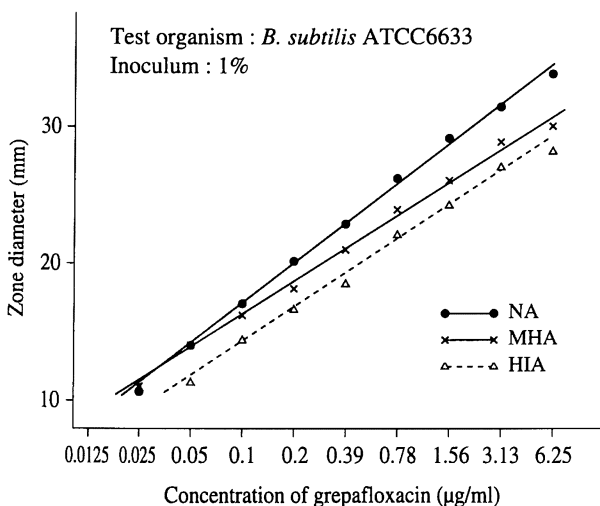


Fig. 4. Standard curves of grepafloxacin using various assay media.

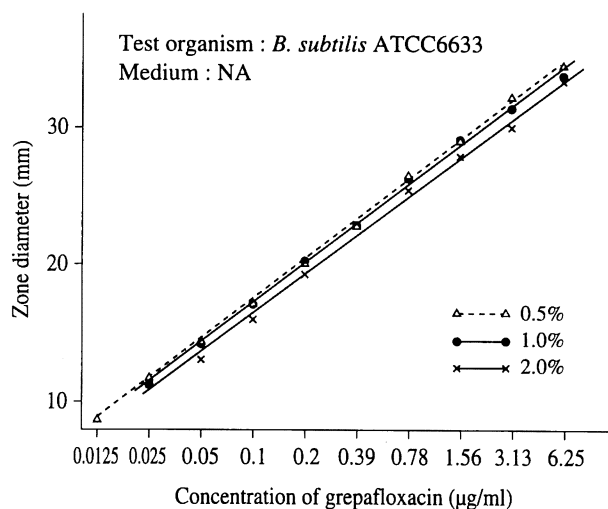


Fig. 5. Standard curves of grepafloxacin with various inoculated concentrations of *Bacillus subtilis* ATCC6633.

7) 測定法の比較

B. subtilis ATCC6633を検定菌とし、薄層カップ法とペーパーディスク法による検量線を比較検討した。Fig. 9に示す様に阻止円の直径は、カップ法がペーパーディスク法より大きく、検出下限はカップ法で $0.0125\mu\text{g/ml}$ 、ペーパーディスク法で $0.1\mu\text{g/ml}$ であった。両測定法ともに良好な直線性を示し、いずれの方法もGPFXの濃度測定として使用可能であるが、標準法としては、測定感度の高い薄層カップ法により測定することにした。

2. HPLC法

1) 血漿中定量法

(1) GPFXの濃度範囲が $0.01\sim 1.00\mu\text{g/ml}$ の場合

ヒトブランク血漿、ヒトブランク血漿にGPFX ($0.10\mu\text{g/ml}$) 及び内部標準物質 ($0.20\mu\text{g/ml}$) を添加した血漿、

及びGPFXをヒトに 100mg/body の用量で単回経口投与後のサンプル血漿から得られた典型的なクロマトグラムをFig. 10に示した。クロマトグラムのGPFX及び内部標準物質の溶出位置付近には妨害ピークは認められなかった。またGPFXの保持時間は5.6分、内部標準物質は8.8分であった。

ヒト血漿中におけるGPFX濃度が $0.01\sim 1.00\mu\text{g/ml}$ の範囲で確立された検量線の直線性をTable 1に示した。HPLC法の精度は、各濃度5例の標品についての平均ピーク高さ比及び標準偏差から変動係数(C.V.)を計算することにより決定した。変動係数はいずれの濃度においても4.4%以下であった。また得られた検量線の式は $\log Y = 1.2244 \times \log X + 0.9642$ であり相関係数は0.999であった。この検量線を用いて計算された血漿中GPFX濃度と

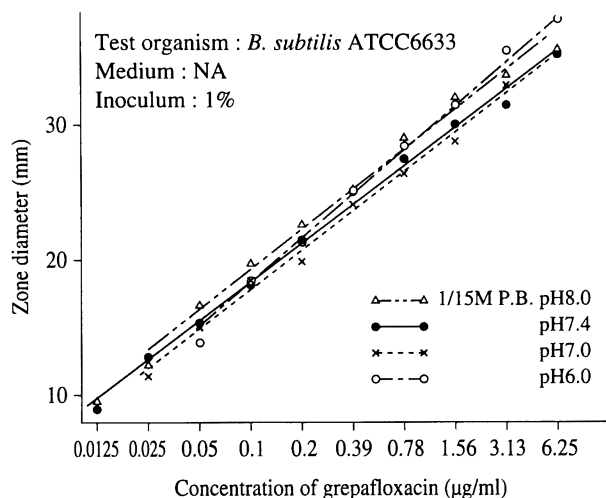


Fig. 6. Standard curves of grepafloxacin with various pH of 1/15M phosphate buffer as diluent.

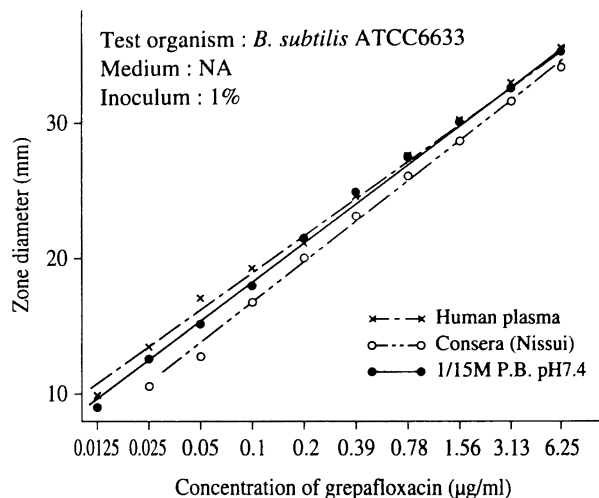


Fig. 7. Standard curves of grepafloxacin using 1/15M P.B. (pH 7.4), human plasma and consera.

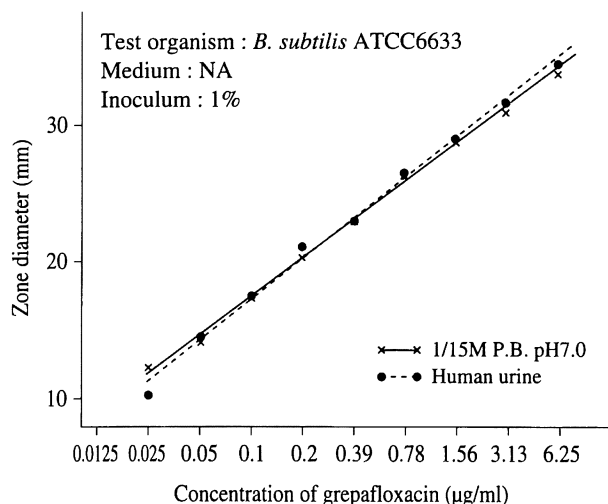


Fig. 8. Standard curves of grepafloxacin in human urine.

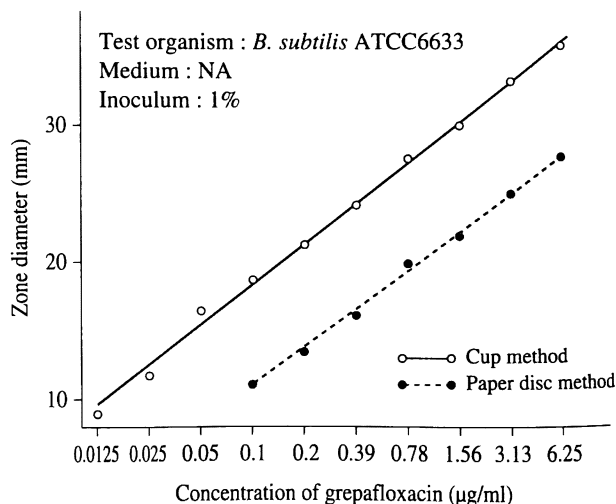


Fig. 9. Standard curves of grepafloxacin by different methods.

血漿中に添加した量を比較するとそれらはよく一致し、測定された濃度は添加量の95～106%であった。更に、この測定法におけるGPFXの回収率は、得られたピーク高さを別に調製した標準液から得られたピーク高さと比較することにより決定した。回収率はどの濃度においても74%以上であった。

(2) GPFXの濃度範囲が0.025～5.000μg/mlの場合
ヒト血漿中におけるGPFX濃度が0.025～5.00μg/mlの範囲で確立された検量線の直線性をTable 2に示した。HPLC法の精度は、各濃度 5例の標品についての平均ピーク高さ比及び標準偏差から変動係数(C.V.)を計算することにより決定した。変動係数はいずれの濃度においても

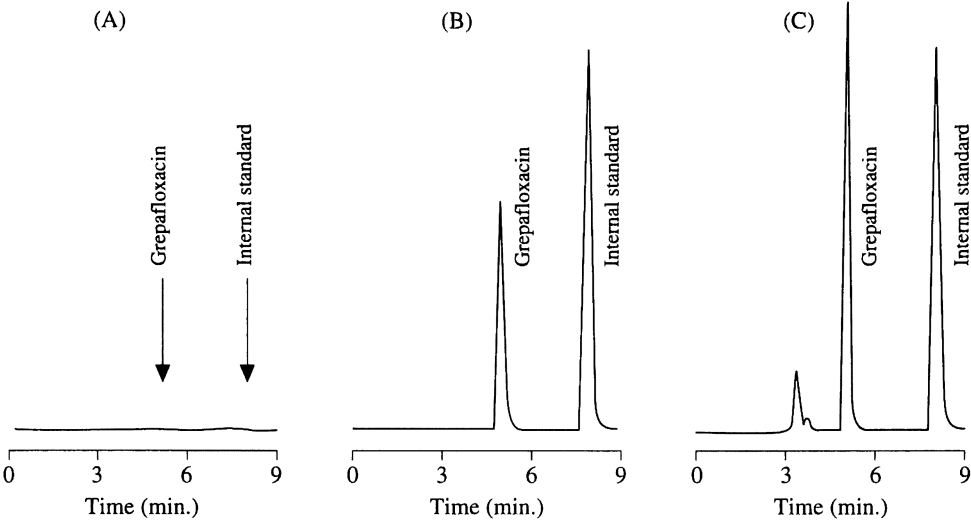


Fig. 10. (A) Chromatogram of blank human plasma. (B) Chromatogram of human plasma containing grepafloxacin (0.10 μg/ml) and internal standard (0.20 μg/ml). (C) Chromatogram of sample human plasma after an oral administration of 100 mg/body of grepafloxacin.

Table 1. Linearity and precision of HPLC procedure for grepafloxacin in human plasma determined by internal standard method (range: 0.01 ~ 1.00 μg/ml)

Amount of grepafloxacin added to the plasma (μg/ml)	Peak height ratio Mean ± SD*	C.V. (%)	Recalculated concentration (μg/ml)	% of theory	Recovery (%)
0.01	0.031 ± 0.001	2.0	0.009	95	74
0.025	0.100 ± 0.004	4.4	0.025	99	78
0.05	0.249 ± 0.005	1.8	0.052	105	81
0.10	0.590 ± 0.006	1.0	0.106	106	79
0.25	1.716 ± 0.063	3.7	0.254	101	89
0.50	3.840 ± 0.100	2.6	0.489	98	88
1.00	8.824 ± 0.113	1.3	0.966	97	94

*Results from five replicated samples were used.

Table 2. Linearity and precision of HPLC procedure for grepafloxacin in human plasma determined by internal standard method (range: 0.025 ~ 5.00 μg/ml)

Amount of grepafloxacin added to the plasma (μg/ml)	Peak height ratio Mean ± SD*	C.V. (%)	Recalculated concentration (μg/ml)	% of theory	Recovery (%)
0.025	0.057 ± 0.001	1.7	0.023	92	95
0.05	0.132 ± 0.004	3.4	0.051	103	95
0.10	0.277 ± 0.004	1.5	0.103	103	93
0.25	0.722 ± 0.026	3.5	0.256	102	95
0.50	1.554 ± 0.036	2.3	0.524	105	97
1.00	3.122 ± 0.057	1.8	1.019	102	94
2.50	7.877 ± 0.127	1.6	2.444	98	95
5.00	16.092 ± 0.484	3.0	4.801	96	95

*Results from five replicated samples were used.

3.5%以下であった。また得られた検量線の式は $\log Y = 1.0581 \times \log X + 0.4857$ であり相関係数は0.999であった。この検量線を用いて計算された血漿中GPFX濃度と血漿中に添加した量を比較するとそれらはよく一致し、測定された濃度は添加量の92~105%であった。更に、この測定法におけるGPFXの回収率は、得られたピーク高さ別に調製した標準液から得られたピーク高さと比較することにより決定した。回収率はどの濃度においても93%以上であった。

2) 尿中定量法

ヒトブランク尿、GPFX (2.50 μ g/ml) 及び内部標準物質 (5.00 μ g/ml) を添加したヒトブランク尿及びGPFXをヒトに100mgの用量で単回経口投与後のサンプル尿から得られた典型的なクロマトグラムをFig. 11に示した。クロマトグラムのGPFX及び内部標準物質付近には妨害ピークは認められなかった。また、GPFXの保持時間は5.5分及び内部標準物質の保持時間は8.6分であった。ヒト尿中におけるGPFX濃度が0.25~50.00 μ g/mlの範囲で確立された検量線の直線性をTable 3に示した。HPLC法の精度は、各濃度5例の標品について平均ピーク高さ及

び標準偏差から変動係数を計算することにより決定した。変動係数はいずれの濃度においても4.0%以下であった。

また得られた検量線の式は、 $\log Y = 1.0684 \times \log X - 0.5833$ であり、相関係数は0.999であった。この検量線を用いて計算された尿中GPFX濃度を、対応する尿中に添加した量と比較するとそれらはよく一致し、計算された濃度は添加量の93~105%であった。さらに、この測定法におけるGPFXの回収率は、得られたピーク高さを別に調整した標準液から得られたピークと比較することにより決定した。回収率はどの濃度においても86%以上であった。

3. Bioassay法とHPLC法の比較

健康成人男子にGPFXを単回経口投与し、採取した血漿及び尿中のGPFX濃度をそれぞれbioassay法ならびにHPLC法により測定し、両測定法の相関性を検討した。Fig. 12に示す様に血漿中及び尿中GPFX濃度は両方法で良好な相関性が認められ、相関係数はそれぞれ0.9856及び0.9858であった。

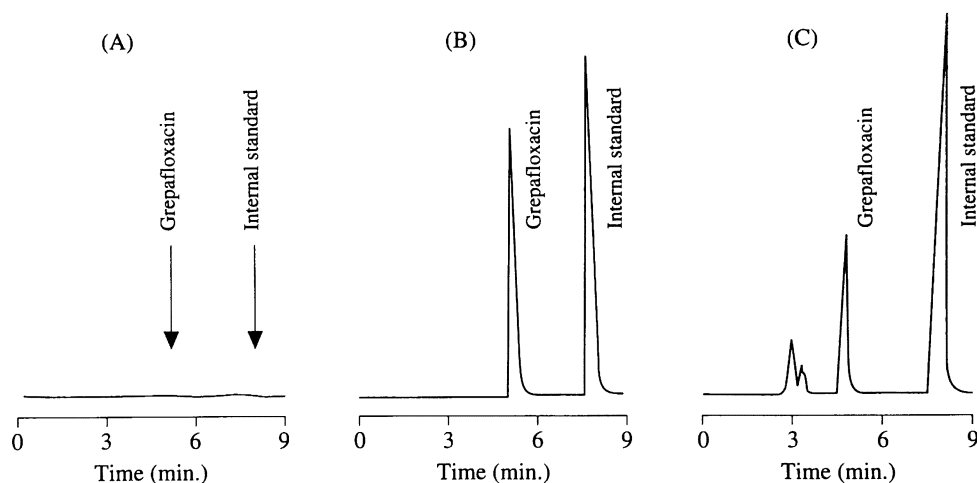


Fig. 11. (A) Chromatogram of blank human urine. (B) Chromatogram of human urine containing grepafloxacin (2.50 μ g/ml) and internal standard (5.00 μ g/ml). (C) Chromatogram of sample human urine after an oral administration of 100 mg/body of grepafloxacin.

Table 3. Linearity and precision of HPLC procedure for grepafloxacin in human urine determined by internal standard method

Amount of grepafloxacin added to the urine (μ g/ml)	Peak height ratio Mean $\pm$ SD*	C.V. (%)	Recalculated concentration (μ g/ml)	% of theory	Recovery (%)
0.25	0.055 $\pm$ 0.002	2.7	0.23	93	95
0.50	0.126 $\pm$ 0.004	3.5	0.51	101	86
1.00	0.272 $\pm$ 0.011	4.0	1.04	104	91
2.50	0.702 $\pm$ 0.026	3.7	2.52	101	95
5.00	1.532 $\pm$ 0.025	1.6	5.24	105	97
10.00	3.138 $\pm$ 0.091	2.9	10.25	103	97
25.00	8.103 $\pm$ 0.118	1.5	24.91	100	94
50.00	16.074 $\pm$ 0.473	2.9	47.30	95	95

*Results from five replicated samples were used.

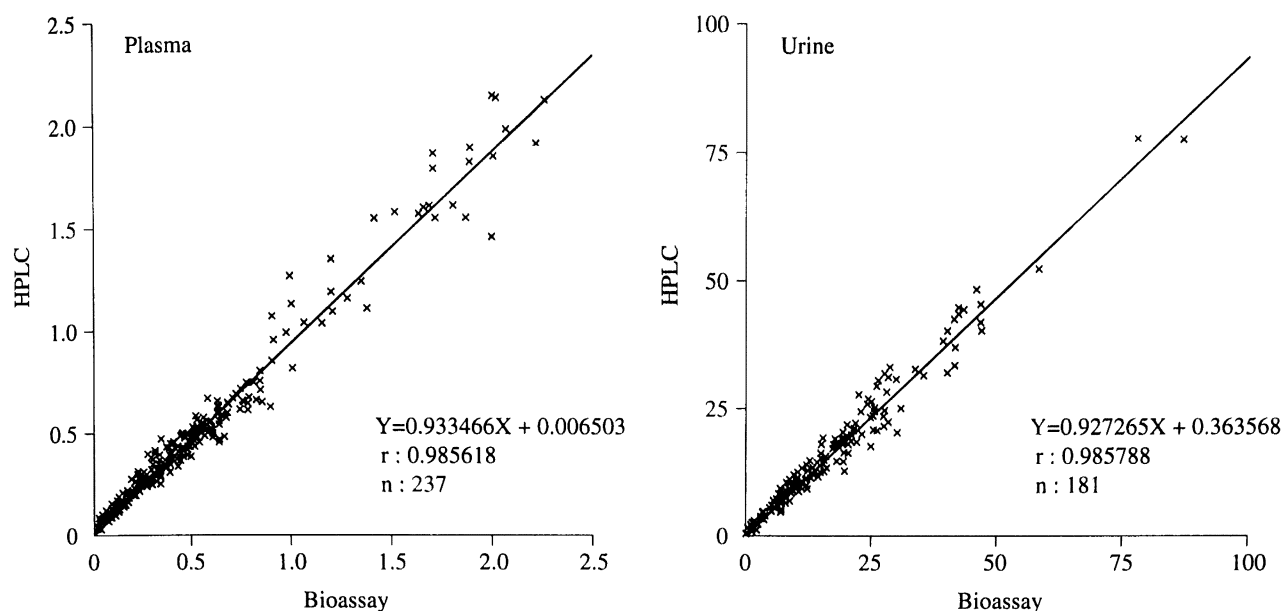


Fig. 12. Correlation between concentrations of grepafloxacin determined by HPLC and bioassay.

Ⅲ. 考 察

キノロン薬のbioassay法による体液内濃度測定法をみると、ペーパーディスク法、薄層カップ法及びアガーウェル法⁵⁻¹⁰⁾により測定され、その多くは*E. coli* Kp⁶⁻¹⁰⁾株を検定菌としている。

著者らは、ヒト血清および尿中GPFX濃度を測定するためのbioassay法を比較検討した結果、検定菌として阻止円の鮮明度、簡便性がすぐれていた*B. subtilis* ATCC6633を選定した。また、検定培地として測定精度及び阻止円の鮮明度がすぐれていたNAを選定した。この検定菌及び検定培地を用いてペーパーディスク法と薄層カップ法を比較した結果、両法ともに有用であったが、測定精度においては薄層カップ法の方がややすぐれていたことから、この方法を標準法として採用することにした (Table 4)。なお、本法の測定下限は0.012~0.025 μ g/mlであった。

標準液の作製及び試料の希釈を行う場合、ヒト血漿を用いた検量線は1/15Mリン酸緩衝液 (pH7.4) と同様であり、またヒト尿を用いた検量線も1/15Mリン酸緩衝液 (pH7.0) と同様であったことからこれらの緩衝液の使用が可能であると考えられた。

HPLC法では、血漿及び尿サンプル中のGPFXをクロロホルム層に抽出し測定を行った。この方法により検討したGPFXの定量法は、夾雑物によるピークの阻害もなく、迅速性、感度及び精度においても十分満足できる有用な方法であった。

今回、検討した条件ではbioassay法とHPLC法によるGPFXの血漿中濃度及び尿中濃度の相関性はすぐれていた。したがってGPFX濃度測定はbioassay法ならびに

Table 4. Standardization of bioassay for grepafloxacin in human body fluids

Method	cup method
Test organism	<i>B. subtilis</i> ATCC6633
Inoculum	cell suspension (OD ₆₆₀ =0.2): 1%
Medium	nutrient agar (Eiken)
Incubation	37°C, 18-24 hr
Assay range	0.0125~6.25 μ g/ml
Diluent solution	plasma: 1/15M phosphate buffer (pH 7.4) urine: 1/15M phosphate buffer (pH7.0)

HPLC法のいずれの方法でも測定可能であると考えられた。

文 献

- 1) Neu HC, Fang W, Gu J, Chin NX: *In vitro* activity of OPC-17116. Antimicrob Agent Chemother 36: 1310~1315, 1992
- 2) 永山在明, 中尾偕主: Grepafloxacinの*Chlamydia trachomatis*に対する*in vitro*抗菌力。日化療会誌43 (S-1): 70~73, 1995
- 3) Kenny G E, Cartwright F D: Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to a new quinolone, OPC-17116. Antimicrob Agent Chemother 37: 1726~1727, 1993
- 4) 秋山 仁, 阿部佳史, 小池正己, 急式和代, 藤尾直希, 小富正昭, 向井典江, 大森和則: Grepafloxacinの体内動態(I) - HPLC法による各種

- 動物における吸収, 分布, 排泄一。日化療会誌 43(S-1): 99~106, 1995
- 5) 大森康男, 村山 哲, 阿部泰夫, 入倉 勉: Bioassay法によるAM-715の体内濃度測定法に関する研究。Chemotherapy 29(S-4): 91~97, 1981
- 6) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態I—Bioassay法による各種動物における吸収, 分布および排泄一。Chemotherapy 36(S-2): 132~137, 1988
- 7) Nakamura S, Kurobe N, Kashimoto S, Ohue T, Takase Y and Shimizu M: Pharmacokinetics of AT-2266 administrated orally to mice, rats, dogs and monkeys. Antimicrob Agents Chemother 24: 54~60, 1983
- 8) 芦原義久, 湯木士郎, 小林紀彦, 浅田裕啓: Bioassay法によるBAYo9867 (Ciprofloxacin)の体内濃度測定法に関する研究。Chemotherapy 33(S-7): 76~80, 1985
- 9) 津村光義, 佐藤敬喜, 采 猛, 立沢晴男: 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
- 10) 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 熊野克彦, 恒田礼子, 金山淳子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤T-3262の体内濃度測定法。Chemotherapy 36(S-9): 137~142, 1988

Methods for the bioassay and high-performance liquid chromatography of grepafloxacin in body fluids

Fumie Mukai, Kazunori Ohmori, Hisashi Tamaoka and Mikio Kikuchi

Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

Hitoshi Akiyama and Masaaki Odomi

Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

A microbiological assay procedure and high-performance liquid-chromatography (HPLC) procedure have been developed for determining grepafloxacin (GPFX) in human plasma and urine.

In the bioassay method drug concentrations were determined by the thin-layer cup method, using *Bacillus subtilis* ATCC6633 as the test strain and nutrient agar as the test medium. Calibration curves of GPFX were made in human plasma and 1/15M phosphate buffer (P.B.) pH 7.4 for plasma samples and in 1/15M P.B. pH 7.0 for urine samples. The lowest detectable concentration of GPFX by the method was 0.012~0.025 $\mu\text{g/ml}$.

In HPLC GPFX was extracted from plasma and urine by chloroform. The extracts were analyzed using a reverse-phase analytical column and detected by the fluorescence method. The intra-assay coefficient of variation for plasma was less than 4.6% at 0.01~1.00 $\mu\text{g/ml}$ and less than 3.5% at 0.025~5.00 $\mu\text{g/ml}$, whereas for diluted urine it was less than 4.0% at 0.25~50.00 $\mu\text{g/ml}$. Plasma and urine samples in phase I studies were analyzed by HPLC and the bioassay method. A good correlation was observed between them.