

## 新規ニューキノロン系合成抗菌薬balofloxacinのHPLCを用いた ヒト生体試料中の定量法

寺尾公男・宇津 恵・西宮智子・湯谷義人・大澤康次・羽田正利・福島政文・蒲池信一  
中外製薬株式会社技術本部試験研究センター\*

新規のニューキノロン系合成抗菌薬であるbalofloxacin (BLFX) (±)-1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methylaminopiperidin-1-yl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid dehydrate: HPLCによる高感度定量法を確立した。

BLFX未投与ヒト生体試料を100mMリン酸緩衝液(pH7.4)を用いて希釈し、内部標準物質を加えた後ジクロロメタンを用い有機溶媒抽出を行った後、HPLC移動相に溶解し測定に供した。検量線の作成には、血清、血漿および尿はBLFX未投与試料を用い、他の試料についてはリン酸緩衝液を用いた。その結果、検量線は0.01 $\mu$ g/ml~1.0 $\mu$ g/mlの範囲で良好な直線性が得られた。また、再現性は各々の試料についてBLFX濃度が0.05, 0.5 $\mu$ g/mlの添加試料を用い検討したところ日内変動、日間変動ともに0.61~15.48%であり良好であった。今回確立した定量法は、正確かつ精度が良好であり、操作が簡便であるため、ヒト生体試料中の濃度測定に有用であると考えられた。

**Key words :** new quinolone, balofloxacin, concentration, HPLC

Balofloxacin (BLFX)は中外製薬株式会社で創薬された新規のニューキノロン系合成抗菌薬である。本剤は、グラム陰性菌からグラム陽性菌まで幅広い抗菌スペクトラムを有し、かつ強い殺菌活性を示す。特に*Staphylococcus aureus*や*Streptococcus pneumoniae*を含むグラム陽性球菌や偏性嫌気性菌の他、*Mycoplasma pneumoniae*や*Chlamydia trachomatis*などの特殊な病原微生物に対しても優れた殺菌活性を示す<sup>1,2)</sup>。

BLFXの体内動態について解析するためには、濃度測定の対象となる生体試料は、血清、血漿、尿、唾液、喀痰、胆汁、糞、前立腺液、組織および皮膚など多岐にわたるため、HPLCによる本剤の定量法を確立する必要がある。そこで、今回数種類の前処理法および定量法を確立したので報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用薬剤

BLFXおよび内部標準物質Q-36は中外製薬株式会社で合成されたものを使用した。これら化合物の化学構造をFig. 1に示した。

#### 2. 使用試薬

ジクロロメタンは和光純薬工業(株)(大阪)の試薬特級、アセトニトリルはナカライテスク(株)(京都)HPLC用および他の試薬については試薬特級品を用いた。

#### 3. 標準溶液

BLFX標準品約1mgを正確に量り、100mMリン酸緩衝液(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4)を用いて10 $\mu$ g/ml標準原液

を調製した。この標準原液をリン酸緩衝液を用いて希釈し0.01, 0.05, 0.1, 0.5および1 $\mu$ g/ml標準溶液を調製した。

内部標準物質Q-36はBLFXと同様に標準原液を調製した後、0.5 $\mu$ g/ml標準溶液を調製した。

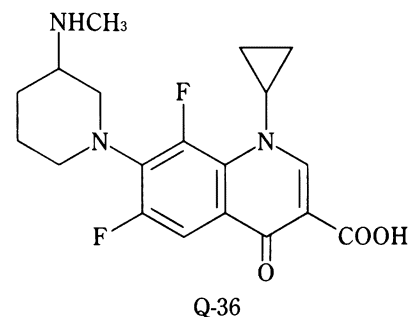
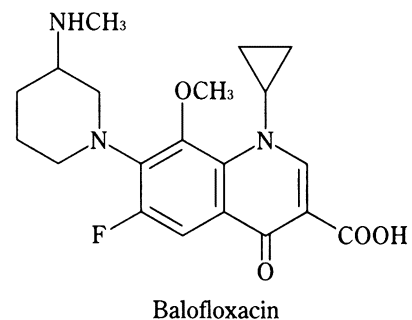


Fig. 1. Structure of balofloxacin and Q-36.

#### 4. 生体試料中BLFX定量法の検討

血清, 血漿, 尿および唾液中のBLFXの定量法の検討は, BLFX未投与のそれぞれの生体試料を用いて行い, 標準溶液調整においてもこれらの生体試料を用いた。他の生体試料中のBLFXの定量法の検討では, BLFX未投与の生体試料が入手困難なため, 標準溶液調整にあたっては100mMリン酸緩衝液を使用した。以下に確立した方法を述べる。

##### 4-1. HPLC条件

カラムにYMC AM-301-3 ((株)YMC, 京都) (4.6mm ID×100mm L)を用い, 移動相に水:アセトニトリル:トリエチルアミン=81:19:1 (V/V), pH4.5を用い, 流速1.0ml/min, 温度は室温にて分析を行った。検出にはF-1000蛍光検出器((株)日立製作所, 東京)を用い, 励起波長295nm, 蛍光波長500nmにて測定を行った。オートサンプラーにWISP 710B (Millipore-Waters), ポンプはLC-9A ((株)島津製作所, 京都), クロマトパックはC-R6A ((株)島津製作所)を用いた。

皮膚中BLFXの定量法のHPLC条件として, カラムにFluofix column (ネオス(株), 神戸) (4.6mm ID×150mm L)を用い, 移動相に水:アセトニトリル:トリエチルアミン=85:15:1 (V/V), pH4.5を用いた。流速, 温度並びに検出方法は, 血漿中BLFX定量法と同様にした。

##### 4-2. 血清, 血漿および尿等の液状試料の前処理法

液状の試料については下記の操作(4-5)で希釈し, 測定用試料とした。得られた測定用試料に内部標準物質としてQ-36 (0.5 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ lを添加し, 攪拌後ジクロロメタン5.0mlを加えて振盪し, 遠心分離した後有機溶媒層を分取した。有機溶媒層を濃縮乾固の後にHPLC移動相100 $\mu$ lに溶解し, 20 $\mu$ lをHPLCに注入した。これら一連の操作法をChart 1に示した。

##### 4-3. 喀痰, 糞および組織等の前処理法

喀痰, 糞, 組織等の試料は, 秤量後それぞれに一定量の割合のリン酸緩衝液を加え, ポリトロンを用いて充分ホモジナイズ後, 遠心分離を行い上清を分取し, 測定用試料とし, 以後の操作を血漿中BLFXの定量法に準じて行った。

##### 4-4. 胆汁中BLFXグルクロン酸抱合体の脱グルクロン酸処理<sup>3)</sup>

胆汁中にはBLFXの代謝物の1つであるBLFXグルクロン酸抱合体の存在が知られているため, BLFXグルクロン酸抱合体濃度測定についても検討を行った。

胆汁中BLFXの定量は, 血漿中BLFXの定量法に準じて行い, 得られた値をフリーのBLFX濃度とした。BLFXグルクロン酸抱合体の定量は, 希釈した胆汁100 $\mu$ lに3N NaOH 100 $\mu$ lを添加し, 室温にて30分間放置して脱グルクロン酸操作を行い, 3N HCl 100 $\mu$ lおよび0.5Mリン酸緩衝液100 $\mu$ lを添加し, 以後の操作を血漿中

BLFXの定量法に準じて行った。この操作で得られたBLFX濃度とフリーのBLFX濃度の差を, BLFXグルクロン酸抱合体濃度とした。これら一連の操作法をChart 1に示した。

##### 4-5. 生体試料の希釈倍率

測定する生体試料の希釈は, 100mMリン酸緩衝液を用いて行った。希釈倍率は, 生体成分の影響ならびに検量線の範囲を考慮し, 血清, 血漿, 唾液および胆汁等の液状の試料は10倍希釈(V/V)とした。尿については, BLFX濃度が高いことを考慮して1000倍希釈(V/V)とした。喀痰, 糞および組織等の試料の希釈倍率は10倍(W/V)とした。検量線を超える濃度を示した試料については適宜希釈倍率を変更した。

##### 4-6. 皮膚中BLFXの定量法

皮膚約0.1gを正確に量り, 1N NaOH 0.5mlを加えて80 $^{\circ}$ C 30分間加熱して皮膚の可溶化を行った。1N HCl 0.5mlおよび0.5Mリン酸緩衝液0.3mlを添加し, 以後の操作を血漿中BLFXの定量法に準じて行った。一連の操

Diluted serum, plasma, urine or liquid fluids  
(100  $\mu$ l)

Bile (treated with dehydrolysis)  
(100  $\mu$ l)

added 100  $\mu$ l of 3 N NaOH  
stand for 30 min  
added 100  $\mu$ l of 3 N HCl  
added 100  $\mu$ l of 0.5 M phosphate buffer

Sputum, feces and tissues

added 9 vol. of  
phosphate buffer  
homogenized  
centrifuged at  
3,000 rpm for  
10 min

sup (100  $\mu$ l)

added 100  $\mu$ l of phosphate buffer  
added 100  $\mu$ l of IS  
added 5.0 ml of dichloromethane  
shaked 10 min  
centrifuged at 3,000 rpm for 10 min

Organic layer

dry up  
dissolved with 100  $\mu$ l of HPLC mobile phase

Injected 20  $\mu$ l for HPLC

Chart 1. Procedure of treatment methods of various samples

作法をChart 2に示した。

#### 4.7. 正確性と再現性の検討

今回確立した定量法の正確性および再現性を確認するため、各々の定量法についてBLFX濃度が0.05, 0.5 $\mu$ g/mlになるように調製した添加試料を用い、日内変動(n=7)および日間変動(n=3)の検討を行った。

#### 5. ヒト生体試料中での安定性

BLFXを血清および唾液中濃度が2 $\mu$ g/ml, 尿中濃度が20 $\mu$ g/mlになるように調製した試料を用い-20 $^{\circ}$ C(6ヵ月間), 4 $^{\circ}$ C(3日間), 室温(1日)の安定性について検討した。

## II. 結 果

### 1. HPLC条件の検討

入手可能なBLFX未投与生体試料として、血清、血漿および尿について生体試料由来の夾雑成分の影響を確認したところ、Fig. 2に示すように定量に影響を与える妨害ピークは認められなかった。

皮膚中BLFXのHPLC条件の検討においては、ヒト皮膚の代用としてラット皮膚を用いた基礎検討では生体試

Skin (0.1 g)

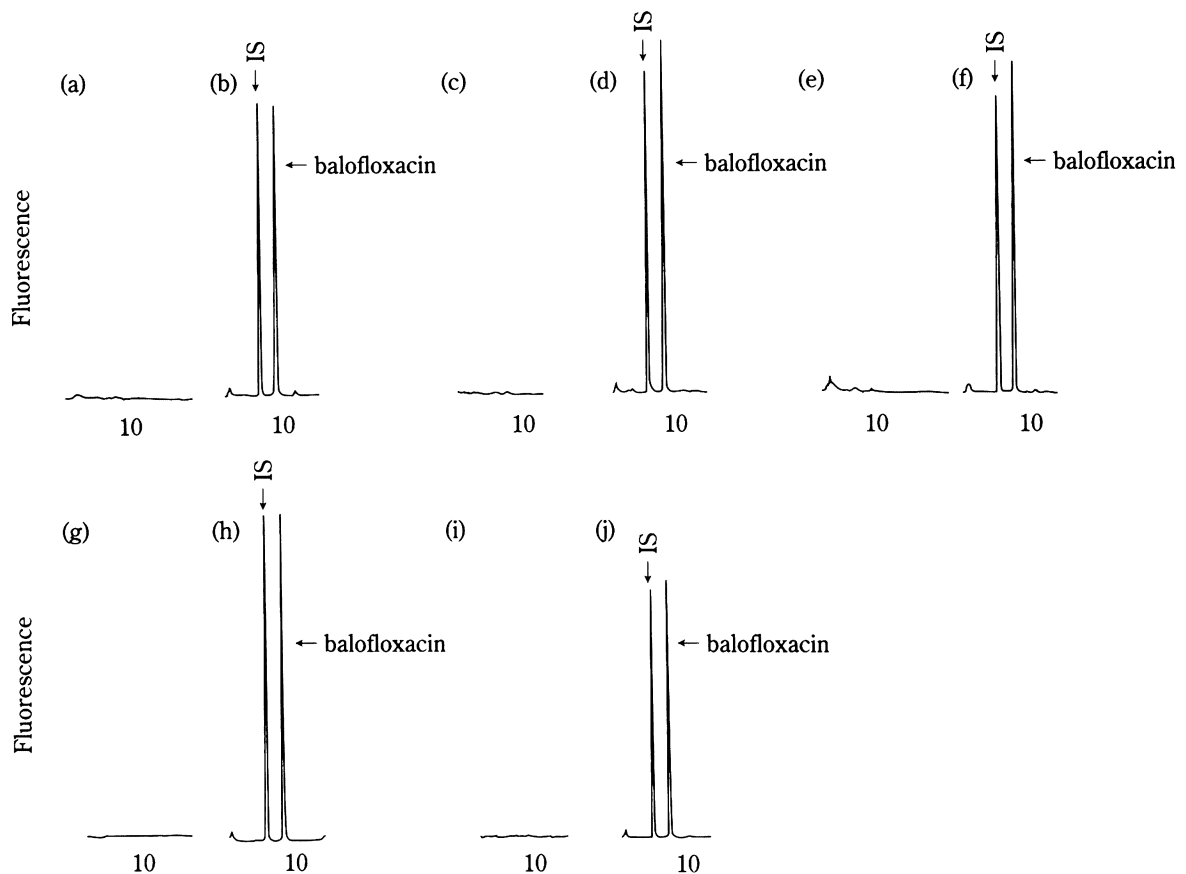
added 0.5 ml of 1 N NaOH  
incubated at 80  $^{\circ}$ C for 30 min  
added 0.5 ml of 1 N HCl  
added 0.3 ml of 0.5 M phosphate buffer  
added 100  $\mu$ l of IS  
added 5.0 ml of dichloromethane  
shaked 10 min  
centrifuged at 3,000 rpm for 40 min

Organic layer

dry up  
dissolved with 100  $\mu$ l of HPLC mobile phase

Injected 20  $\mu$ l for HPLC

Chart 2. Procedure of treatment methods of human skin



IS : internal standard

- (a) Blank serum (b) Serum spiked with balofloxacin (0.1  $\mu$ g/ml) and IS (c) Blank plasma (d) Plasma spiked with balofloxacin (0.1  $\mu$ g/ml) and IS (e) Blank urine (f) Urine spiked with balofloxacin (0.1  $\mu$ g/ml) and IS (g) Blank phosphate buffer (h) Phosphate buffer spiked with balofloxacin (0.1  $\mu$ g/ml) and IS (i) Blank phosphate buffer treated with dehydrolysis (j) Phosphate buffer spiked with balofloxacin (0.1  $\mu$ g/ml) and IS treated by alkaline solution

Fig. 2. HPLC chromatograms of balofloxacin in various solution.

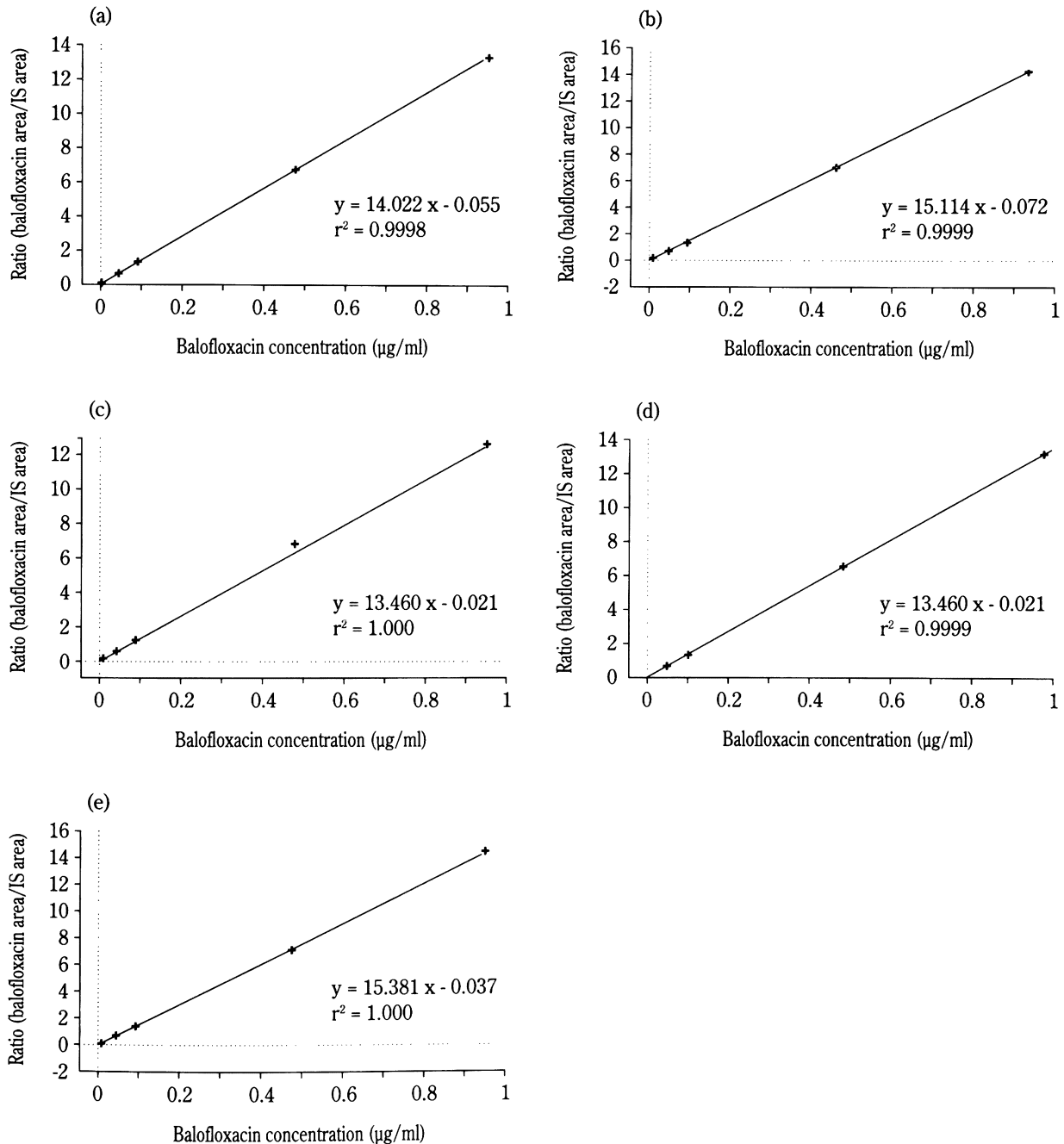
料による妨害ピークが認められた。この夾雑成分とBLFXを分離するために前処理法およびHPLCカラムを各種用いて検討を行ったが、分離できなかった。そこで、パーフルオロアルカンをリガンドに持つFluofix columnで検討したところ、夾雑成分とBLFXとが分離可能であった。ヒト皮膚においても同様な夾雑成分が溶出する可能性があることからこのカラムを用いることにした。

## 2. 検量線および感度

確立した定量法の検量線と感度について検討した。

BLFXを100mMリン酸緩衝液で溶解、調製した標準溶液(0.01, 0.05, 0.1, 0.5および1 $\mu$ g/ml)を用い測定に供した。得られたクロマトグラムのBLFXと内部標準物質のピーク面積比を用いて最小二乗法により検量線を作成した。

上記の方法に従ってBLFXを添加した血漿を用い調製した標準溶液の検量線をFig. 3に示した。尿、リン酸緩衝液および脱グルクロン酸処理を行ったそれぞれの標準溶液の検量線をFig. 3に示した。これら相関係数( $r^2$ )は



(a) serum (b) plasma (c) urine (d) phosphate buffer (e) bile treated by alkaline solution

Fig. 3. Calibration curves of balofloxacin.

いずれも0.9998以上であり、良好な直線性を示した。

なお、検量線の範囲は、 $0.01\mu\text{g/ml}$ ～ $1\mu\text{g/ml}$ であり、検出限界は、 $0.001\mu\text{g/ml}$ であった。

### 3. 正確性および再現性の検討

再現性は日内変動 ( $n=7$ ) および日間変動 ( $n=3$ ) について調べた (Table 1)。その結果、血清での日内変動および日間変動のそれぞれの変動係数は、 $1.06\sim 2.58\%$ 、 $0.61\sim 3.08\%$ であった。血漿では、日内変動係数と日間変動係数は各々 $1.81\sim 2.16$ と $3.16\sim 12.18\%$ であり、血清および血漿の間に精度の差は認められなかった。尿においてBLFX濃度が $0.5$ 、 $0.05\mu\text{g/ml}$ の添加試料に対して日内変動係数と日間変動係数は各々 $4.89\sim 2.05$ と $2.82\sim 8.02\%$ であった。水溶液では日内変動と日間変動は各々 $1.77\sim 1.35$ と $1.92\sim 1.99\%$ であった。また、BLFXグル

クロン酸抱合体の定量法における脱グルクロン酸処理を行ったときの日内変動係数と日間変動係数は $0.75\sim 1.76$ と $3.94\sim 15.48\%$ であった。このように良好な再現性が確認された。

また、BLFX添加濃度 ( $0.05$ 、 $0.5\mu\text{g/ml}$ ) に対して測定値は各々の添加量に対して $86\sim 106\%$ の回収率が得られ、正確性のある定量法であることがわかった。

### 4. 生体試料中での安定性

血清、唾液および尿中でのBLFXの安定性を検討した結果、各々の試料について調製時のBLFX濃度を $100\%$ として各保存条件および保存期間における試料中BLFXの残存率を調べた (Table 2)。この結果からBLFXは少なくとも $-20^\circ\text{C}$ 保存下で6ヵ月、 $4^\circ\text{C}$ で3日、室温でも1日は安定であることを確認した。

Table 1. Precision in various HPLC methods for determination of balofloxacin in human fluids

	Sample	Balofloxacin concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )		STD	CV (%)
		Added	Mesured		
Inter-day ( $n=3$ )	Serum	0.050	0.043	0.001	3.08
		0.500	0.480	0.003	0.61
	Plasma	0.050	0.043	0.005	12.18
		0.500	0.530	0.011	2.16
	Urine	0.050	0.048	0.004	8.02
		0.500	0.497	0.011	2.05
	Phosphate buffer	0.050	0.048	0.001	1.99
		0.500	0.492	0.007	1.35
	Bile treated by alkaline solution	0.050	0.048	0.002	3.94
		0.500	0.503	0.004	0.75
Intra-day ( $n=7$ )	Serum	0.050	0.044	0.001	2.58
		0.500	0.474	0.005	1.06
	Plasma	0.050	0.049	0.002	3.16
		0.500	0.525	0.010	1.81
	Urine	0.050	0.045	0.001	2.82
		0.500	0.499	0.024	4.89
	Phosphate buffer	0.050	0.048	0.001	1.92
		0.500	0.514	0.009	1.77
	Bile treated by alkaline solution	0.050	0.047	0.007	15.48
		0.500	0.516	0.009	1.76

Table 2. Stability of balofloxacin in human fluids

Stock condition	Residual (%)		
	serum	urine	salive
Initial	100	100	100
$-20^\circ\text{C}$ for 1 month	98.1	102.4	103.5
$-20^\circ\text{C}$ for 3 months	102.4	100.5	97.5
$-20^\circ\text{C}$ for 6 months	100.5	103.4	99.0
$4^\circ\text{C}$ for 1 day	95.7	102.9	102.0
$4^\circ\text{C}$ for 3 days	97.6	98.5	104.0
Room temperature for 1 day	103.9	102.0	105.0

Balofloxacin concentration:  $2\mu\text{g/ml}$  in serum and salive,  $20\mu\text{g/ml}$  in urine

### Ⅲ. 考 察

操作が簡便であり、分離能および選択性に優れたヒト生体試料中BLFX定量法を確立した。BLFXは他のニューキノロン薬と同様に蛍光を有し、特に酸性条件下での蛍光量子収率が大きく、この特性を用いることにより高感度で選択的な検出が可能であった。また、確立したHPLCを用いた定量法はBioassay法との高い相関性を示すことがヒト血清および尿において確認されている<sup>4)</sup>。

BLFX未投与生体試料(血清、血漿および尿)中の夾雑成分の影響を検討したが、特に問題となるピークは認められず、確立したHPLC条件でBLFXを選択的に定量できることを確認した。BLFXの有効薬効濃度が*in vitro*で0.4 $\mu$ g/ml以上あれば十分であることから、多くの生体試料は10倍程度の希釈をし、測定試料とすることにした。定量限界濃度は希釈後の試料中濃度として0.01 $\mu$ g/mlとすることで十分と考えられたので、正確性および精度も良好であった。今回確立したヒト生体試料中BLFXの定

量法は臨床試験への適応の有用性が示唆された。

### 文 献

- 1) Ito T, Otsuki M, Nishino T: *In vitro* antibacterial activity of Q-35, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1708~1714, 1992
- 2) Gohara Y, Arai S, Akashi A, Kuwano K, Tseng Cheng-Chuang, Matsubara S, Matsumoto M, Furudera T: *In vitro* and *in vivo* activities of Q-35, a new fluoroquinolone, against *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1826~1830, 1993
- 3) Nokogawa T, Ishigai M, Hiramatsu Y, Kinoshita H, Ishitani Y, Okazaki A: *Arzneim-Forsch/Drug-res.*
- 4) 郷司 憲, 吉橋久男, 森 聖一, 金丸寿美子, 久保寺美典, 寺田勝秀, 斉藤仁俊: ニューキノロン系合成抗菌薬balofloxacinの体液内濃度測定法。日化療会誌43(S-5): 90~93, 1995

## Quantitative concentration determination of a newly synthesized quinolone antimicrobial drug, balofloxacin, in human vital specimens by HPLC

Kimio Terao, Megumi Utsu, Tomoko Nishimiya, Yoshito Yuya,  
Yasutsugu Osawa, Masatoshi Haneda, Masafumi Fukushima and Shinichi Kamachi  
Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

41-8, Takada 3-chome, Toshima-ku, Tokyo 171, Japan

A highly-sensitive quantitative method of evaluating a newly synthesized quinolone antimicrobial drug, balofloxacin (BLFX) ( $\pm$ )-1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methylaminopiperidin-1-yl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid dehydrate), in human vital specimens by HPLC was established.

Human vital specimens without BLFX were diluted in 100 mM phosphate buffered solution (pH 7.4). After an internal standard had been added, organic solvent extraction was performed with dichloromethane. The resultant was dissolved in the mobile phase of HPLC for the concentration determination. A calibration curve was prepared by using serum, plasma and urine samples without BLFX, and phosphate buffered solution was used for other specimens. The calibration curve showed favorable linearity within the range from 0.01  $\mu$ g/ml to 1.0  $\mu$ g/ml. Reproducibility was determined in each of the specimens with BLFX at concentrations of 0.05 and 0.5  $\mu$ g/ml. Both diurnal and daily variations were 0.61~15.48%, showing favorable results. The quantitative concentration determination method established is precise and has the favorable accuracy. It was also procedurally easy, suggesting that this method could be useful for the determination of concentrations in human vital specimens.