

新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin の 高速液体クロマトグラフィーによる体液内濃度測定法

草嶋久生・草川 元・石田了三・岡村久也

杏林製薬株式会社研究センター*

新キノロン系抗菌薬である gatifloxacin (GFLX) の血漿及び尿中濃度について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法をそれぞれ確立した。血漿についての方法は、カラムスイッチングシステムを用い、BSA-ODS カラムによる on-line 除蛋白と ODS カラムによる分離後に蛍光モニターにより検出するものである。尿についての方法は、ODS カラムによる分離後に蛍光モニターにより検出するものである。血漿及び尿試料は内標準 (AM-1202) を加え混合した後に、その一部を直接 HPLC システムに注入した。これらの方法では、クロマトグラム上において定量の妨害となるブランクピークは認められず、検量線は、血漿で 0.05~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、尿で 0.5~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲でそれぞれ良好な直線性を示した。検出及び定量限界は、血漿でそれぞれ 0.01 及び 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、尿でそれぞれ 0.1 及び 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。測定精度及び真度も良好であった。GFLX は、血漿及び尿、並びにその分析混合試料中で室温で少なくとも 1 日間、血漿及び尿中 -40 $^{\circ}\text{C}$ で少なくとも 3 箇月間、並びに 3 回の凍結・融解繰り返し時に、いずれも安定であった。これらの方法は臨床検体の分析に適用可能であった。本法は、分析操作が迅速かつ簡便であり、クロマトグラム及び測定値の再現性も高いことから、有用な分析法と考えられる。

Key words : gatifloxacin, 高速液体クロマトグラフィー, 体液内濃度, 血漿中濃度, 尿中濃度

Gatifloxacin (GFLX) [(±)-1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid sesquihydrate] (Fig. 1) は、新規のキノロン系抗菌薬である。本薬は、グラム陽性及びグラム陰性好気性菌、嫌気性菌、Mycobacteria などに対し、強力かつ広い抗菌活性を有する¹⁻³⁾。本薬の血清中濃度測定法としては、前処理カラムに polyacrylate カラムを用い on-line 除蛋白処理を行う、全自動カラムスイッチング高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法が既に報告されている⁴⁾。今回我々は、本薬の血漿中濃度測定法として、前処理カラムに BSA-ODS カラムを用いる、さらに繁用性の高い全自動カラムスイッチング HPLC 法を、また尿中濃度測定法として、試料の直接注入による逆相 HPLC 法をそれぞれ確立した。以下に、これらの方法の検討結果を報告する。

I. 実験材料及び方法

1. 標品及び試薬

GFLX (Lot No. G145331 及び G0Z5321 (S)), 内標準として使用した AM-1202 [(±)-1-Cyclopropyl-

7-(3-ethylaminomethyl-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (Fig. 1)] (Lot No. K285314), 並びにヒトにおける代謝物として知られている¹⁾ M-2 (Lot No. K075311) 及び M-3 (Lot No. K135311) (以上, Fig. 1) の標品は、いずれも杏林製薬で合成した。

アセトニトリルは HPLC 用のものを関東化学から、1-オクタンスルホン酸ナトリウムはイオンペアークロマトグラフィー用のものを東京化成からそれぞれ購入した。その他の試薬はいずれも市販の特級品を使用した。ヒトコントロール血漿及び尿はそれぞれ健康成人から採取し、使用時まで -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2. 血漿試料の分析方法

(1) 標準添加血漿の調製

GFLX を無水物として 10.0mg を秤取し、これに 0.1M 塩酸 1mL を加え溶解した後、1/15M Naリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて、100mL とした (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。次にこれを原液として、同じ緩衝液により希釈し、0.10~25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で標準溶液を調製した。さらにこれをコントロール血漿により 10 倍希釈し、標準添加血漿とし

た (濃度 0.01~2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(2) 内標準溶液の調製

AM-1202 3.7mg に 0.1M 塩酸 1mL を加え溶解した後、1/15M Na リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて、100mL とした (濃度 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(3) 前処理

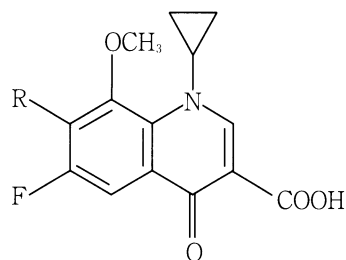
血漿試料 200 μL に内標準溶液 100 μL を加え、ミキサーにより十分に混合した。試料は必要に応じて、コントロール血漿により希釈後に分析操作を行った。

(4) HPLC 条件

HPLC 分析システムを Fig. 2 に示す。

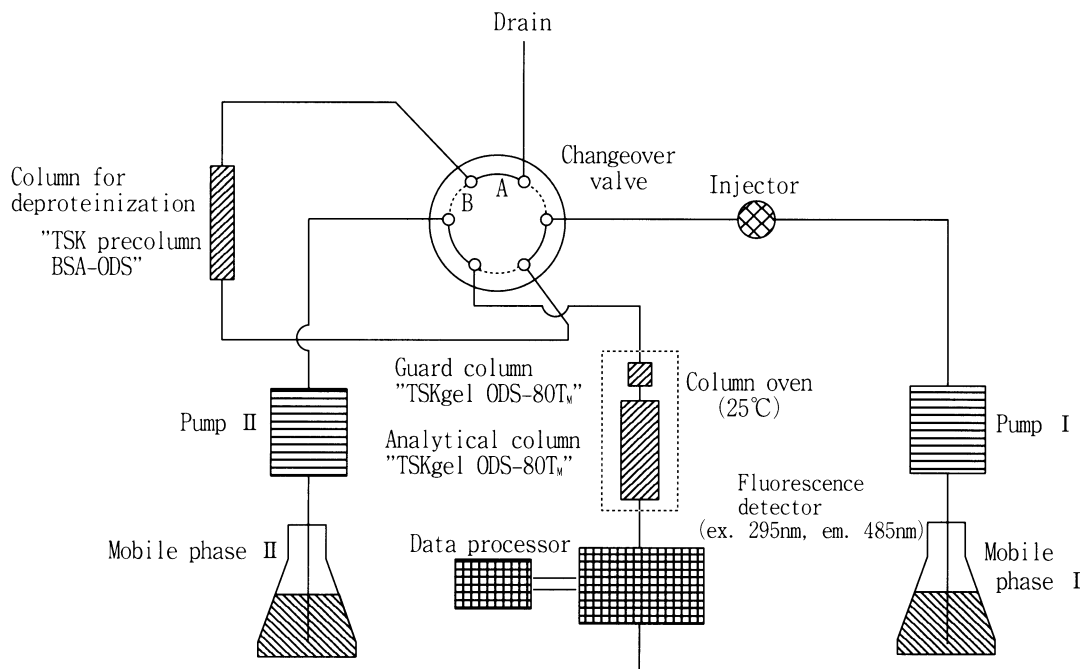
前処理カラムとして、ODS カラムの表面を牛血清アルブミン (BSA) によりコーティングしたカラムである TSK precolumn BSA-ODS (内径 4.6mm × 長さ 35mm, 東ソー) を用いた。また分析カラムとしては TSKgel ODS-80T_v (5 μm , 内径 4.6mm × 長さ 150mm, 東ソー) を用い、これにガードカラムとして TSKgel ODS-80T_w (5 μm , 内径 4.0mm × 長さ 10mm, 東ソー) を装着した。

分析カラムは恒温槽により 25 $^{\circ}\text{C}$ とした。前処理用移動相として、0.02% 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 0.01M リン酸 [I 液] を用いた。一方、分析用移動相



Compound	Substituent (R)
Gatifloxacin	
M-2	
M-3	
AM-1202	

Fig. 1. Chemical structures of gatifloxacin, its metabolites (M-2, M-3), and internal standard (AM-1202).



Time	Changeover valve	Flow rate (mL/min)	
		Pump I	Pump II
0~ 3 min	flow A ———	1.00	1.00
3~ 8 min	flow B (dotted)	0.20	1.00
8~13 min	flow A ———	1.00	1.00

Fig. 2. Schematic diagram of column-switching HPLC system for the determination of gatifloxacin in plasma.

としては、0.02% 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む、アセトニトリル/0.01Mリン酸 (31:69, 容積比) 混液 [II液] を用いた。I液はポンプI (日立L-6200形) により1.0mL/分で送液した。試料 (5 μ L) をオートインジェクター (協和精密KSP-1200形) により注入3分後に、高圧切換バルブ (日立655-0730形) の位置を切り換えると同時に流量を0.2mL/分とし、さらに5分後にバルブの位置を再びもとの位置に戻すと同時に分析終了時まで流量を1.0mL/分とした。この間、II液はポンプII (日立L-6000形) により1.0mL/分で送液した。検出は、励起及び蛍光波長をそれぞれ295及び485nmに設定した蛍光検出器 (日立F-1000形) により行い、その出力をクロマトデータ処理装置 (日立D-2500形またはD-2000形) により記録した。

3. 尿試料の分析方法

(1) 標準添加尿の調製

GFLXを無水物として25.0mgを秤取し、これに精製水及び1M塩酸1滴を加え溶解した後、さらに精製水を加えて10mLとした (2,500 μ g/mL)。次にこれを原液として、精製水により希釈し、1.0~2,500 μ g/mLの濃度範囲で標準溶液を調製した。さらにこれをコントロール尿により10倍希釈し、標準添加尿とした (濃度0.1~250 μ g/mL)。

(2) 内標準溶液の調製

AM-1202 5.0mgに0.01M塩酸を加えて溶解し、50mLとした (濃度100 μ g/mL)。

(3) 前処理法

尿試料100 μ Lに、0.01M塩酸0.4mL及び内標準溶液0.5mLを加え、ミキサーにより十分に混合した。試料は必要に応じて、精製水により希釈後に分析操作を行った。

(4) HPLC条件

分析カラムとしてTSKgel ODS-80T_M (5 μ m, 内径4.6mm×長さ150mm) を用い、これにガードカラムとしてTSKgel ODS-80T_M (5 μ m, 内径4.0mm×長さ10mm) を装着した。移動相としては、0.02% 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む、アセトニトリル/0.01Mリン酸 (25:75, 容積比) 混液を用い、流速1.0mL/分で送液した。分析カラムは恒温槽により40℃とした。試料 (3 μ L) をオートインジェクターにより注入した後、励起及び蛍光波長をそれぞれ295及び485nmに設定した蛍光モニターにより検出した。その出力は、クロマトデータ処理装置により記録した。HPLCシステムは、血漿の分析時と同一の装置を使用した。

4. 解析方法

検量線は、標準試料の添加薬物濃度とクロマトグラム上におけるGFLXの内標準に対するピーク高さ比 (×100) から最小二乗法により求めた。ついで、これら検量線から血漿及び尿中GFLX濃度を算出した。

5. 分析法の臨床検体への適用

健常成人男子志願者にGFLX 200mgを単回経口投与し、採取された血清及び尿試料について、上記の方法に

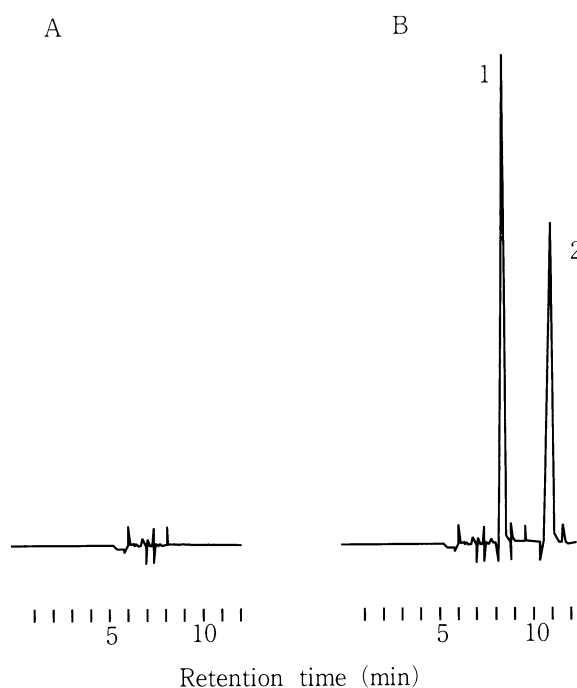


Fig. 3. Representative chromatograms of control plasma [A], and plasma spiked with gatifloxacin (1.00 μ g/mL) and internal standard [B]. Peak 1: gatifloxacin; Peak 2: internal standard (AM-1202)

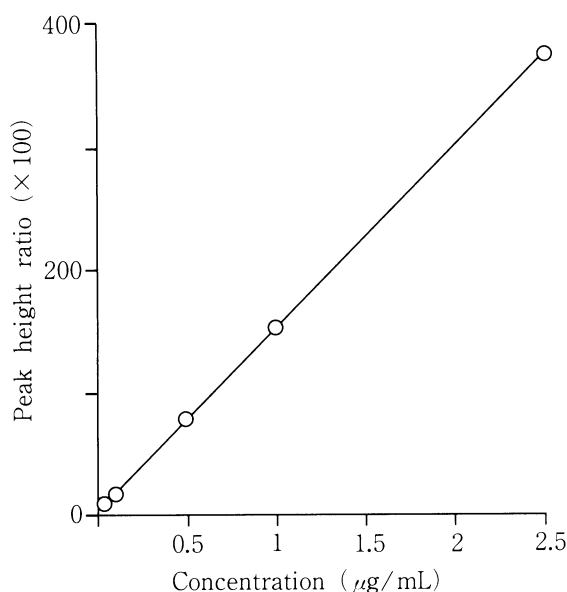


Fig. 4. Calibration curve for the determination of gatifloxacin in plasma.

$$X (\mu\text{g/mL}) = Y/150 - 0.0045 \quad (r = 1.000)$$

より未変化体濃度を測定した。

II. 結 果

1. 血漿試料の分析

(1) 選択性, 検量線及び検出限界

コントロール血漿, 並びにGFLX及び内標準を添加した血漿についての代表的クロマトグラムをFig. 3に示す。クロマトグラム上において, 未変化体の定量の妨害となる生体由来のブランクピークは認められなかった。次に, 代表的検量線をFig. 4に示す。検量線は原点を通り, 良好な直線性 ($r=1.000$) を示した。検出限界は $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ (S/N比2以上) であった。

(2) 測定精度及び真度, 定量限界

日内及び日間再現性をTable 1に示す。 $0.05 \sim 2.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で, 日内の測定精度は $2.4 \sim 6.3\%$, 真度は $-8.0 \sim +1.5\%$, 日間の測定精度は $2.4 \sim 12\%$, 真度は $-1.2 \sim +4.0\%$ であり, 良好な再現性を示した。定量限界は $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

(3) 安定性

血漿試料及びその分析試料中におけるGFLXの安定性をTable 2に示す。GFLXは, 血漿試料中において室温で1日間, -40°C においては3箇月, 並びに凍結・融解

の繰り返し3回後においてそれぞれ安定であった。一方, 分析混合試料中において, 室温で1日間は安定であった。

2. 尿試料の分析

(1) 選択性, 検量線及び検出限界

コントロール尿, 並びにGFLX及び内標準を添加した尿についての代表的クロマトグラムをFig. 5に示す。クロマトグラム上において, 未変化体の定量の妨害となる生体由来のブランクピークは認められなかった。また未変化体及び内標準のクロマトグラム上における保持時間がそれぞれ6.8及び13.8分の時, 2種の尿中代謝物M-2及びM-3のそれは, それぞれ4.3及び5.2分であった。次に, 代表的検量線をFig. 6に示す。検量線は原点を通り, 良好な直線性 ($r=1.000$) を示した。検出限界は $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (S/N比2以上) であった。

(2) 測定精度及び真度, 定量限界

日内及び日間再現性をTable 3に示す。 $0.5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で, 日内の測定精度は $0.9 \sim 2.5\%$, 真度は $-12 \sim -0.4\%$, 日間の測定精度は $0.8 \sim 14\%$, 真度は $-2.0 \sim +12\%$ であり, 良好な再現性を示した。定量限界は $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

(3) 安定性

尿試料及びその分析試料中におけるGFLXの安定性を

Table 1. Precision and accuracy of the assay of gatifloxacin in plasma

Concn added ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concn found ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Precision (%)	Accuracy (%)
Intra-day (n=5)			
0.050	0.046 ± 0.0012	2.6	-8.0
0.100	0.095 ± 0.0026	2.7	-5.0
0.500	0.498 ± 0.012	2.4	-0.4
1.00	1.005 ± 0.031	3.1	+0.5
2.50	2.537 ± 0.160	6.3	+1.5
Inter-day (n=3)			
0.050	0.052 ± 0.0062	12	+4.0
0.100	0.100 ± 0.0051	5.1	0.0
0.500	0.500 ± 0.012	2.4	0.0
1.00	0.988 ± 0.032	3.2	-1.2
2.50	2.516 ± 0.071	2.8	+0.6

a) Each value represents the mean and SD.

Table 2. Stability of gatifloxacin in plasma and its analytical mixture

Sample	Condition	Residual %	
		$0.50 \mu\text{g}/\text{mL}^{\text{a)}$	$2.50 \mu\text{g}/\text{mL}^{\text{a)}$
Plasma	R. T. ^{b)} , 1 day	98.7 ± 2.3	96.1 ± 1.3
Plasma	-40°C , 1 month	99.3 ± 1.2	97.3 ± 0.5
	-40°C , 3 months	97.3 ± 2.3	98.1 ± 1.5
Plasma	After 3 freeze-thaw cycles	99.3 ± 1.2	98.0 ± 3.5
Analytical mixture	R. T. ^{b)} , 1 day	95.3 ± 3.1	99.6 ± 0.4

Each value represents the mean and SD (n=3).

a) Initial concentrations of gatifloxacin in plasma

b) R. T.= room temperature

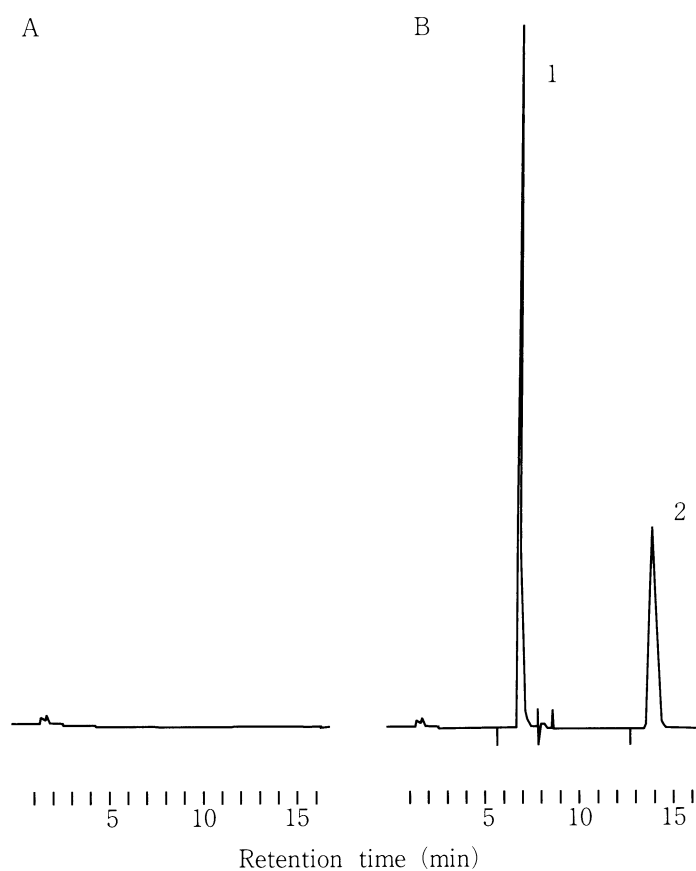


Fig. 5. Representative chromatograms of control urine [A], and urine spiked with gatifloxacin (50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and internal standard [B]. Peak 1: gatifloxacin; Peak 2: internal standard (AM-1202)

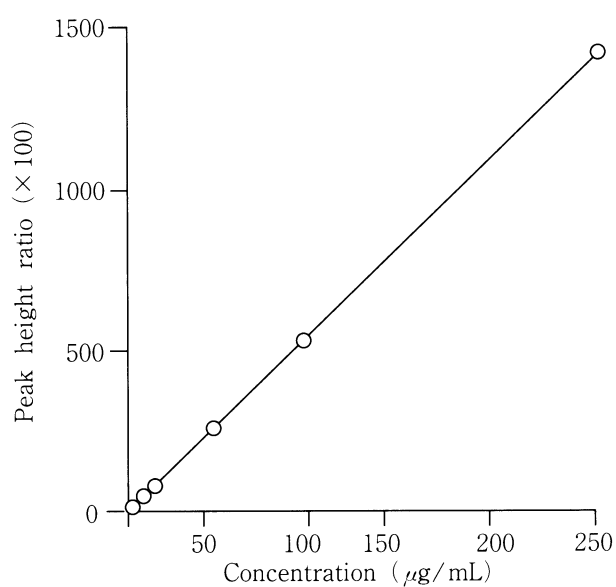


Fig. 6. Calibration curve for the determination of gatifloxacin in urine.

$$X (\mu\text{g}/\text{mL}) = Y/5.68 - 0.0283 \quad (r = 1.000)$$

Table 4に示す。GFLXは、尿試料中において室温で1日間、 -40°C においては3箇月、並びに凍結・融解の繰り返し3回後においてそれぞれ安定であった。一方、分析混合試料中において、室温で1日間は安定であった。

3. 分析法の臨床検体への適用

GFLX 200mgを健常成人に単回経口投与し、血清及び尿中濃度を上記の方法により測定した。それぞれについての代表的クロマトグラムをFig. 7に示す。クロマトグラム上において、生体ブランクあるいは代謝物由来のピークは検出されなかった。

III. 考 察

近年、前処理操作の簡便化を目的として、カラムスイッチングによる全自動分析法が、生体試料中薬物濃度の定量に用いられるようになってきている。GFLXの血清中濃度測定法については、既にNakashimaらにより、前処理カラムとしてpolyacrylateカラムを用いる、全自動分析法が報告されている⁴。今回の方法では、内標準を添加し、さらに前処理カラムとしてBSA-ODSカラムを用いることにより、クロマトグラム及び測定値の再現性

を向上させることができた。本法では1試料の分析に要する時間が約13分と短く、ルーチン分析にも十分に耐えるものと考えられた。

一方、尿中濃度測定法では、良好な測定精度がみられた。また、GFLX投与後のヒト尿中には微量の代謝物(M-2, M-3)が存在することが明らかとなっている⁴が、今回の測定条件下では、これら代謝物は未変化体及び内標準と完全に分離し、分析の妨害とはならなかった。

GFLXは、血漿及び尿、並びにその分析混合試料中で室温で少なくとも1日間、血漿及び尿中 -40°C で少なくとも3箇月間、並びに3回の凍結・融解繰り返し時に、いずれも安定であった。したがって通常の分析時には、安定性は全く問題にならないものと推察された。

これらの方法は、本薬200mgを単回投与後に採取された生体試料に適用可能であった。本法はこれまでの方法と同様、臨床検体の測定に適したものであり、さらに再現性の良い結果が得られるものと考えられた。

以上、今回報告した方法は、分析操作が迅速かつ簡便であり、クロマトグラム及び測定値の再現性も高いことから、有用な分析法と考えられる。

Table 3. Precision and accuracy of the assay of gatifloxacin in urine

Concn added ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concn found ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Precision (%)	Accuracy (%)
Intra-day (n = 5)			
0.50	0.44 ± 0.011	2.5	-12
1.0	0.93 ± 0.019	2.0	-7.0
5.0	4.8 ± 0.045	0.9	-4.0
10.0	9.7 ± 0.148	1.5	-3.0
50.0	49.2 ± 0.43	0.9	-1.6
100	99.3 ± 1.30	1.3	-0.7
250	249 ± 2.17	0.9	-0.4
Inter-day (n = 3)			
0.50	0.56 ± 0.076	14	+12
1.0	0.99 ± 0.064	6.5	-1.0
10.0	9.8 ± 0.12	1.2	-2.0
100	99.4 ± 0.79	0.8	-0.6
250	250 ± 2.65	1.1	0.0

a) Each value represents the mean and SD.

Table 4. Stability of gatifloxacin in urine and its analytical mixture

Sample	Condition	Residual %	
		50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{a)}	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{a)}
Urine	R.T. ^{b)} , 1 day	103.6 ± 2.6	104.3 ± 1.9
Urine	-40°C , 1 month	98.3 ± 1.1	101.3 ± 2.5
	-40°C , 3 months	97.8 ± 1.2	101.6 ± 1.1
Urine	After 3 freeze-thaw cycles	97.9 ± 2.0	96.8 ± 0.4
Analytical mixture	R.T. ^{b)} , 1 day	101.0 ± 1.2	98.4 ± 1.4

Each value represents the mean and SD (n = 3).

a) Initial concentrations of gatifloxacin in urine

b) R. T. = room temperature

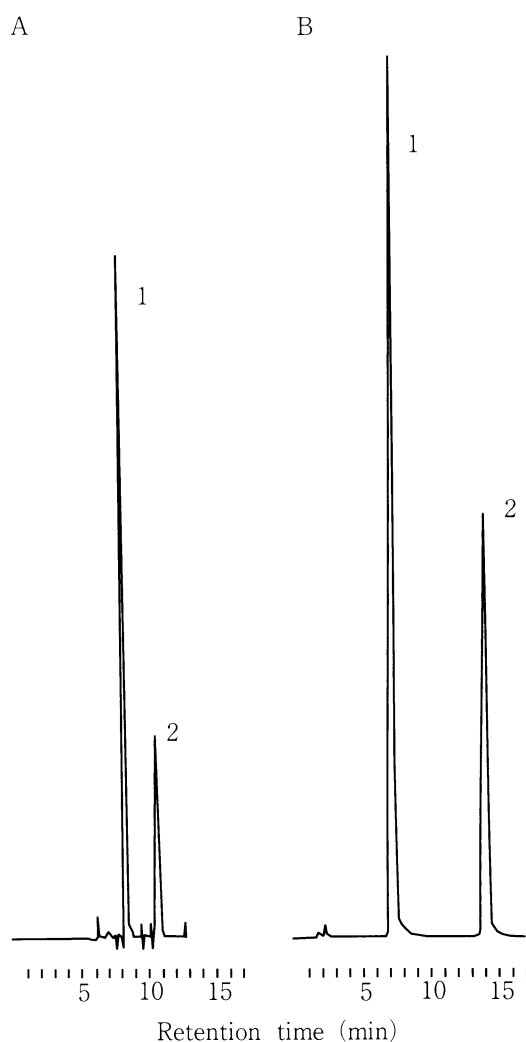


Fig. 7. Representative chromatograms of serum (1h) [A], and urine (2 to 4h) [B] following oral administration of 200 mg of gatifloxacin in healthy humans. Peak 1: gatifloxacin; Peak 2: internal standard (AM-1202)

文 献

- 1) Hosaka M, Yasue T, Fukuda H, et al.: In vitro and in vivo antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2108~2117, 1992
- 2) Tomioka H, Saito H, Sato K: Comparative antimycobacterial activities of the newly synthesized quinolone AM-1155, sparfloxacin, and ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1259~1263, 1993
- 3) Wakabayashi E, Mitsuhashi S: In vitro antibacterial activity of AM-1155, a novel 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 594~601, 1994
- 4) Nakashima M, Uematsu T, Kosuge K, et al.: Single- and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2635~2640, 1995

High-performance liquid chromatographic determination of gatifloxacin, a new quinolone, in biological fluids

Hisao Kusajima, Hajimu Kusakawa, Ryozo Ishida, and Kyuya Okamura

Research Center, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

1848 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun,

Tochigi 329-0114, Japan

We developed high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods for the determination of gatifloxacin (GFLX), a new quinolone, in plasma and urine. The assay method for plasma was based on on-line deproteinization with BSA-ODS column and separation with ODS column, using a column-switching system, followed by detection with fluorescence monitor. The assay method for urine was based on separation with ODS column only, followed by detection with fluorescence monitor.

Plasma and urine samples were directly injected into the HPLC system after addition of the internal standard (AM-1202). The chromatograms exhibited no interfering blank peak. Calibration curves were linear in the concentration ranges of 0.05 to 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.5 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in plasma and urine respectively. The limits of detection and quantification were 0.01 and 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively in plasma, and 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in urine. GFLX was stable for at least 1 day in plasma, urine, and their analytical mixtures at room temperature, and for at least 3 months in plasma and urine, both at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ and after three freeze-thaw cycles. In conclusion, these HPLC methods should be useful for the routine analysis of GFLX in biological fluids because they are rapid and simple, and show excellent reproducibility of the chromatograms and the measured values.