

【短 報】

高速液体クロマトグラフィーによるフルオロキノロン系薬の簡便測定法

荻野 弘美¹⁾・城戸 謙一¹⁾・土屋 雅勇¹⁾・木津 純子¹⁾・堀 誠治²⁾¹⁾国立薬科大学実務薬学講座, ²⁾東京慈恵会医科大学薬理学講座第1*

(平成17年8月29日受付・平成17年9月20日受理)

フルオロキノロン系薬のより効果的な投与法を考えるうえで, pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) 解析が注目されている。PK/PD 解析には, 患者における薬物体内動態パラメーターの推定が必要であり, 対象患者のキノロン系薬血中濃度測定が必須となる。高速液体クロマトグラフィーを用い, システム自身を変更することなく, 検出に用いる蛍光波長(励起波長/蛍光波長)の調整により, 9種類のフルオロキノロン系薬(ciprofloxacin, enoxacin, gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, pazufloxacin, tosufloxacin)の濃度測定を可能とした。また, 本測定法を用い, マウスの gatifloxacin 血中濃度が測定可能であることを確認した。この簡便なフルオロキノロン系薬測定法は, 臨床の場における PK/PD 解析において有用な測定法となることが期待される。

Key words: fluoroquinolone, high performance liquid chromatography

フルオロキノロン系薬(キノロン系薬)は, 広範囲の抗菌スペクトルを有し, かつ強い抗菌活性を示すことから, こんにち最も汎用されている抗菌薬の一つである。近年, キノロン系薬の効果的かつ安全な投与法の決定には, PK/PD (pharmacokinetic/pharmacodynamic) 成績が重要であることが指摘されている^{1,2)}。PK/PD 解析を実施するためには, キノロン系薬の各感染症患者における PK データが必要であり, 臨床現場からの検体のキノロン系薬濃度を, 臨床現場ないしはそのすぐ後方で, 迅速に測定できる測定法が必須である。

キノロン系薬の体内濃度測定法としては, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法^{3,4)}, 全自動カラムスイッチング HPLC 法^{5,6)}, カップ法⁷⁻¹²⁾, ペーパーディスク法^{9,10,13)}, アガーウエル法¹³⁻¹⁵⁾などが報告されている。これらの方法は, 個々のキノロン系薬測定には最適化されていると考えられる。しかし, 実際の臨床現場では, 種類の特定のキノロン系薬のみを使用しているわけではなく, 感染症の病態に応じて, 適切なキノロン系薬が使用されている。したがって, 測定現場では, 数種類のキノロン系薬の濃度を, ほぼ同時に測定可能としておく必要がある。しかし, 多くのキノロン系薬の濃度を, 測定システムに大きな変化を加えることなく測定することが可能となっているものは少ない。今回, 臨床現場に設置されていることの多い HPLC を用いたキノロン系薬測定法である Liang らの方法³⁾に修正を加え, 検出時の測定波長の変更のみで, 臨床で汎用されている多数のキノロン系薬の高感度測定を可能とした。

Ciprofloxacin(CPFX), enoxacin(ENX), gatifloxacin(GFLX), levofloxacin(LVFX), moxifloxacin(MFLX)は LKT Laboratories(MN, USA)より, norfloxacin(NFLX), lomefloxacin(LFLX)は Sigma Chemical Co(MO, USA)より購入した。Pazufloxacin(PZFX), tosufloxacin(TFLX)は富山化学工業株式会社(富山)より供与された。HPLC は, ポンプ L-7100, カラムオープン L-7300, オートサンプラー L-2200, 紫外吸収(UV)検出器 L-4200, 蛍光検出器 L-7485(いずれも HITACHI 製)を使用した。そのシステムは, 以下のとおりである。プレカラム: TSK GUARDGEL ODS-80T_M(7 μm, 東ソー製), 分析カラム: TSK-GEL ODS-80T_M(7 μm, 4.6 mm × 250 mm, 東ソー製), カラム温度: 23 °C, 移動相: 10 mM SDS, 10 mM TBAA を含む 25 mM クエン酸(pH 3.6)とアセトニトリルの混液(57:43, v/v), 流量: 1.0 mL/min。測定波長(励起波長/蛍光波長)を変化させることにより, キノロン系薬測定における HPLC 条件の最適化をはかった。キノロン系薬の濃度は, 内標準物質とのピーク面積比より算出した。

5時間絶食マウス(ddY系, 雄, 6週齢)三協ラボラトリー(東京)の腹腔内に, キノロン系薬として GFLX を投与した。投与後, 経時的にヘパリン加血漿を調製し, 測定まで -80 °C で保存した。HPLC には下記の調整を行った試料を注入した。

試料 50 μL に内標準物質溶液 50 μL, 精製水 300 μL およびジクロロメタン 3 mL を添加して混和し, 1,600 g (4 °C)にて10分間遠心分離した。上層の水層をアスピ

Table 1. HPLC profile for determination of quinolones

Quinolone	Retention (min)	Internal Standard	Optimal Detection Wavelength (nm/nm)	Wavelength (excitation/emission) (nm/nm)			
				245/450	270/420	280/450	293/500
Ciprofloxacin	8.2	gatifloxacin	280/450				×
Enoxacin	6.8	gatifloxacin	270/420	×		×	×
Gatifloxacin	9.6	lomefloxacin	280/450				
Levofloxacin	6.6	gatifloxacin	280/450	×			
Lomefloxacin	8.1	gatifloxacin	280/450	×			
Moxifloxacin	10.3	levofloxacin	293/500	×	×	×	
Norfloxacin	8.2	gatifloxacin	280/450				
Pazufloxacin	6.9	gatifloxacin	245/450		×	×	×
Tosufloxacin	13.5	gatifloxacin	270/420	×		×	×

suitable for determination × not suitable for determination

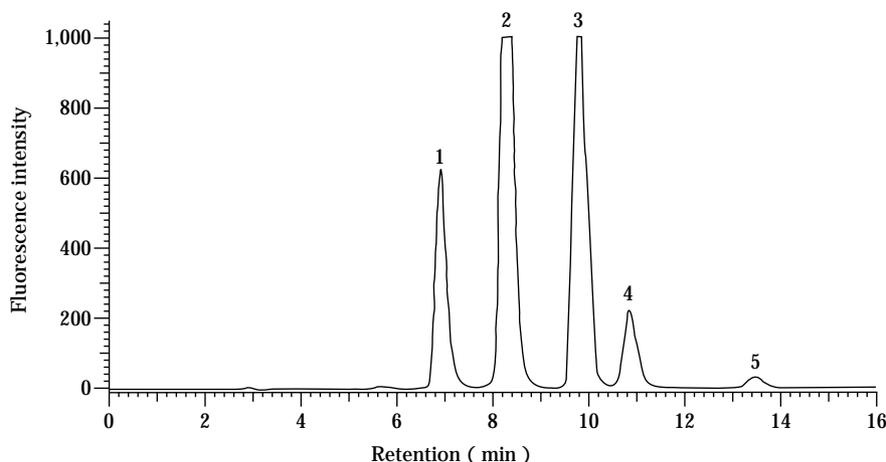


Fig. 1. Chromatogram of mixtures of five authentic quinolones from reverse-phase HPLC. Peaks 1: levofloxacin, 2: lomefloxacin, 3: gatifloxacin, 4: moxifloxacin, 5: tosufloxacin (the amount of each quinolone loaded onto the HPLC was 0.05 ng.)

レーターで除去し、ジクロロメタン層を別の試験管に分取した。40 にて蒸発乾固させた後、移動相 200 μ L を加えて再溶解し、10 分間超音波処理を行った後、10 μ L を HPLC に注入した。コントロール血漿にキノロン系薬の標準品を 3 μ g/mL となるように添加した試料を作製し、内標準物質との比較による回収率を求めた。キノロン系薬投与マウスの血漿を個々に処理して 5 個の試料を作製し、連続して測定して同時再現性を求めた。また、別のマウス血漿を処理して得た同一試料を 4 日間測定し、日差再現性を求めた。

各キノロン系薬について、別のキノロン系薬を内標準物質 (Table 1) として用い、励起および蛍光波長を、245 nm/450 nm, 270 nm/420 nm, 280 nm/450 nm, 293 nm/500 nm (励起/蛍光波長) と変えて測定し、測定波長 (励起波長/蛍光波長) の最適化をはかった。この 4 種類の波長により、9 種類のキノロン系薬の分離・定量が可能であることが認められた (Table 1)。Fig. 1 に、LVFX, LFLX, GFLX, MFLX, TFLX の 5 種類のキノロン系薬の標準品混合液を、280 nm/450 nm で検出したクロマト

グラムを示す。LVFX, LFLX, GFLX が良好に分離され、測定可能であることが認められた。また、Fig. 2 に、マウス腹腔内に GFLX 10 mg/kg 投与 30 分後の血漿のクロマトグラム (内標準物質 LFLX) を示す。GFLX および内標準物質として用いた LFLX は、それぞれ単一のピークとして検出され、これらの検出の妨害となるようなピークは認められなかった。また、本測定条件でコントロール血漿を分析したところ、いずれの波長においてもキノロン系薬の溶出位置に血漿由来のピークは認められなかった。

最適の波長で測定した際に、ENX, LVFX, PZFX, TFLX は 0.05 ~ 2 μ g/mL, GFLX, MFLX は 0.05 ~ 1 μ g/mL, LFLX は 0.05 ~ 0.75 μ g/mL, CPFX は 0.05 ~ 0.45 μ g/mL, NFLX は 0.05 ~ 0.3 μ g/mL の範囲で高い直線性を示した ($r = 0.999 \sim 1.000$)。また、回収率は、CPFX は $57.5 \pm 5.0\%$ (mean \pm S.D., $n = 5$), ENX $45.2 \pm 3.7\%$, GFLX $102.6 \pm 1.0\%$, LVFX $97.9 \pm 1.6\%$, LFLX $74.2 \pm 4.5\%$, MFLX $77.6 \pm 4.4\%$, NFLX $41.7 \pm 2.6\%$, PZFX $39.9 \pm 4.9\%$, TFLX $43.7 \pm 0.9\%$ であった。これらの回収

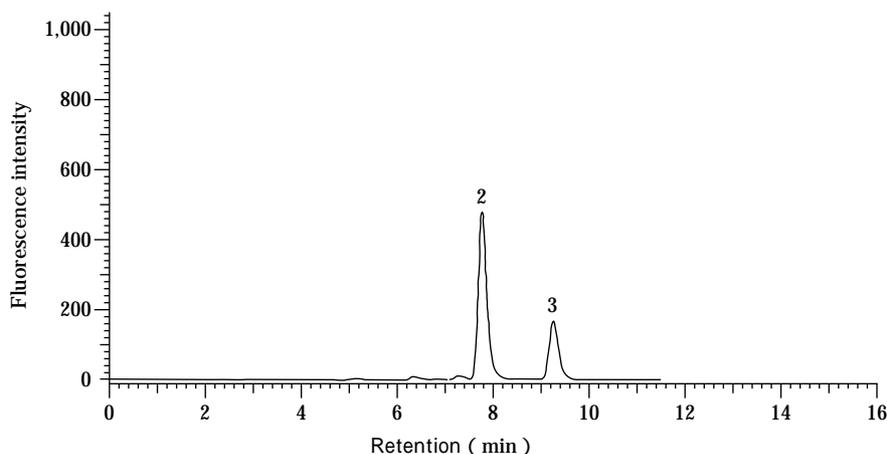


Fig. 2. Chromatogram of mouse plasma prepared from a gatifloxacin-administered mouse. Gatifloxacin was injected intraperitoneally in mice and plasma was prepared 30 minutes after the injection.

Peaks 2: lomefloxacin (I.S.) 3: gatifloxacin

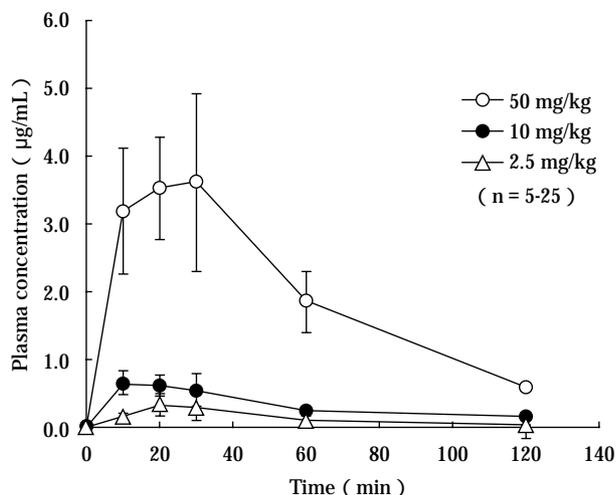


Fig. 3. Time course of gatifloxacin in mice. Gatifloxacin (50, 10, and 2.5 mg/kg) was administered intraperitoneally, and the plasma was prepared as shown in this Figure. The concentration of gatifloxacin in the plasma was measured as mentioned in Materials and Methods.

率は、測定試料の濃度補正に使用した。各キノロン系薬の同時再現性、日差再現性の変動係数はいずれも5%以内と良好であった。

マウスにGFLXを50 mg/kg, 10 mg/kg, 2.5 mg/kg投与し、血漿中GFLX濃度を測定した。いずれの投与群においても血漿中GFLX濃度が測定可能であった。その時間経過をFig. 3に示す。20~30分にピークを有する血漿中濃度時間曲線が得られた。

ここに、キノロン系薬は、感染症治療に際して、最も汎用されている薬物の一つであろう。近年、キノロン系薬の感染症治療効果と、体内動態パラメーターとの相

関性が検討され、そのPK/PD解析から、キノロン系薬の薬物効果は、血中濃度時間曲線下面積(AUC)と原因菌の最小発育阻止濃度(MIC)との比(AUC/MIC)とよい相関のあることが示されている^{1,2,16,17}。キノロン系薬による治療効果を増強するためには、1回投与量を増大させAUC/MICを増大させるのがよいことが示唆され¹⁶、肺炎球菌に対するAUC/MICの目標値は25、グラム陰性桿菌に対しては100~125と考えられている^{1,16}。キノロン系薬を用い感染症を有効に治療するためには、これらの数値を超える必要がある。それゆえ、感染症患者において、投与されているキノロン系薬のAUCを算出ないし推定することが望まれている。

一方、臨床現場においては、キノロン系薬は感染部位・原因菌・組織移行性などをもとに選択され、投与される。したがって、個々の感染症患者に投与されているキノロン系薬は種類が異なっていることが考えられる。そのような条件下で、キノロン系薬の血中濃度を測定し、PK/PD解析を行い、適切な投与量であるか否かを判断するには、汎用されている各キノロン系薬の血中濃度を、迅速かつ簡便に測定できることが必要である。本測定法を用いることにより、HPLCシステムの本体を変更せず、検出に用いる励起波長と蛍光波長の組み合わせを変更することで、複数のキノロン系薬が測定可能であることが明らかとなった。また、マウス血漿中のキノロン系薬濃度測定においても、測定を妨害するピークは認められず、生体資料を用いた場合でも、本測定法は有用であることが示された。キノロン系薬の体内動態パラメーターを推定する方法としてポピュレーション・ファルマコカインティクス(PPK)が用いられている。キノロン系薬によるより効果的な治療を目指すには、これらの手法を用いキノロン系薬の投与法を適正化する必要がある。本測定法

では、HPLC 蛍光検出というどの施設でも設置可能なシステムを用いており、さらに、測定条件の変更のみで多くのキノロン系薬の濃度測定に対応できることから、実際の臨床現場と直結した濃度測定が可能となると考えられる。今後、キノロン系薬適正使用に際して、有用な測定手段となることが期待される。

文 献

- 1) 戸塚恭一: PK/PD 分析による抗菌薬評価の現状と展望。月間薬事 46: 2127 ~ 2131, 2004
- 2) Nicolau D P: Optimizing outcome with antimicrobial therapy through pharmacodynamic profile. J Infect Chemother 9: 292 ~ 296, 2003
- 3) Liang H, Kays M B, Sowinski K M: Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. J Chromatography B 772: 53 ~ 63, 2002
- 4) 原 弘, 石田 孝, 浦田和樹, 他: 高速液体クロマトグラフィーによる Enoxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin の同時分析。医学と薬学 25: 125 ~ 128, 1991
- 5) 草嶋久生, 草川 元, 石田了三, 他: 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内濃度測定法。日化療会誌 47 (Suppl 2) 104 ~ 110, 1999
- 6) 工藤正純, 大久保正, 菅原和信: カラムスイッチング法を用いた HPLC による生体試料中ニューキノロン系抗菌剤の測定法の開発と薬物相互作用への応用に関する研究。YAKUGAKU ZASSHI 121: 319 ~ 326, 2001
- 7) 清水喜八郎, 紺野昌俊, 深谷一太, 他: Pipemidic acid の体液測定に関する検討。Chemotherapy 23: 2707 ~ 2716, 1975
- 8) 大森康男, 村山 哲, 阿部泰夫, 他: Bioassay 法による AM-715 の体液測定法に関する研究。Chemotherapy 29 (Suppl 4) 91 ~ 97, 1981
- 9) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 他: 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。Chemotherapy 36 (Suppl 2) 132 ~ 137, 1988
- 10) 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 他: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 36 (Suppl 9) 137 ~ 142, 1988
- 11) Shimizu M, Nakamura S, Takase Y, et al: Pipemidic acid: absorption, distribution, and excretion. Antimicrob Agents Chemother 7: 441 ~ 446, 1975
- 12) Nakamura S, Kurobe N, Kashimoto S, et al: Pharmacokinetics of AT-2266 administered orally to mice, rats, dogs, and monkeys. Antimicrob Agents Chemother 24: 54 ~ 60, 1983
- 13) 津村光義, 佐藤敬喜, 采 猛, 他: 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 (Suppl 1) 1179 ~ 1184, 1984
- 14) 神木照雄, 山田秀雄: Cinoxacin の臨床第一相試験。Chemotherapy 28 (Suppl 4) 104 ~ 123, 1980
- 15) 芦原義久, 湯木士郎, 小林紀彦, 他: Bioassay 法による BAYo9867 (Ciprofloxacin) の体内濃度測定法に関する研究。Chemotherapy 33 (Suppl 7) 76 ~ 80, 1985
- 16) Andes D, Craig W A: Understanding pharmacokinetics and pharmacodynamics: Application to the antimicrobial forulary decision process. In Antibiotic Optimization. Concepts and Strategies in Clinical Practice (Owens R C Jr, Ambrose P G, Nightingale C H eds), p.65 ~ 88, Marcel Dekker, New York, 2005
- 17) Andes D, Craig W A: Pharmacodynamics of the New Fluoroquinolone Gatifloxacin in Murine Thigh and Lung Infection Models. Antimicrobial Agents Chemother 46: 1665 ~ 1670, 2002

Simple determination of fluoroquinolones with high-performance liquid chromatography

Hiromi Ogino¹⁾, Ken ichi Kido¹⁾, Masao Tsuchiya¹⁾,
Junko Kizu¹⁾ and Seiji Hori²⁾

¹⁾Department of Practical Pharmacy, Kyoritu University of Pharmacy

²⁾Department of Pharmacology I, Jikei University School of Medicine,

3 25 8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan

To use fluoroquinolones effectively and safely, pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis is strongly recommended. The plasma concentration of fluoroquinolones in the patients is necessary for PK/PD analysis. We established new HPLC system with a fluorescent detector enabling us to determine the concentration of 9 fluoroquinolones ciprofloxacin, enoxacin, gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, pazufloxacin, tosufloxacin only by changing excitation and emission wave length. We suggest that this is useful for the determination of plasma concentrations of fluoroquinolones in patients and essential for PK/PD analysis.