高速液体クロマトグラフ法および紫外吸光光度法による新抗菌剤 Miloxacin の分析

梅田 勲, 安斉 公, 村野 敦

住友化学工業株式会社生物学研究所¹⁾

Determination of a New Antibacterial Agent Miloxacin by High Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry

ISAO UMEDA, HIROSHI ANZAI and ATSUSHI MURANO

Institute for Biological Science, Sumitomo Chemical Co., Ltd.¹⁾

(Received January 5, 1979)

Analytical methods were developed for the determination of a new antibacterial agent, 5,8-dihydro-5-methoxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid (miloxacin) by high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet spectrophotometry (UV). Miloxacin was separated from its impurities or degradation compounds by HPLC under the following condition: stainless steel column (2.1 mm i.d. × 1 m) packed with strong anionic ion exchanger; column temperature, 40°; mobile phase, pH 5.0 solution containing 0.01 M citrate buffer and 0.03 M sodium nitrate at the flow rate of 0.7 ml/min; detector, a UV detector at the wavelength of 254 nm. Miloxacin could be determined with a relative standard deviation of 1% using picolinic acid as internal standard and its impurities were also determined at the same time. Moreover, miloxacin was dissolved in 1% sodium carbonate solution and determined by measuring the absorbance of the solution at the wavelength of 344 nm with a relative standard deviation of 0.3%. The impurities did not interfere with the determination of miloxacin and the results obtained by UV were in good agreement with those obtained by HPLC within experimental error, including some samples partially decomposed.

Keywords—determination; 5,8-dihydro-5-methoxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid (miloxacin); 5,8-dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid; 5,8-dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid; high performance liquid chromatography; ultraviolet spectrophotometry

5,8-Dihydro-5-methoxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid (miloxacin) (I) はグラム陰性菌群にすぐれた効力を示す新規な抗菌剤²⁾である。

著者らは本抗菌剤の分離定量法として高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を検討し, I と不純物あるいは分解生成物である 5,8-dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid (II) および 5,8-dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid (III) と分離できる条件を見出し, ピコリン酸 (ピリジン- α -カルボン酸) を内部標準物質 (IS) に用いて定量し, あわせて I 中の II および III を分析した。

また, 別に I の定量法として紫外吸光光度 (UV) 法を作成し, HPLC 法と比較した結果, 両法による値はよく一致した。

Chart 1

1) Location: 4-2-1, Takatsukasa, Takarazuka.

2) H. Agui, T. Mitani, A. Izawa, K. Komatsu, T. Nakagome, *J. Med. Chem.*, 20, 791 (1977).

さらに I の水溶液中や、熱、日光照射による分解生成物について若干の知見を得たのであわせて報告する。なお、I および類縁物質の構造式を Chart 1 に示す。

実 験 の 部

試薬、試液 I 標準品: I を氷酢酸から再結晶を繰り返し精製した。mp 約 260° (分解)。本標準品は薄層クロマトグラフ (TLC) 法で R_f 値約 0.2 に単一のスポットを認め、他にスポットは認めなかった。1% 炭酸ナトリウム溶液: 無水炭酸ナトリウム (試薬 1 級) 1 g を水に溶かして 100 ml とした。水酸化ナトリウム試液: 日本薬局方一般試験法によった。IS 溶液: ピコリン酸 (試薬特級) 0.5 g を 1% 炭酸ナトリウム溶液に溶かし 200 ml とした。クエン酸塩緩衝液 (pH 5.0): クエン酸 (試薬特級) 2.10 g と硝酸ナトリウム (試薬特級) 2.55 g を水に溶かして 1 l とし、水酸化ナトリウム試液を加えて pH 5.0 に調整し、HPLC の移動相に用いた。I の分解試料: 酸およびアルカリ分解試料として、I に酢酸水溶液 (1→2) あるいは水酸化ナトリウム試液を加えて溶かし濃度 2 mg/ml とし、100° で 2 時間加熱して酸およびアルカリ分解試料とした。また I を直射日光下 (夏期) に 30 日間放置して日光照射試料とし、150° および 200° で 12 時間加熱したものを加熱試料とした。

HPLC 法 1) 測定条件——装置: UV 254 nm 検出器付島津デュボン高速液体クロマトグラフ 830 型。カラム: 強塩基性陰イオン交換樹脂 Zipax SAX, 2.1 mm *i.d.* × 1 m。カラム温度: 40°。移動相: クエン酸塩緩衝液 (pH 5.0)。流速: 0.7 ml/min。試料注入量: 3 μ l。検出器感度: 1.28 AUFS (ただし、不純物および分解生成物は 0.02 AUFS)。ピーク面積の測定: 島津製作所クロマトバック 4B 型デジタルインテグレータ。

2) 操作方法 I の試料および標準品それぞれ 20 mg をかっ色メスフラスコに精密に量り、IS 溶液 20 ml を正確に加えて溶かし試料液および標準液とする。両液 3 μ l をマイクロシリンジで HPLC 装置に注入し、I および IS のピーク面積を測定し、IS に対する I の面積比 R_T および R_S を求め、次式により I の含量 (%) を算出する。

$$\text{I の含量 (\%)} = \frac{\text{標準品の採取量 (mg)}}{\text{試料の採取量 (mg)}} \times \frac{R_T}{R_S} \times 100$$

UV 法 1) 測定装置——装置: 日立製作所 自記分光光度計 323 型。セル: 層長 1 cm の石英セル。

2) 操作方法——I の試料および標準品をそれぞれ 1% 炭酸ナトリウム溶液に溶かし、7.5 μ g/ml とする。溶解および希釈にはすべてかっ色メスフラスコを用いる。両液につき、344 nm における吸光度を測定し、試料中の I (%) の含量を算出する。

TLC 法 1) 装置および器具——紫外線検出器: ミツミ科学産業, SJ-1032 型 (主波長 254 nm)。薄層板: Silicagel 60F₂₅₄ Pre-coated TLC Plate (E. Merck 社製, 層の厚さ 0.25 mm)。

2) 操作方法——I 標準品 100 mg をかっ色メスフラスコにとり、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし 20 ml とする。この液 10 μ l を薄層板に暗室内でスポットする。つぎにエタノール・酢酸エチル・水・強アンモニア水混液 (10:8:2:1) を展開溶媒として暗室内で約 10 cm 展開したのち薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し、I のスポットの位置 (R_f : 約 0.2) 以外に不純物のスポットを認めないことを確認する。

結 果 と 考 察

1. HPLC 法の検討

HPLC 条件としてカラムに Zipax SAX (デュボン社製) を充てんした内径 2.1 mm, 長さ 1 m のものを用い、移動相に 0.01 M クエン酸と 0.03 M 硝酸ナトリウムを含む溶液に水酸化ナトリウム試液を加えて pH 5.0 とした液を用い、Fig. 1 に示すように I, II および III が相互に分離された。なお II および III については TLC 法で単離し、質量スペクトルで確認した。

I 標準品 10—25 mg に IS 溶液 (ピコリン酸 2.5 mg/ml) 20 ml を加えた液について検量線を作成したところ、IS に対する I の重量比とピーク面積比との間に原点を通る良好な直線関係が得られた。

I 中に微量の II あるいは III が共存すると検出器感度を上げることにより検出可能となる。これらの成分は、本法において I に比べ、ピークがブロードとなるので I が留出したのち、記録紙送り速度を毎分 10 mm から毎分 2.5 mm にし、検出器感度を最大 64 倍に上げてシャープなピークとして検出した。II および III の I に対する相対感度および感度補正係数は Table I に示すとおりであり、これを用いて修正面積百分率法で I 中の II および III の定量が可能である。

2. UV 法の検討

I, II および III を 1% 炭酸ナトリウム溶液に溶かし紫外吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 1. High Performance Liquid Chromatogram of Miloxacin

IS: picolinic acid.

I: miloxacin

II: 5,8-dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

III: 5,8-dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

samples: a) technical preparation of miloxacin, b) miloxacin degraded in 1 N NaOH solution at 100° for 60 min. c) miloxacin exposed to sunlight for 30 days.

apparatus: Shimadzu dupont high performance liquid chromatograph Model 830.

condition: column, SAX (2.1 mm i.d. × 1 m) at 40°; mobile phase, citrate buffer (pH 5.0), 0.7 ml/min; detector, UV₂₅₄ nm; detector sensitivity, 0.02—1.28 AUFS.

TABLE I. Relative Sensitivities and Correction Factors of Miloxacin and Its Related Compounds

Compounds	Relative sensitivities to miloxacin	Correction factors
I ^{a)}	1.00	1.00
II ^{b)}	2.50	0.40
III ^{c)}	0.71	1.41

a) Miloxacin.

b) 5,8-Dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

c) 5,8-Dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

Fig. 2. UV Absorption Spectra of Miloxacin, II and III in 1% Sodium Carbonate Solution

concentration: 6 µg/ml.

—: I, miloxacin

- - - : II, 5,8-dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

.....: III, 5,8-dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

I の吸収極大波長で、II の影響の最も少ない 344 nm を定量波長とした。本波長において III は吸収を示し、I の定量に影響を及ぼすが、後述するように III は I の分解によりほとんど生成しないので実用上問題とはならなかった。

主分解生成物である II を I に添加して調製した混合試料について、I の定量値へ及ぼす影響を調べた結果を Table II に示す。

定量波長 $\lambda_{\max}$ 344 nm における II の影響はきわめて小さく、10% 共存しても 1.0%, 50% 共存しても 3.9% 正の誤差を与えるのみであった。

3. TLC 法の検討

I, II および III の分離条件について検討し、市販のシリカゲルプレート (Merck 社製) を用い、次の 3 種の展開溶媒で良好な分離が得られた。

(A) エタノール・酢酸エチル・水・強アンモニア水混液 (10:8:2:1)

TABLE II. Influence of 5,8-Dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic Acid (II) on the Determination of Miloxacin

Theoretical (%)		Found (%) (b) Miloxacin	Error (%) (b)-(a)
(a) Miloxacin	II		
95.0	5.0	95.7	0.7
90.0	10.0	91.0	1.0
80.0	20.0	81.3	1.3
70.0	30.0	73.0	3.0
50.0	50.0	53.9	3.9

TABLE III. *R_f* Values and Limits of Detection of Miloxacin and Related Compounds

Solvent systems	Compounds					
	I ^{a)}		II ^{b)}		III ^{c)}	
	<i>R_f</i> Value	Limit of detection (μg)	<i>R_f</i> Value	Limit of detection (μg)	<i>R_f</i> Value	Limit of detection (μg)
A. Ethanol·Ethyl acetate·Water·Ammonia water (10:8:2:1)	0.14	0.05	0.75	0.07	0.40	0.05
B. Dimethylformamide·Chloroform·Water·Triethylamine (12:6:2:1)	0.67	0.30	0.96	0.30	0.89	0.30
C. Isopropanol·Water·Ammonia water (7:2:1)	0.42	0.05	0.80	0.15	0.50	0.05

a) Miloxacin

b) 5,8-Dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

c) 5,8-Dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxo-[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

TABLE IV. Reproducibility of HPLC Method and UV Method for the Determination of Miloxacin

<i>n</i>	Analytical results (%)	
	HPLC	UV
1	99.7	100.0
2	100.9	99.7
3	97.7	100.1
4	100.1	99.3
5	99.3	100.0
6	101.2	100.3
7	100.2	100.0
Mean	99.87	99.91
CV ^{a)}	1.07	0.30

a) Coefficient of variation.

(B) ジメチルホルムアミド・クロロホルム・水・トリエチルアミン混液 (12:6:2:1)

(C) イソプロパノール・水・強アンモニア水混液 (7:2:1)

これら 3 条件における *R_f* 値および検出限界を Table III に示す。

I 標準品の品質試験に (A) の条件を用いることにした。なお、I は光により一部 II へ変化することが認められたので、操作はすべて暗室内で行なった。

TABLE V. Analytical Results of Some Samples of Miloxacin under Drastic Conditions

Conditions	Miloxacin (%)			Other components HPLC (%)	
	HPLC (A)	UV (B)	Difference (A)-(B)	II ^{a)}	III ^{b)}
Initial	99.8	99.9	-0.1	0.1	0.3
150° -12 hr	99.5	99.2	0.3	0.2	0.3
200° -12 hr	98.0	98.0	0	1.0	0.9
Sunlight, 15 days	87.0	87.9	-0.9	11.7	0.2
Sunlight, 30 days	66.6	68.1	-1.5	32.1	0.3
In CH ₃ COOH (1→2), 100°- 2 hr	99.9	99.9	0	0.1	0.3
In 1 N NaOH, 25°-30 hr	98.8	98.5	0.3	0.9	0.3
In 1 N NaOH, 100°- 1 hr	90.1	91.3	-1.2	10.5	0.6
In 1 N NaOH, 100°- 2 hr	77.0	78.0	-1.0	19.9	1.1

a) 5,8-Dihydro-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

b) 5,8-Dihydro-5-hydroxy-8-oxo-2H-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.

4. HPLC 法と UV 法の比較

両法について分析精度を求めた結果を Table IV に示す。

HPLC 法は、I の定量法としては UV 法に比べ、分析精度はやや劣るが不純物あるいは分解生成物の定量ができる点ですぐれた方法である。また、両法による分析値は Table V に示すように種々の試料についてよく一致し、いずれも I の定量が可能である。

5. I 分解試料の分析

I およびその分解試料について両法により分析した結果を Table V に示す。

I の両法による分析値はよく一致した。また、これらの結果から、I は熱および酸性水溶液中では安定であるが、日光照射では分解して II が、またアルカリ性水溶液中で高温では II および微量の III の生成が認められた。

謝辞 本研究発表の機会を与えられた住友化学工業株式会社生物科学研究所副所長 大井尚文博士および上司の方々ならびに試料を提供していただいた医薬事業部研究部主席研究員中込孟也博士および研究員安喰 英夫博士に感謝いたします。また、実験に協力していただいた奈良恒雄氏に感謝します。