

## 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

工藤正純,\* 大久保正, 菅原和信

弘前大学医学部附属病院薬剤部, 〒036-8563 弘前市本町 53

### Development of Measurement of New Quinolones in Body Fluids by HPLC Using Column Switching and Their Application to Drug Interaction

Masakiyo KUDO, Tadashi OHKUBO, and Kazunobu SUGAWARA

Department of Pharmacy, Hirosaki University Hospital, 53 Honcho, Hirosaki 036-8563, Japan

(Received February 7, 2001)

A high-performance liquid chromatography (HPLC) assay was developed for the determination of 6 new quinolones in the plasma. The plasma samples were directly introduced onto a HPLC column after filtering through a Molcut II membrane filter, which removes high molecular weight proteins. New quinolone in filtrate was separated from interfering substances and retained on a pre-column using an ODS stationary phase and then was introduced onto an analytical column with an ODS stationary phase by column switching. New quinolones were detected by ultraviolet absorbance in the range of 269—300 nm. Determinations of new quinolones were possible over the concentration range of 50—4000 ng/ml; the limits of detection were 20 ng/ml. The recoveries of the new quinolones added to the plasma were 96.1—101.4% with a coefficient of variation of less than 5.0%. These methods were applied to drug level monitoring in the plasma of patients treated with new quinolones and in that of healthy volunteers participating in pharmacokinetic studies. In addition, these methods were applied to a drug interaction between new quinolones and metal cation (e.g.;  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  or  $Fe^{2+}$ ) containing agents. Furthermore, this method was applied to the determination of skin tissue level of ofloxacin in patients after treatment with ofloxacin. A correlation between serum levels and skin tissue levels of ofloxacin was determined for 30 patients after oral administration of ofloxacin. A good correlation was obtained and the coefficient of the correlation was 0.84.

**Key words**— new quinolones; column switching; drug interaction; metal cation; skin tissue level

#### 1. はじめに

ニューキノロン系抗菌剤(以下ニューキノロン剤)は、抗菌スペクトルが広範囲で、かつ組織移行性が良好であるという特徴を有することから種々の感染症に対して繁用されており、これまでに数種類の薬剤が開発されている。従来のニューキノロン剤の測定法は、生体試料の前処理に固相抽出法を用いたものや界面活性剤又はイオンペアーなどを添加した移動相を用いた方法が数多く報告されているが、これらの測定法は抽出操作の煩雑さ、測定に時間を要すること、カラムのメンテナンスが大変であること、また再現性が悪いことなど多くの課題が残されていた。<sup>1-5)</sup>そこで、本研究ではニューキノロン剤のヒト生体試料における薬物動態を簡便にモニタリング

することを目的としたカラムスイッチング HPLC 法を開発し、<sup>6-10)</sup> 本法を用いて Al, Mg 及び Fe 含有製剤を併用した際の健康人におけるニューキノロン剤の体内動態を解析した。

一方、ニューキノロン剤は、その優れた組織移行性が広く知られており、外科領域などにおいて手術時の二次感染予防の目的に投与されている。オフロキサシンの皮膚組織中濃度と血中濃度との相関性に関する研究は、これまでラット<sup>11,12)</sup>及びヒト<sup>13,14)</sup>で報告されているが、ヒトでの症例数がそれぞれ7例<sup>13)</sup>及び3例<sup>14)</sup>と少数であることから皮膚組織中濃度と血中濃度との相関係数に関するデータは検討されていなかった。そこで、本研究ではニューキノロン剤のヒト皮膚組織中濃度と血漿中濃度との相関性について検討し、ニューキノロン剤の皮膚組織への

移行性を明らかにした。<sup>15,16)</sup>

本稿では、ニューキノロン剤に関して、測定法の開発及び薬物相互作用への応用、並びに皮膚組織中濃度と血中濃度との相関性について報告する。

## 2. ニューキノロン剤の測定法の開発

### 2-1. 測定対象薬剤

本研究において測定対象又は内部標準物質として検討したニューキノロン剤は、エノキサシン (ENX) 及びその代謝体である 4'-オキソ体、ノルフロキサシン (NFLX)、シプロフロキサシン (CPFX)、オフロキサシン (OFLX)、ロメフロキサシン (LFLX)、トスフロキサシン (TFLX)、スパルフロキサシン (SPFX) 及びフレロキサシン (FLRX) の 9 剤である (Fig. 1)。すべてのニューキノロン剤に共通する化学構造式上の特徴は、3 位のカルボキシル基、4 位のカルボニル基及び 6 位のフッ素を有することであり、これらニューキノロン剤が抗菌活性を発揮する上で前者の 2 つの部位が必須である。

2-2. 測定原理<sup>7)</sup> 本測定法に用いたカラムスイッチング法の模式図を Fig. 2 に示した。すなわち、ポンプ (B) により移動相 (A) をカラムに送液し、サンプルインジェクター (C) より注入したサンプルはプレカラム (D) に流れ、D に薬物が吸

着している一定時間は切替えバルブ (E) より排液することにより、生体試料中の妨害物を除去し、一定時間経過後、E を切り替えることにより分析カラム (F) に薬物が流れる。D 及び F で分離された薬物は UV 検出器 (G) に流れ、ピークとして記録される。

本測定法の特徴は、通常のカラムスイッチング法のように 2 種類の移動相を 2 台のポンプで送液することなく、1 種類の移動相と 1 台のポンプのみで測定できることであり、コスト的にも有用性が高いものとする。また、プレカラム及び分析カラムともに当研究室で充填しているが、プレカラムは低圧充填法で充填することにより、生体試料を HPLC に直接注入しても充填剤が目詰まりすることなく、耐

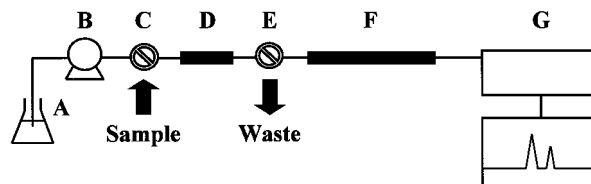


Fig. 2. Schematic Diagram of the Column Switching HPLC System

A: Carrier Solution, B: LC Pump, C: Injector, D: Pre-column, E: 3-Way Valve, F: Analytical-column, G: UV Detector.

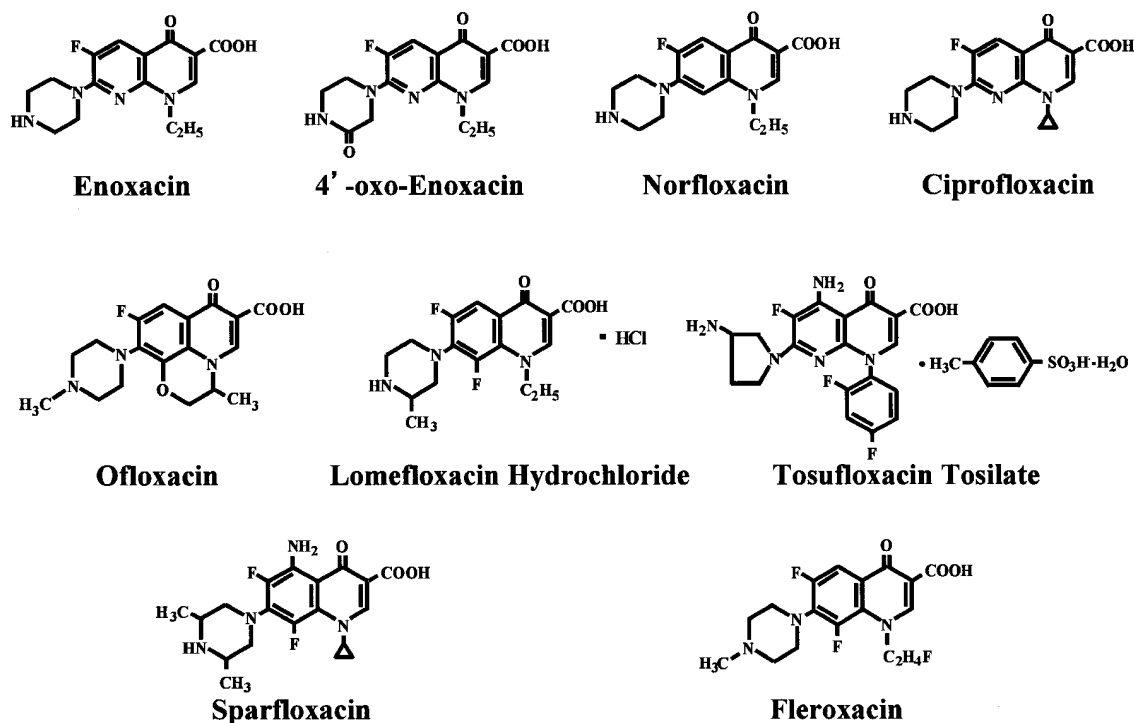


Fig. 1. Chemical Structures of New Fluoroquinolones

久性にも優れている。

**2-3. 測定条件の検討<sup>7,8,10)</sup>** 測定法を開発する際の検討項目は、移動相の比率、移動相の pH、プレカラム及び分析カラム、測定波長、内部標準物質とし、カラムを選択する際に各種固定相と pH による分離能を検討した (Fig. 3)。いずれのカラムにおいても移動相の pH が高くなるにつれてカラムへの保持時間を示す  $k'$  値は増大する傾向にあるが、それに伴って薬物のピークもブローディングする傾向にあり、良好な分離が得られないことから、種々検討した結果、移動相の pH としては 2.5 が最適であると考えた。また、pH 2.5 での各種ニューキノロン剤の分離能は、いずれのニューキノロン剤においても ODS カラムを用いたときが最も良好であり、より短い測定時間でシャープなピークが得られ、内部標準物質との分離も良好であった。以上の検討結果より決定した測定条件を以下に示した。測定波長として OFLX, SPFX は 300 nm, CPFX, LFLX 及び TFLX は 269 nm, FLRX は 295 nm を用

い、カラムはいずれのニューキノロン剤に関してもプレカラム、分析カラムともに ODS-5 を用いた。移動相としての組成は 0.5%  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 2.5) :  $\text{CH}_3\text{CN}$  とし、OFLX には 87 : 13, CPFX, LFLX, TFLX 及び SPFX には 80 : 20, FLRX には 84 : 16 の比率で使用した。

**2-4. 生体試料からの抽出方法** ヒト血漿試料からの各種ニューキノロン剤の抽出方法は、まず血漿 0.5 ml を取り、内部標準物質及びタンパク質結合阻害の目的でエタノール 0.1 ml を添加した後、攪拌し、メンブランフィルターであるモルカット II にアプライし、その濾液一定量を HPLC に注入し測定した。

**2-5. クロマトグラム<sup>8)</sup>** 本測定法により得られた各種ニューキノロン剤のクロマトグラムの中から、代表例として SPFX で得られたクロマトグラムを示した (Fig. 4)。Fig. 4 中の a) が血漿ブランクのクロマトグラムで、カラムスイッチすることにより血漿中の妨害物ピークが除去されているのが明らか

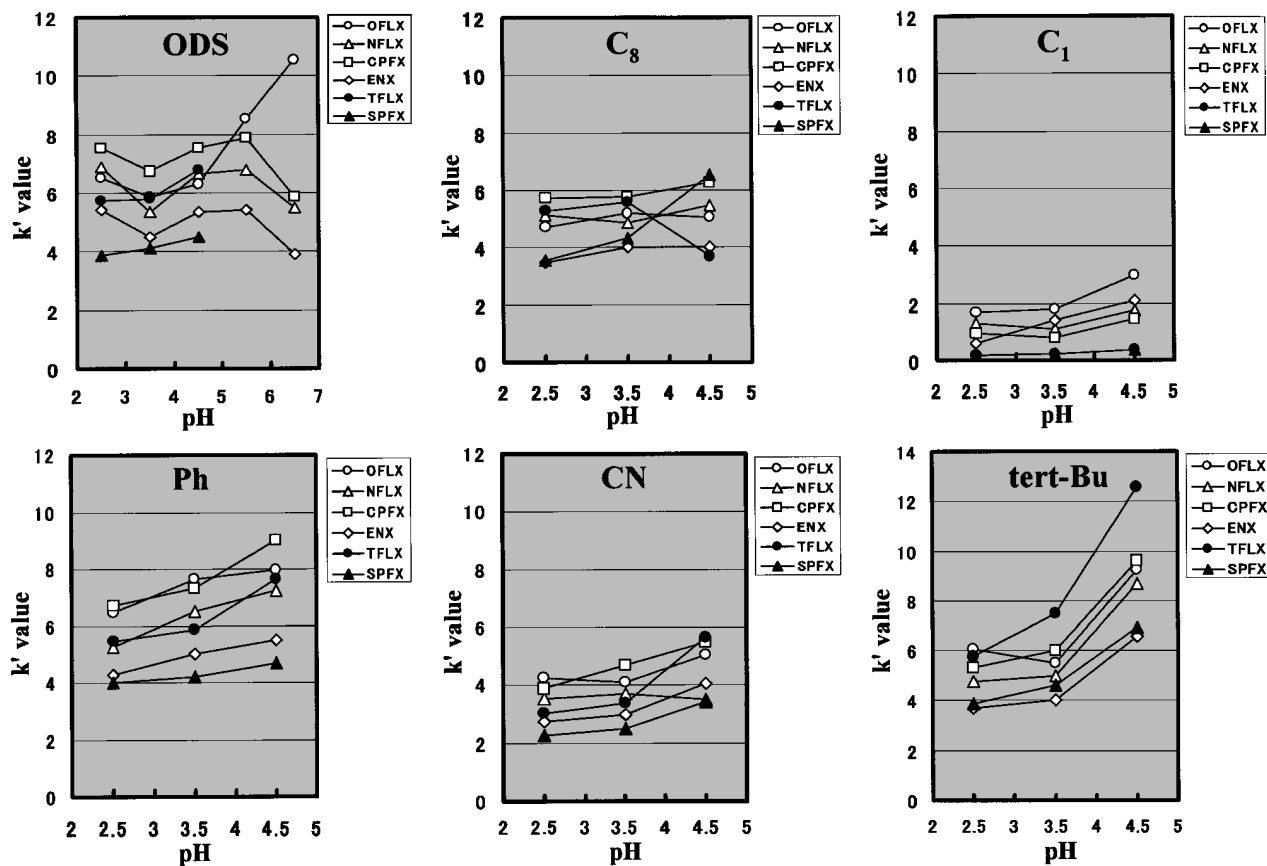


Fig. 3. Effects of Mobile Phase pH on the  $k'$  Values of the New Quinolones on the ODS,  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_1$ , CN, Ph and Tert-butyl Stationary Phases

かである。b)は血漿ブランクに測定対象とするSPFX及び内部標準物質である4'-oxo-Enoxacinを添加した際のクロマトグラムで、短時間で血漿由来

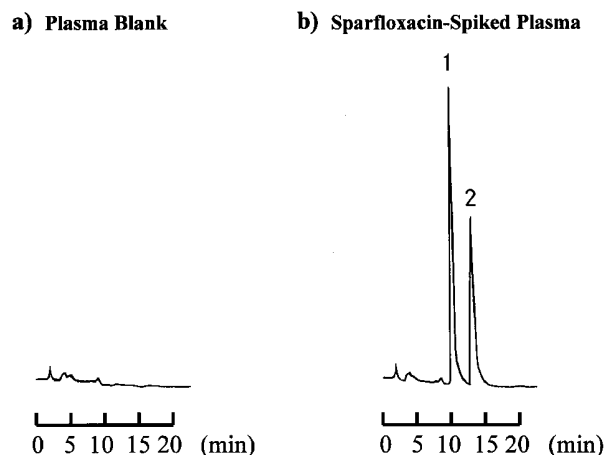


Fig. 4. Chromatograms of a) a Plasma Blank, b) a Plasma Blank Spiked with Sparfloxacin and 4'-oxo-Enoxacin  
Peak 1: Sparfloxacin, Peak 2: 4'-oxo-Enoxacin.

の内因性妨害物ピークの影響を全く受けることなく良好なクロマトグラムが得られた。

**2-6. 測定法の精度評価<sup>7-10)</sup>** 本測定法の精度・正確度を検討する目的で、ヒト血漿に添加した各種ニューキノロン剤の回収率を求め、結果をTable 1に示した。血漿へのそれぞれのニューキノロン剤の添加量は200—4000 ng/mlであり、いずれのニューキノロン剤に関しても、変動係数(C.V.)はほとんどが2%前後と良好な結果が得られ、このことは本測定法の精度の高さを証明するものである。

### 3. ニューキノロン剤と金属カチオン含有製剤との薬物相互作用

ニューキノロン剤は化学構造式中の3位と4位にそれぞれカルボニル基及びカルボキシル基を有し、この2つの部位が抗菌活性を発揮する上で必須である。しかしながら、制酸剤や鉄剤などの金属カチオンを含有する製剤と併用した場合、この2つの部位と金属カチオンとの間でキレートが形成され、ニ

Table 1. Recoveries of New Quinolones Added to Human Plasma

New Quinolone	Added (ng/ml)	Found (ng/ml) (Mean±S.D.)	Recovery (%) (Mean±S.D.)	C.V. (%)
OFLX	200	198.0±10.0	99.0±5.0	5.0
	500	507.0± 8.0	101.4±1.6	1.6
	1000	970.0± 9.0	97.0±0.9	0.9
CPFX	200	198.5± 4.3	99.2±2.2	2.2
	1000	1004.1± 8.7	100.4±0.9	0.9
	2000	1974.9±34.0	98.8±1.7	1.7
	4000	3890.1±39.2	97.3±1.0	1.0
LFLX	200	198.5± 4.3	99.2±2.2	2.2
	1000	1004.1± 8.7	100.4±0.9	0.9
	2000	1974.9±34.0	98.8±1.7	1.7
	4000	3890.1±39.2	97.3±1.0	1.0
SPFX	200	199.3± 3.3	99.7±1.6	1.6
	500	501.8± 7.0	100.3±1.4	1.4
	1000	973.2±18.4	97.3±1.8	1.8
	2000	1949.4±44.0	97.5±2.2	2.2
TFLX	200	197.5± 3.7	98.7±1.8	1.8
	400	397.9± 6.5	99.5±1.6	1.6
	800	769.2±13.3	96.1±1.7	1.8
	1500	1457.5±26.0	97.2±1.7	1.7
FLRX	200	198.5± 4.3	99.2±2.2	2.2
	1000	1004.1± 8.7	100.4±0.9	0.9
	2000	1974.9±34.0	98.8±1.7	1.7
	4000	3890.1±39.2	97.3±1.0	1.0

(n=6)

ニューキノロン剤の腸管からの吸収が著しく阻害されることが広く知られている。そこで、我々が開発した測定法を各種ニューキノロン剤と金属カチオン含有製剤との薬物相互作用に応用し、その体内動態を検討した。

**3-1. ニューキノロン剤と金属カチオン含有製剤との併用パターン** 金属カチオン含有製剤との相互作用はLFLX, TFLX, SPFX, FLRXの4剤について検討し、併用薬剤はLFLXでは金属カチオンを含有しない代表的な薬剤としてテプレノン, Mg含有製剤として酸化マグネシウム0.5g及び1.0g, Al含有製剤としてスクラルファート, TFLXでは酸化マグネシウム, スクラルファート, SPFX及びFLRXでは酸化マグネシウム, スクラルファート及び2価Fe含有製剤としてクエン酸第一鉄ナトリウムを用いた。相互作用は薬物動態パラメータを指標とし、本研究に同意の得られた健康成人男子6名を対象にクロスオーバー法で行った。

**3-2. ニューキノロン剤の体内動態に及ぼす金属**

**カチオンの影響** 金属カチオン含有製剤の各種ニューキノロン剤の体内動態に及ぼす影響についてFig. 5及びTable 2にまとめた。Fig. 5-Aにおいて、コントロール群と比較して、テプレノン併用群ではLFLXの吸収阻害は全く見られないが、酸化マグネシウム併用によりAUCで約24%の減少が見られた。しかしながら、この効果には酸化マグネシウムの用量との相関はなく、0.5gにおいてキレート形成はほぼ飽和状態になっているものと推察された。スクラルファート併用群では、酸化マグネシウム併用群よりもさらにAUCは減少し、減少率は約40%であった。

TFLX (Fig. 5-B) に関しては、コントロール群と比較して、酸化マグネシウム併用群ではAUCで約40%の減少が見られ、さらにスクラルファート併用群では、AUCの減少率は約60%へと増大した。

SPFX (Fig. 5-C) に関しては、コントロール群と比較して、酸化マグネシウム併用群ではAUCで

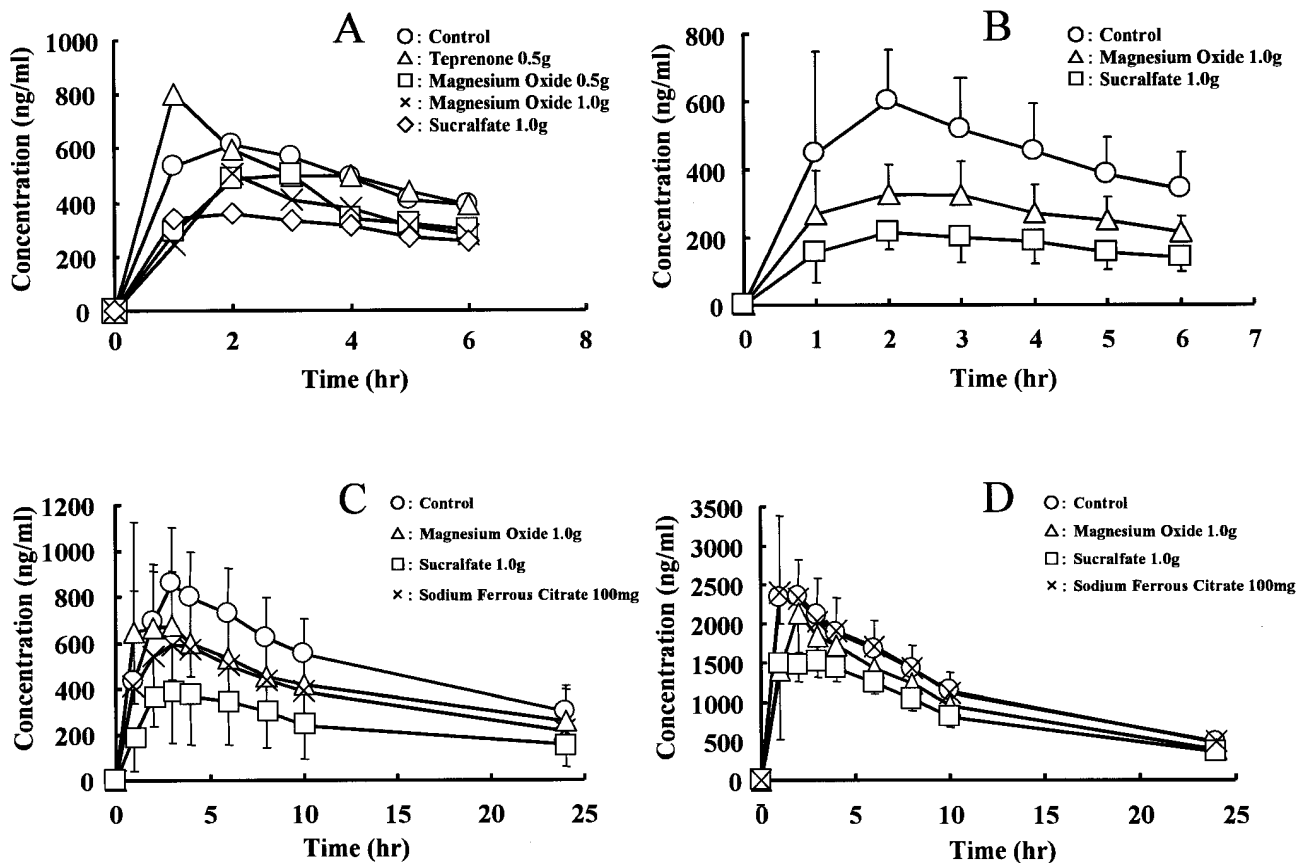


Fig. 5. Plasma Levels of New Quinolones Following Administration of New Quinolones and Co-administration Drugs in Healthy Volunteer

A: LFLX, B: TFLX, C: SPFX, D: FLRX.

Table 2. Effects of Magnesium Oxide (0.5 or 1 g), Sucralfate (1 g) and Sodium Ferrous Citrate (100 mg) on the Pharmacokinetic Parameters of New Quinolones

Parameter	Control	Teprenone 0.5 g	Magnesium Oxide 0.5 g	Magnesium Oxide 1.0 g	Sucralfate 1.0 g	Sodium Ferrous Citrate 100 mg	
LFLX	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$0.68 \pm 0.12$	$0.80 \pm 0.17$	$0.54 \pm 0.09$	$0.52 \pm 0.06$	$0.37 \pm 0.06$	—
	$T_{max}$ (hr)	$1.50 \pm 0.71$	$1.00 \pm 0.00$	$2.50 \pm 0.71$	$2.33 \pm 0.58$	$1.67 \pm 0.58$	—
	$AUC_{0-6}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ )	2.81	3.02	2.09	2.08	1.74	—
	AUC (% of control)	100.0	107.5	74.4	74.0	61.9	—
	$T_{1/2}$ (hr)	5.62	5.43	4.30	4.75	7.93	—
TFLX	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$0.63 \pm 0.21$	—	—	$0.35 \pm 0.07^*$	$0.23 \pm 0.05^{**}$	—
	$T_{max}$ (hr)	$1.80 \pm 0.45$	—	—	$2.40 \pm 0.89$	$2.20 \pm 0.84$	—
	$AUC_{0-6}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ )	$2.57 \pm 0.82$	—	—	$1.55 \pm 0.45$	$0.98 \pm 0.27^{**}$	—
	AUC (% of control)	100.0	—	—	60.3	38.1	—
	$T_{1/2}$ (hr)	$4.84 \pm 0.85$	—	—	$5.21 \pm 0.84$	$5.53 \pm 1.62$	—
SPFX	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$0.86 \pm 0.25$	—	—	$0.67 \pm 0.24$	$0.39 \pm 0.15^{**}$	$0.59 \pm 0.22^{\#}$
	$T_{max}$ (hr)	$2.33 \pm 1.02$	—	—	$2.17 \pm 1.12$	$3.00 \pm 0.53$	$2.83 \pm 0.99$
	$AUC_{0-24}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ )	$12.34 \pm 3.31$	—	—	$9.95 \pm 3.88$	$5.81 \pm 2.25^{\#}$	$8.86 \pm 3.18$
	AUC (% of control)	100.0	—	—	80.6	47.1	72.0
	$T_{1/2}$ (hr)	$13.7 \pm 3.6$	—	—	$13.9 \pm 3.0$	$15.7 \pm 2.7$	$14.3 \pm 4.6$
FLRX	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$2.76 \pm 0.45$	—	—	$2.35 \pm 0.45$	$1.64 \pm 0.16^{\S\S}$	$2.44 \pm 0.39$
	$T_{max}$ (hr)	$1.20 \pm 0.45$	—	—	$1.50 \pm 0.55$	$1.67 \pm 0.82$	$1.20 \pm 0.45$
	$AUC_{0-24}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ )	$28.29 \pm 5.80$	—	—	$24.27 \pm 4.44$	$20.57 \pm 2.68^{\S}$	$28.28 \pm 5.46$
	AUC (% of control)	100.0	—	—	85.79	72.71	99.96
	$T_{1/2}$ (hr)	$9.42 \pm 0.57$	—	—	$8.98 \pm 0.82$	$10.33 \pm 2.12$	$9.88 \pm 1.43$

\*  $p < 0.05$  Compared with Control\*  $p < 0.05$  Compared with Control§  $p < 0.05$  Compared with Control\*\*  $p < 0.005$  Compared with Control\*\*  $p < 0.01$  Compared with Control§§  $p < 0.0005$  Compared with Control

— : Test was not carried out.

約 20% の減少が見られ、スクラルファート併用群では、AUC の減少率は約 53% へと増大した。しかしながら、クエン酸第一鉄ナトリウム併用群では AUC の減少率は、28% とスクラルファート併用群ほど AUC の減少は見られなかった。

FLRX (Fig. 5-D) に関しては、コントロール群と比較して、酸化マグネシウム併用群では AUC で約 15% の減少が見られ、スクラルファート併用群では、AUC の減少率は約 28% へと増大した。しかしながら、クエン酸第一鉄ナトリウム併用群では AUC の減少はほとんどなく、FLRX の吸収に鉄剤は影響を及ぼさないことが示唆された。

酸化マグネシウムに関する吸収阻害は、TFLX > LFLX > SPFX > FLRX の順であり、ニューキノロン剤の種類により吸収阻害の程度に大きな差異が認められた。このことはスクラルファート併用でもほぼ同様の傾向で、吸収阻害の大きさは TFLX >

SPFX > LFLX > FLRX の順であった。クエン酸第一鉄ナトリウムに関しては、SPFX と FLRX のみでしか検討していないが、SPFX での吸収阻害の程度は酸化マグネシウム併用よりも若干大きく、38% の減少率であった。しかしながら、FLRX では AUC がほとんど減少せず、鉄剤は FLRX の吸収にはほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

$C_{max}$  に関しても AUC とほぼ一致した結果が得られたが、 $T_{max}$  及び  $T_{1/2}$  など、その他の薬物動態パラメータには有意な影響を及ぼさなかった (Table 2)。

以上の結果から、ニューキノロン剤と金属カチオンとのキレート形成による吸収阻害の程度には、ニューキノロン剤や金属カチオンの種類によって差異が認められることが明らかとなった。

本研究結果より、ニューキノロン剤に関しては、TFLX > LFLX > SPFX > FLRX の順に、金属カチ

オンに関しては、 $Al^{3+} > Mg^{2+} \geq Fe^{2+}$  の順で安定なキレートを形成し、ニューキノロン剤の吸収阻害が起こりうることが示唆された。

#### 4. OFLX の皮膚組織中濃度と血中濃度との相関性<sup>15,16)</sup>

当院形成外科において、手術時の感染予防目的に OFLX を投与されている患者 30 名を対象として、OFLX の皮膚組織中濃度と血漿中濃度との相関性について検討した。

**4-1. ヒト皮膚組織からの OFLX の抽出** ヒトの皮膚組織 0.2 g に移動相である 0.5%  $CH_3COO-Na : CH_3CN$  の混合液 2 ml 及び内部標準物質である LFLX を添加後、POLYTRON ホモジナイザーにて一定時間ホモジナイズしたものを遠心分離し、その上清を血漿試料と同様の前処理にてモルカット II にアプライし、その濾液一定量を HPLC に注入して測定した。

**4-2. 測定法の精度評価<sup>16)</sup>** ホモジナイズしたヒト皮膚組織に OFLX を添加した際の回収率を Table 3 に示した。それぞれの添加量に対する絶対回収率は  $74.3 \pm 1.6\%$  以上であり、変動係数は 4.6% 以下と本測定法の高い精度が示された。

**4-3. クロマトグラム<sup>16)</sup>** 本測定法により得られた皮膚組織及び血清試料のクロマトグラムを Fig. 6 に示した。Fig. 6 中の a) がブランクの皮膚組織ホモジネートのクロマトグラムであり、カラムスイッチすることにより皮膚組織中の妨害物ピークが除去されているのが明らかである。b) は OFLX 200 mg を投与した後の患者の皮膚組織ホモジネートに内部標準物質の LFLX を添加した際のクロマトグラムであり、短時間で皮膚組織由来の内因性妨害物ピークの影響を全く受けることなく良好なクロマトグラムが得られた。c), d) は血清ブランク及び OFLX 200 mg 投与後の血清サンプルのクロマトグラムで

あり、血清由来の内因性妨害物ピークの影響を全く受けることなく良好なクロマトグラムが得られた。

**4-4. 皮膚組織中濃度と血中濃度との相関性<sup>16)</sup>** 測定対象とした患者への OFLX の投与量は 200 又は 300 mg であり、サンプルの採取時間は血液、皮膚組織ともに投与後 1—3 時間であった。Fig. 7 に測定対象とした 30 名の患者の皮膚組織中と血清中の OFLX 濃度の相関を示した。相関係数  $r$  は 0.8407 と、皮膚組織中濃度と血中濃度との間には良好な相関性が得られ、改めて OFLX の良好な組織移行性が証明された。

#### 5. 結論

各種ニューキノロン剤の血漿中濃度測定をカラムスイッチングを用いた HPLC 法により行った結果、血漿由来の妨害物ピークの影響を全く受けるこ

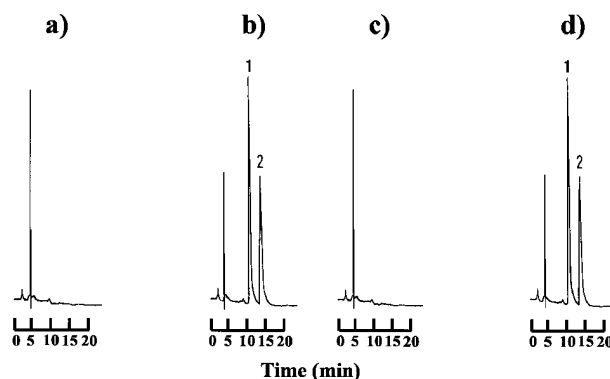


Fig. 6. Chromatograms of a): Blank Skin Tissue Homogenate, b): Skin Tissue Homogenate in Patients after Treatment with 200 mg Ofloxacin, c): Blank Serum, and d): Serum in Patients after Treatment with 200 mg Ofloxacin  
1=Ofloxacin, 2=Lomefloxacin.

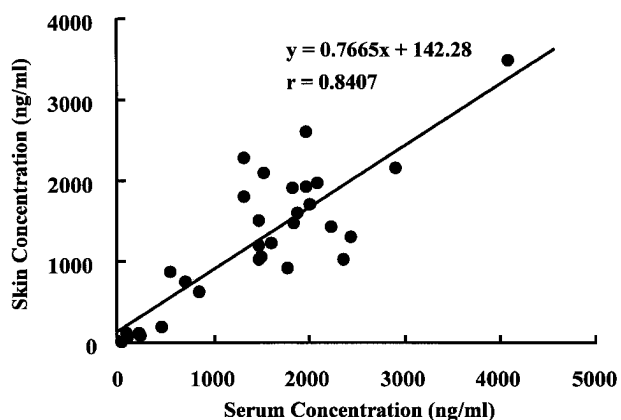


Fig. 7. Relationship between Concentration of Ofloxacin in Skin Tissue and in Serum after Oral Administration of Ofloxacin.

Table 3. Analytical Recovery and between-Assay Precision of Ofloxacin in Skin Tissue Homogenate

Added (ng/g)	Absolute recovery (%) (Mean $\pm$ S.D.)	Coefficient of variation (%)
500	$84.5 \pm 3.9$	4.6
1000	$74.5 \pm 2.9$	3.9
3000	$74.3 \pm 1.6$	2.2

(n=4).

となく、血漿試料の前処理が簡便で、かつ精度及び正確度においても信頼性のある測定法の開発が可能であった。本測定法において得られたデータは、これまで報告されているデータとほぼ一致していることから、本法の信頼性が証明されたものと考えられる。

ニューキノロン剤と金属カチオン含有製剤との相互作用に関する検討に本測定法を応用したところ、ニューキノロン剤の種類によって金属カチオンの影響の受け易さに差異が見られた。また、金属カチオンによっても同様の差異が認められ、相互作用の受け易さは一般的に  $Al^{3+} > Mg^{2+} \geq Fe^{2+}$  の順であった。このように、ニューキノロン剤の吸収阻害の程度には、ニューキノロン剤及び金属カチオンの種類により大きな差異が認められ、今回検討したニューキノロン剤の中では、SPFX 及び FLRX が比較的金属カチオンの影響を受けにくいことが明らかとなった。

OFLX について皮膚組織中濃度と血漿中濃度との相関性を検討したところ、両者間には有意な相関性が見られ、OFLX の良好な組織移行性が証明された。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力を頂きました弘前大学医学部附属病院薬剤部のスタッフの皆様にご心より感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Le Coguic A., Bidault R., Frarinotti R., Dauphin A., *J. Chromatogr.*, **434**, 320-323 (1988).
- 2) Mignot A., Lefebvre M. A., *J. Chromatogr.*, **430**, 192-197 (1988).
- 3) Katagiri Y., Naora K., Ichikawa N., Hayashibara M., Iwamoto K., *J. Chromatogr.*, **431**, 135-142 (1988).
- 4) Lehr K. H., Damm P., *J. Chromatogr.*, **425**, 153-161 (1988).
- 5) Griggs D. J., Wise R., *J. Antimicrob. Chemother.*, **24**, 437-445 (1989).
- 6) Ohkubo T., Kudo M., Sugawara K., *Anal. Sci.*, **7**, 741-743 (1991).
- 7) Ohkubo T., Kudo M., Sugawara K., *J. Chromatogr.*, **573**, 289-293 (1992).
- 8) Kudo M., Ohkubo T., Sugawara K., *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **22**, 441-449 (1999).
- 9) Kudo M., Ohkubo T., Sugawara K., *Analytical Letters*, **32**, 1589-1601 (1999).
- 10) Kudo M., Ohkubo T., Sugawara K., *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **25**, 595-602 (1999).
- 11) Umemura S., Nohara N., *Chemotherapy*, **32**, 991-996 (1984).
- 12) Yamamoto Y., Ikeda M., Arata J., *Chemotherapy*, **32**, 997-1000 (1984).
- 13) Tomizawa T., Yamaguchi J., Kinoshita M., *Chemotherapy*, **32**, 980-990 (1984).
- 14) Takahashi H., Kosumi N., Hoshino M., Hanawa S., *Chemotherapy*, **32**, 975-979 (1984).
- 15) Sawada Y., Ohkubo T., Kudo M., Sugawara K., *Burn*, **19**, 529-530 (1993).
- 16) Ohkubo T., Kudo M., Sugawara K., Sawada Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 522-524 (1994).