

高速液体クロマトグラフ法による Cefbuperazone の 喀痰中濃度測定 の検討

渡辺昌平・栗山喬之・菊池典雄・村木憲子
千葉大学医学部肺癌研内科

渋谷国豊・岸田 弘・鈴木和義・大谷淑郎
科研製薬株式会社

(昭和 59 年 8 月 1 日受付)

新 cephamycin 系抗生剤 Cefbuperazone(CBPZ) の喀痰中濃度測定法について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法) の適用と改良を行ない、ヒトでの CBPZ の喀痰中移行を検討した。

(1) HPLC 法について、喀痰の前処理として粘稠性物質および測定妨害物質の除去を行ない、さらに測定波長を選択することにより、喀痰中 CBPZ 濃度の測定が可能となり、生物学的測定法と良く一致した測定値が得られ、その相関係数は 0.940 であった。

(2) 5名の呼吸器疾患患者に CBPZ 1g および 2g を 1時間点滴静注投与後の喀痰中 CBPZ 濃度が測定された。各患者ごとのピーク値および経時的パターンとも個人差が著しかったが、投与量により各個人ごとに明らかな Dose response がみられ、そのピーク値は 1g 投与で 1.2~2.4 $\mu\text{g/ml}$ 、2g 投与で 1.9~5.0 $\mu\text{g/ml}$ の喀痰中濃度が得られた。

近年、多くの cephem 系抗生物質が開発され、その臨床応用により優れた有用性が明らかとなっている。

Cefbuperazone は、Fig.1 に示すように、7-aminocephalosporanic acid を骨格とし、その 7 α -位に methoxy 基 (-OCH₃) を導入することによって、 β -lactamase に対する安定性を付与した新しい cephamycin 系抗生物質である。

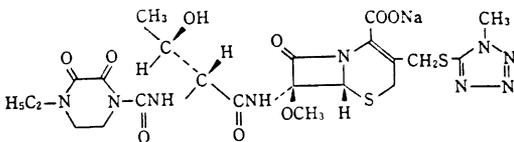
Cefbuperazone(以下 CBPZ と略す)は、グラム陽性菌、グラム陰性菌に対して広範囲な抗菌スペクトルを有し、特に、グラム陰性桿菌のうち、*Enterobacter*, *Citrobacter*, indole(+) *Proteus* および *Serratia* などに対して、従来の cephem 系薬剤に比べて強い抗菌力を示し、*in vitro* の成績に比べて、*in vivo* の実験的感染

症では、より優れた効果が得られている。さらに各種細菌産生の β -lactamase に対しても安定で、多剤耐性菌に対しても感受性のある菌株では、より強い抗菌力を示している。また、注射投与により高い血中濃度が得られ、各種組織への移行も良好で、血中での半減期は約 100 分であり、大部分が未変化体のまま、主として尿中や胆汁中に高濃度で排泄されることが確かめられている^{1,2)}。

先に、谷村ら³⁾により胆道感染症の入院患者を対象とし、静注投与後の CBPZ の胆汁中濃度測定にアセトトリル水溶液を移動相とし、トリエチルアンモニウムイオン(酢酸トリエチルアンモニウム)を用いるイオン対逆相高速液体クロマトグラフィーを適用し、採取された胆汁試料を前処理なしに、そのまま高速液体クロマトグラフィーに注入することにより、投与 12 時間後までの胆汁中濃度を精度よく測定できることが報告されている。

一般に、cephem 系抗生物質の体内濃度測定に、高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを適用した報告^{4,5)}は多く見受けられるが、血中濃度や尿中濃度など、比較的高濃度の薬剤を含む生体試料を扱った場合が殆どで、より低濃度の生体試料の場合は生物学的測定法が適用されている⁶⁾。

Fig.1 Chemical structure of cefbuperazone



Molecular formula : C₂₂H₂₉N Na O₉S₂

Molecular weight : 649.63

そこで今回、注射投与後もその移行量が他の体液に比べて少ないといわれる喀痰中への薬物移行量の測定に、高速液体クロマトグラフ法の適用を試み、生物学的方法により得られた結果と比較し、併せて CBPZ の喀痰中移行についても検討した。

I. 実験の材料および方法

1) 試料および試薬

CBPZ は、臨床試験で汎用された注射用 CBPZ 製剤を用いた。また、移動相に用いた溶媒は高速液体クロマトグラフィー用で、その他の有機溶媒および試薬は、すべて市販特級を用いた。

2) 喀痰および血清試料の採取

CBPZ を呼吸器疾患患者に投与し、喀痰中への移行を経時的に測定した。5名の患者を対象とし、その年齢、性別および疾患名を Table 1 に示した。同一患者にまず CBPZ を 1 回 1g 投与して試験し、十分な Wash out 期間をおいた後、本剤 1 回 2g 投与の試験を行なった。CBPZ はソリタ T₃ 200 ml に溶解し、1 時間点滴静注により投与した。

本剤の点滴静注開始後、1 時間ごとに 5 時間目まで蓄痰し、直ちに -20°C にて凍結保存した。また、点滴静注終了時点およびそれより 1 時間ごとに 4 時間目まで採血し、血清を凍結保存した。

3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置は島津高速液体クロマトグラフ、LC-4A 型を用いた。カラムは、LiChrosorb. PR-18 (粒子径、10 μm, 25 cm × 4 mm I. D.)、逆相充填カラムを用いカラム温度 30 ± 1°C で行なった。

移動相としては、アセトニトリル 125 ml, 1 M 酢酸 17 ml および 1 M トリエチルアミン-酢酸 27 ml を混合した後、水で全量を 1,000 ml とした液を用いた。流速 1.1 ml/分で行ない、検出器は島津 SPD-2 AS 型を用い、測定波長は 254 nm, 270 nm および 280 nm で検討した。

4) 生物学的定量法 (Bioassay)

検定菌として、*K. pneumoniae* ATCC 10031 を用い、ペーパーディスク法で行なった。標準曲線は血清の場合

は Consera (日水製薬) を、喀痰の場合は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を希釈液として用い作製した。

5) 喀痰中濃度の測定

Bioassay の場合は、保存した喀痰試料を細かく砕いて解凍後、その一部または全量を採取し、次に等量のエタノールを添加し、さらに 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を等量加えた液の一部につきペーパーディスク法により測定した。残りの一部は、HPLC 測定まで -20°C に保存した。HPLC の場合は、Bioassay の測定試料の残部の一定量を取り、4 倍量のエタノールを加えて充分攪拌したのち、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。次に、エタノールを 45°C で減圧留去したのち、残留物に 25% エタノール水溶液 0.1 ml を加えて溶かし、HPLC 用測定試料とした。

II. 成績

1) 前処理の検討

喀痰は、粘稠度が高く、組織浸出液と分泌液のまざったものであり、そのまま HPLC に注入し分析することは困難である。また通例、薬剤投与後も喀痰中の抗生物質は微量 (数 μg/ml 程度) である。

そこで今回、試料の濃縮化を目的とし、Bioassay に供した試料に 4 倍量のエタノールを加えて遠心分離したところ、粘液質は、ほぼ完全に沈殿し、除去可能であった。したがって、このエタノール溶液を HPLC への注入試料とした。

2) 測定条件の検討

CBPZ は水溶液中で 269 nm に吸収極大を示す。一方、Fig. 2 に示すように、今回使用した HPLC 用の移動相中での吸収スペクトルもほぼ同様のパターンを示した。

CBPZ 1g を点滴静注投与後採取した喀痰を前述の操作に従って処理したのち HPLC に注入したところ、検出波長として通常汎用される 254 nm でモニターし、得られたクロマトグラムは Fig. 3 に示すように、保持時間 (t_R) 8 分付近に CBPZ のピークが観察される。しかし、ピーク後方に喀痰成分に由来すると思われる著しいベースラインの負のドリフトが認められ定量不能であった。

Table 1 Background of patients

Case No.	Name	Sex	Age	Diagnosis
1	T. T.	F	44	Chronic bronchitis, Rheumatic arthritis
2	H. A.	F	43	Chronic obstructive lung disease
3	K. N.	M	57	Obstructive pneumonia, Lung cancer
4	T. T.	M	65	Chronic obstructive lung disease
5	S. S.	M	58	Chronic obstructive lung disease

Fig. 2 UV-spectrum of CBPZ(25 $\mu\text{g/ml}$) in elution solvent for HPLC

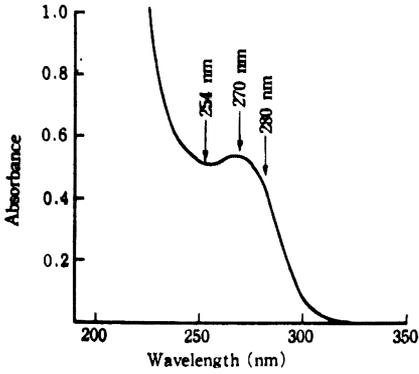


Fig. 3 High-performance liquid chromatograms of sputum after drip intravenous administration of 1g of CBPZ obtained at various wavelengths

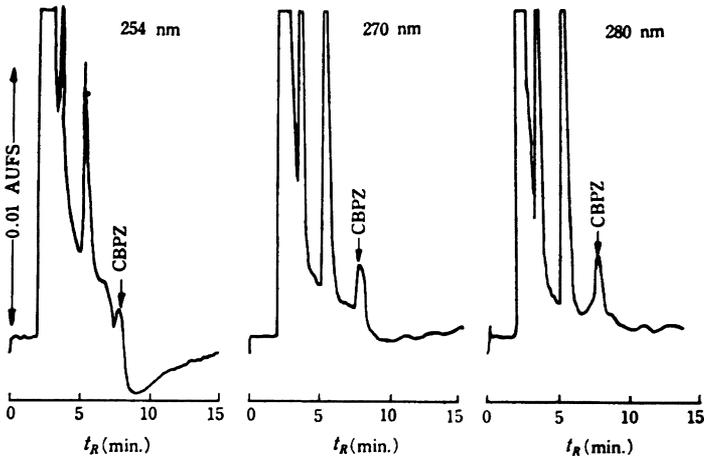
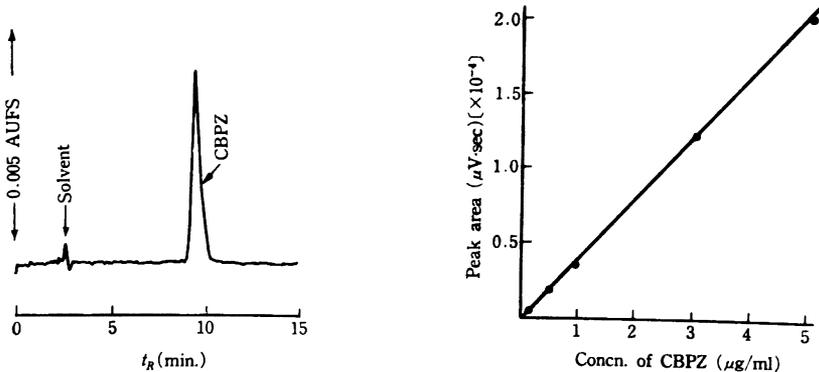


Fig. 4 Typical high-performance liquid chromatogram of standard solution and calibration curve of CBPZ



一方、ドリフトの原因を調べる目的で、25% エタノール水溶液を注入したが、ベースラインには全く変動がみられなかったことから、この負のドリフトの原因は試料中に微量混在した喀痰由来の成分による影響と考えられる。そこで、検出波長を254 nmの場合に比べてほぼ同程度の吸収強度を示す270 nmおよび280 nmとし、同一試料を注入した結果、負のドリフトは消失し、特に280 nmで測定すると未知成分との分離も良好で、CBPZも正常なピーク形状を示し、定量可能なクロマトグラムを得ることができた。以上の結果より、測定波長を280 nmに設定した。

3) 検量線および定量精度

Fig. 4にCBPZ標準液のクロマトグラムおよび検量線を示した。すなわち、CBPZ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、

1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度の 20 μl を HPLC に注入し絶対検量線を作成した。

横軸 (x) に CBPZ 濃度を、縦軸 (y) にピーク面積をとりプロットすると、良好な直線関係を示し、最小二乗法により回帰直線の方程式を求めたところ、 $y=4135 \cdot$

$x-29.0$ ($r=0.9999$) であった。また、測定精度は、 $C.V.=1.12\%$ ($n=10$) と良好であった。

4) HPLC 測定値と Bioassay 測定値の比較

5名の患者にCBPZを1gおよび2gをそれぞれ点滴静注した時の本剤の血清および喀痰中濃度を Bioassay

Table 2 Sputum and serum concentrations of CBPZ (Bioassay)

Dose	Case				Serum ($\mu\text{g/ml}$)				Sputum ($\mu\text{g/ml}$)				
	No.	Name	Sex	Age	0	1	2	4(hrs)	0	1	2	3	4(hrs)
1 g	1	T. T.	F	44	108.2	56.0	38.0	13.3	<0.2	1.0	1.9	1.8	1.5
	2	H. A.	F	43	101.2	55.6	38.0	18.0	1.1	1.6	2.1	2.4	2.2
	3	K. N.	M	57	76.3	39.3	23.0	9.7	1.9	1.6	0.9	1.0	0.9
	4	T. T.	M	65	94.9	57.4	37.2	22.0	≤ 0.2	≤ 0.2	1.0	1.3	2.3
	5	S. S.	M	58	31.2	89.2	39.4	14.7	<0.2	<0.2	1.0	0.8	<0.2
	Mean				95.2*	59.5	35.1	15.5	0.6	0.8	1.4	1.5	1.4
	S.E.				6.85*	8.13	3.05	2.09	0.39	0.36	0.26	0.29	0.43
2 g	1	T. T.	F	44	84.5	99.0	63.7	25.6	4.7	4.0	3.5	2.3	2.0
	2	H. A.	F	43	186.5	97.2	60.4	39.0	1.7	2.0	3.1	3.3	2.2
	3	K. N.	M	57	134.0	67.4	42.1	20.0	3.2	2.6	3.1	2.4	1.3
	4	T. T.	M	65	194.6	108.4	78.4	42.2	≤ 0.2	≤ 0.2	3.4	3.3	4.2
	5	S. S.	M	58	<0.2	243.0	90.8	28.2	<0.2	<0.2	1.6	2.5	2.0
	Mean				149.9*	123.0	67.1	31.0	1.9	1.7	2.9	2.8	2.3
	S.E.				25.61*	30.78	8.28	4.17	0.92	0.77	0.34	0.22	0.49

* Mean \pm S.E. excluding the abnormal value with Case 5.

Table 3 Sputum and serum concentrations of CBPZ (HPLC)

Dose	Case				Serum ($\mu\text{g/ml}$)				Sputum ($\mu\text{g/ml}$)				
	No.	Name	Sex	Age	0	1	2	4(hrs)	0	1	2	3	4(hrs)
1 g	1	T. T.	F	44	112.3	53.8	29.8	7.7	0.4	1.0	1.9	1.5	1.0
	2	H. A.	F	43	115.6	56.8	35.1	14.1	1.0	2.0	2.1	2.4	2.1
	3	K. N.	M	57	66.6	30.9	16.3	6.6	1.3	1.7	0.8	0.9	0.4
	4	T. T.	M	65	94.3	48.8	36.3	16.5	≤ 0.1	≤ 0.2	0.9	1.2	2.1
	5	S. S.	M	58	26.5	88.5	35.0	13.2	ND	0.7	1.2	0.9	ND
	Mean				97.2*	55.8	30.5	11.6	0.6	1.1	1.4	1.4	1.1
	S.E.				11.22*	9.34	3.72	1.91	0.25	0.33	0.26	0.28	0.43
2 g	1	T. T.	F	44	91.0	106.7	57.7	19.5	5.0	4.5	3.4	2.2	1.8
	2	H. A.	F	43	191.4	105.4	64.4	34.0	1.7	1.2	3.5	2.3	2.1
	3	K. N.	M	57	128.9	59.4	34.1	12.0	3.7	2.4	3.2	2.4	0.6
	4	T. T.	M	65	188.1	102.1	70.6	37.0	0.2	0.3	2.4	3.3	3.6
	5	S. S.	M	58	5.2	201.3	83.6	27.7	0.5	0.7	1.4	1.9	1.6
	Mean				149.9*	115.0	62.1	26.0	2.2	1.8	2.8	2.4	1.9
	S.E.				24.31*	23.31	8.20	4.62	0.93	0.76	0.40	0.24	0.49

* Mean \pm S.E. excluding the abnormal value with Case 5.

Fig. 5 Correlation of serum concentrations between bioassay and HPLC after drip intravenous administration of 1 g and 2 g of CBPZ

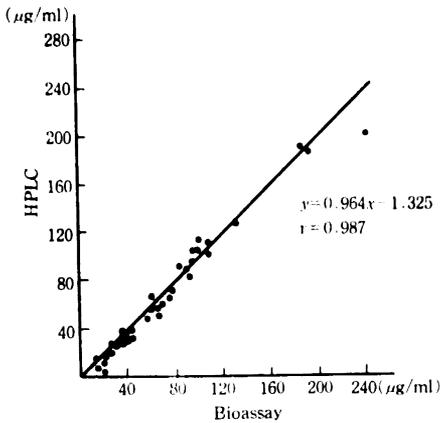
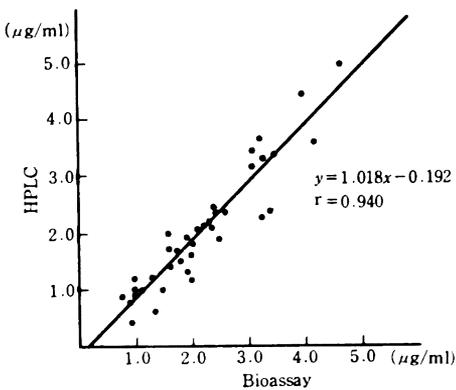


Fig. 6 Correlation of sputum concentrations between bioassay and HPLC after drip intravenous administration of 1 g and 2 g of CBPZ



法と HPLC 法で測定した成績を Table 2, 3 に示したが、血清および喀痰中濃度についてそれぞれ症例、投与量、時間毎のすべての測定値をプールし、Bioassay 測定値と HPLC 測定値との相関性をみた。その結果、Fig. 5, 6 に示すように、横軸 (x) に Bioassay 測定値、縦軸 (y) に HPLC 測定値をとりプロットすると、血清および喀痰中濃度ともに両方法間に極めて良好な相関関係がみられた。すなわち最小二乗法により求めた回帰直線の方程式は血清中濃度では $y = 0.964x - 1.325$ ($r = 0.987$)、喀痰中濃度では $y = 1.018x - 0.192$ ($r = 0.940$) であった。

5) 血清および喀痰中濃度の時間経過

Bioassay 法および HPLC 法による測定値間の相関が極めて優れていることから、Table 3 の HPLC 測定値をとり血清および喀痰中濃度の個人別経時的推移を Fig. 7 に、平均値については Fig. 8 に示した。

血清中濃度については明瞭な Dose response がみられ、点滴終了時で 1 g 投与では平均 83.1 $\mu\text{g/ml}$ 、2 g 投与で 120.9 $\mu\text{g/ml}$ であって、以後 2 相性に減衰し、4 時間後は 1 g 投与で 11.6 $\mu\text{g/ml}$ 、2 g 投与で 26.0 $\mu\text{g/ml}$ となり、濃度レベルおよび減衰パターンともに従来の報告^{1,2)}と同様であった。

一方、喀痰中の CBPZ 濃度は点滴終了時点で 1 g 投与では平均 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 、2 g 投与では 2.2 $\mu\text{g/ml}$ を示したが、血清の場合と異なり喀痰中への移行には個人差がかなり大きかった。すなわち Fig. 7 にみるように Case 1 および Case 3 では CBPZ の喀痰中移行が比較的速やかで、特に 2 g 投与では点滴終了時でそれぞれ 5.0, 3.7 $\mu\text{g/ml}$ のピーク値を示し、以後緩やかに減衰し、4 時間目では 1.8, 0.6 $\mu\text{g/ml}$ であった。Case 2 および 5 では点滴終了後 2~3 時間にピーク値を示し、それぞれの値は Case 2 では 2.4, 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 、Case 5 では 1.2, 1.9 $\mu\text{g/ml}$ であった。Case 4 では 1 g および 2 g 投与のいずれの場合も喀痰中への薬剤移行は遅く、点滴終了後 2 時間目から CBPZ が検出され、以後薬剤濃度が漸増し、4 時間値はそれぞれ 2.1, 3.6 $\mu\text{g/ml}$ であった。

以上述べたように、CBPZ の喀痰中移行には個人差が大きい、各個人別にみると 1 g と 2 g 投与で明らかな Dose response が認められた。また、Bioassay 法、HPLC 法いずれの測定法でも良く一致した喀痰中濃度が得られており、特に Bioassay 法で 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 未満の検体については HPLC 法を用いた方がより正確な測定値が得られている。

III. 考察および結論

呼吸器疾患を有する 5 名の患者に CBPZ を点滴静注し、投与後血清および喀痰を採取し、同一試料について Bioassay 法と HPLC 法とによる測定値の比較を行なった。特に喀痰中への薬剤移行量が微量であるため、常法の HPLC 法では測定困難であったことから、HPLC 法の改良を試みた。

その結果、測定波長を 280 nm に設定し、エタノール処理により喀痰中の粘液質を除去することにより、混入未知成分の妨害なしに、喀痰中の CBPZ 濃度を HPLC 法により測定することが可能となった。また、症例、投与量および時間毎の測定値をすべてプールし、同一試料での Bioassay 法と HPLC 法との比較を行なった結果、血清試料については相関係数 $r = 0.987$ 、喀痰試料については $r = 0.940$ といずれも高い相関性を示した。特に薬剤移行量の少ない喀痰中濃度の測定に、今回改良された HPLC 法を適用することによって、より簡便に、より正確に薬剤移行量を測定することが可能となった。

Fig. 7 CBPZ levels (HPLC) of serum and sputum after drip intravenous administration of 1g and 2g of CBPZ

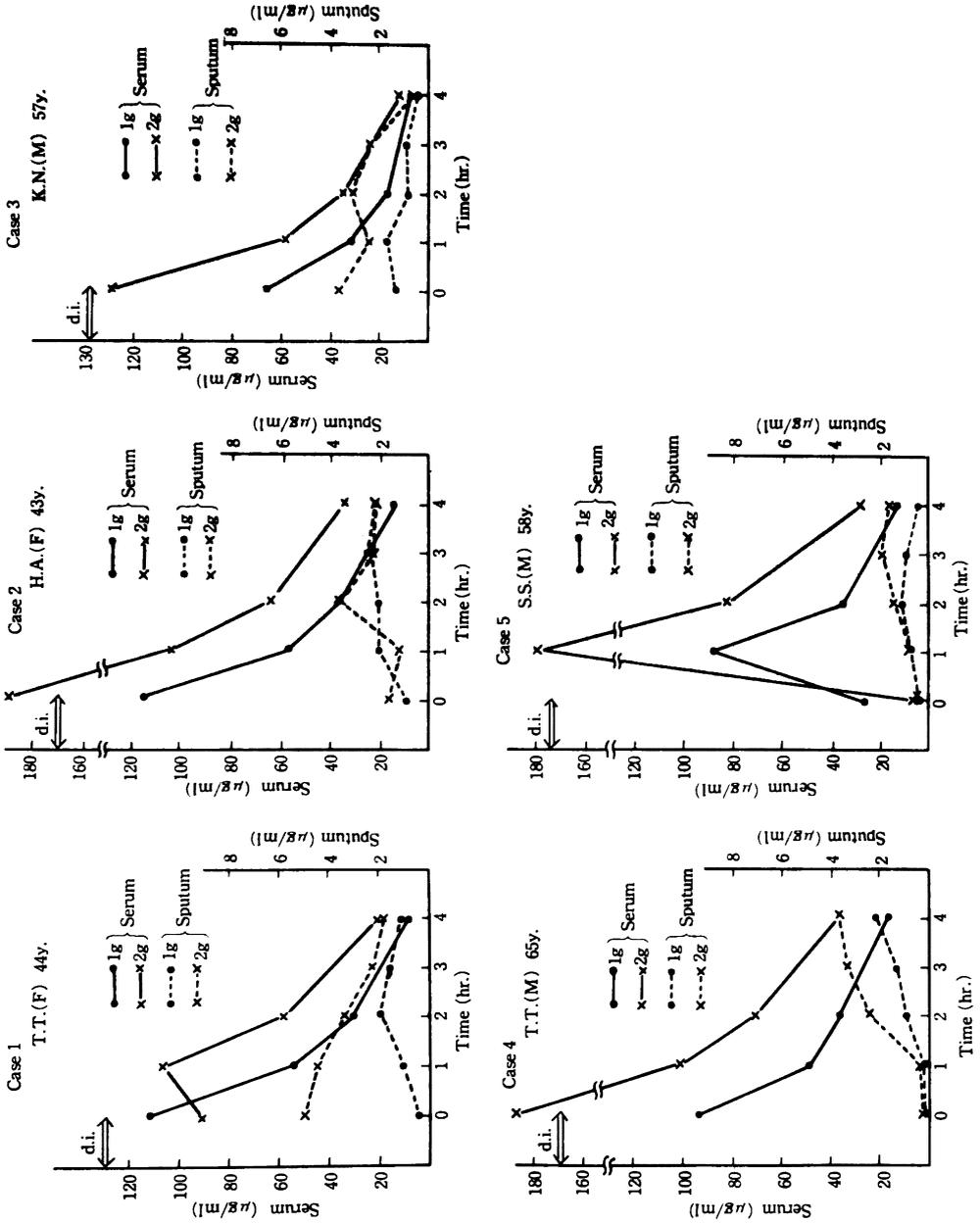
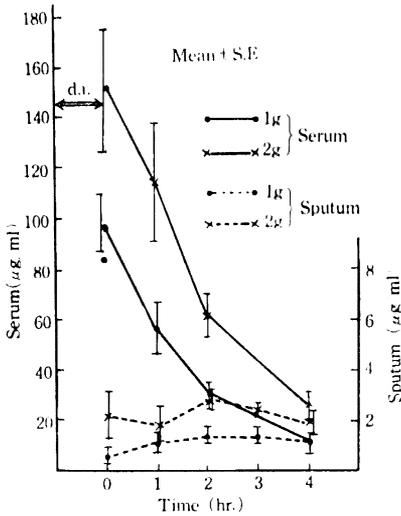


Fig. 8 Mean levels of CBPZ(HPLC) in serum and sputum after drip intravenous administration of 1 g and 2 g of CBPZ



CBPZを点滴静注した時の血清中濃度の経時的推移は5例とも同じような傾向が認められており、1gと2g投与とで明瞭なDose responseを示している。Case 5の場合のみ、点滴終了時点でBioassay法、HPLC法とも血清中濃度がかかなり低く、1時間後にピーク値を示しているがこの原因については不明である。

一方、喀痰中濃度の経時的推移は個人差が大きく血清中濃度のような一定した傾向は認められず、かつ、血中から喀痰へのCBPZの移行は比較的緩慢であった。しかし、一方、2g投与の場合の平均喀痰中濃度は1g投与の場合の約2倍を示し、Dose responseが認められている。

今回、喀痰中移行濃度を検討したCBPZは、呼吸器感染症の主要起炎菌である*S. pneumoniae*、*H. influen-*

zae、*P. aeruginosa*、*K. pneumoniae*、*E. coli*に対して、*P. aeruginosa*を除いては、強い抗菌力を有し、 β -lactamaseに極めて安定である。*P. aeruginosa*を除く上記4菌種の臨床分離株に対するCBPZの80% MIC値は、それぞれ1.0、0.78、0.2および0.2 µg/mlであって、本剤の喀痰中濃度はいずれもそれらの値を上回っており、特に2g投与ではその移行濃度からみて十分な除菌効果が期待できる。

また、Bioassay法とHPLC法との測定値が良く一致していることは、喀痰中でCBPZが十分に安定であることを意味しており、さらに β -lactamaseに安定であることとあいまって、本剤の優れた臨床効果を裏付けているといえる。

文 献

- 1) 第29回日本化学療法学会西日本支部総会、新薬シンポジウムI。T-1982抄録集、1981
- 2) T-1982(Cefbuperazone)論文特集号、Chemotherapy 30(S-3)、1982
- 3) 谷村 弘、小林展章、三木毅一郎、吉田圭介、斎藤 徹、黄 文芳、関谷 司、日笠頼則、大谷淑郎、鈴木和義：胆道感染症の化学療法(XVI)。Chemotherapy 30(S-3)：175~189、1982
- 4) TRAUTMANN, K. H. & P. HAEFELFINGER: Determination of the Cephalosporin RO 13-9904 in Plasma, Urine, and Bile by Means of Ion-Pair Reversed Phase Chromatography. J. H. R. C. and C. C. 4: 54~59, 1981
- 5) DORNBUSCH, K.; C. E. NORD & T. WADSTRÖM: Biochemical Characterization and *in vitro* Determination of Antibiotic Susceptibility of Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis*. Scand. J. Infect Dis. 6: 253~258, 1974
- 6) 平賀洋明、菊地弘毅、中橋 勝：呼吸器感染症に対するCefotetan (YM 09330)の臨床的研究。Chemotherapy 30(S-1)：323~331、1982

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CEFBUPERAZONE IN SPUTUM BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

SHOHEI WATANABE, TAKAYUKI KURIYAMA

NORIO KIKUCHI and NORIKO MURAKI

Department of Chest Medicine, Institute of Pulmonary Cancer Research,
School of Medicine, Chiba University

KUNITOYO SHIBUYA, HIROSHI KISHIDA

KAZUYOSHI SUZUKI and YOSHIRO OHTANI

Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.

The concentration of cefbuperazone (CBPZ), a new cephamycin antibiotic, in human sputum after administration has been quantitatively analyzed using bioassay and HPLC techniques which was applied and improved in this study.

(1) By the removals of mucus and the obstructive substance from sputum as a pretreatment procedure, and the improvement of measurement condition through the selection of monitored wavelength, the quantitative analysis by HPLC was well controlled and coincided with those by bioassay, resulted in the coefficient of correlation being 0.940.

(2) The concentration of CBPZ in sputum was analyzed in five patients with pulmonary disease who were given with 1 g and 2 g via a drip-intravenous infusion for 1 hr. The maximum peak and pattern of concentrations with time of the individual maximum concentration in sputum was detected in the range of 1.2~2.4 $\mu\text{g/ml}$ for 1 g dose and 1.9~5.0 $\mu\text{g/ml}$ for 2 g dose at a dose dependent manner.