

Panipenem/betamipronの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による 体液内濃度測定法に関する検討

久岡正史・長沼英夫
三共株式会社・第一生産技術研究所*

高萩英邦・川原幸則
三共株式会社・分析代謝研究所

山崎泰志
株式会社・科学技術研究所

新規carbapenem系抗生剤panipenem/betamipron(PAPM/BP)およびpanipenem(PAPM)の主代謝物であるR976-2の体液・組織内濃度について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法による定量法を確立し、さらに体液と1M MOPS液(3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid, pH 7.0)を1:1に混合した試料液中のPAPMおよびbetamipron(BP)の安定性について検討した。

1)PAPMのヒト血漿および尿中濃度測定は、試料を希釈してHPLC装置に注入する簡便な方法を採用したもので、回収率は97%以上、また、定量値の変動率(C.V.値)は5.3%以内と良好な定量精度を示した。本定量法により、血漿試料は約0.3 μ g/mlまで、尿試料は約1.0 μ g/mlまで測定可能である。

2)R976-2の測定は、カラムスイッチング法によるHPLC法を用いた。すなわち、血漿試料は除蛋白抽出し、尿試料は希釈してHPLC装置に注入し、前処理カラムで溶出したR976-2分画を分析用カラムに導入して分離定量を行った。回収率は96%以上、C.V.値は4.7%以内と良好な定量精度を示した。本定量法により、血漿試料は約1 μ g/mlまで、尿試料は約5 μ g/mlまで測定可能であった。

3)BPの測定では、血漿試料は除蛋白抽出し、尿試料は希釈してHPLC装置に注入する方法を用いた。回収率はほぼ95%以上と良好で、C.V.値は1.7%以内と良好な定量精度を示した。本定量法により、血漿試料は約0.2 μ g/mlまで、尿試料は約0.5 μ g/mlまで、また組織試料は約0.4 μ g/mlまで測定可能であった。

4)PAPMの試料中での安定性を検討した結果、血漿中では-20 $^{\circ}$ Cで5日間、-80 $^{\circ}$ Cで28日間安定であり、また、尿中では-20 $^{\circ}$ Cで7日間、-80 $^{\circ}$ Cで42日間安定であることが認められた。BPは、血漿、尿試料中共に-20 $^{\circ}$ C、-80 $^{\circ}$ Cいずれの保存でも42日間安定であることが認められた。

Key words : Panipenem, Betamipron, R976-2, HPLC, Body fluids

Panipenem(PAPM)は、三共株式会社において開発されたcarbapenem系抗生物質で、グラム陽性・陰性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを有する¹⁾。本剤は投与後、生体内のdehydropeptidase-I(DHP-I)により分解されて主としてR976-2に変換する²⁾。また、betamipron(BP)は、PAPM高投与量時に誘発される腎毒性を軽減する目的で開発された併合剤であり、PAPMの腎上皮細胞への取り込みを抑制する作用を有する³⁾。

Panipenem/betamipron(PAPM/BP)は、PAPMと

BPの1:1の合剤である。PAPM, R976-2およびBPの化学構造式をFig. 1に示した。

临床上、これらの化合物の体内動態を知ることは、PAPM/BPの有効性を推定する上で重要と考えられる。そこで、PAPM, R976-2およびBPの体液および組織内濃度の測定について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法による検討を行った。また、測定試料の保存を考慮して、試料中でのPAPMおよびBPの安定性についてHPLC法により検討を行った。

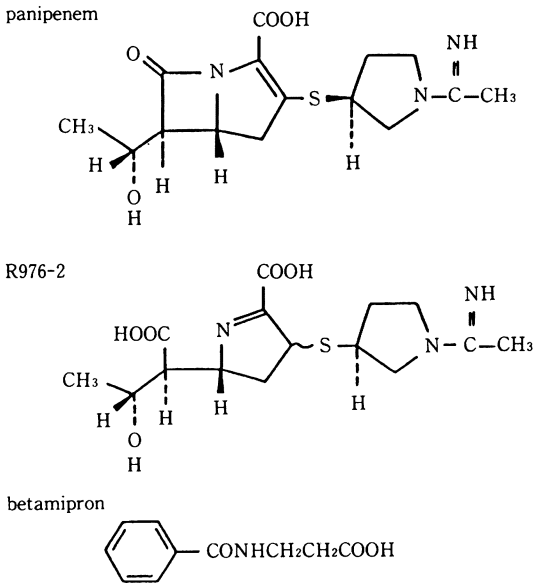


Fig. 1. Chemical structures of panipenem, R976-2, betamipron

I. 実験材料および方法

1. 使用化合物

PAPM (チオ尿素付加体, Lot. CPS-11, 807 μ g (力価)/mg) および R976-2 は, 三共株式会社にて合成したものを使用した。BP (benzoyl- β -alanine) は東京化成工業の試薬特級品を使用した。

HPLC の内部標準物質として chloramphenicol base (シグマ社) および N-benzoyl-DL-alanine (東京化成工業) を使用した。その他の試薬・溶媒類はすべて試薬特級品または HPLC 用溶媒を, 水は脱イオン化蒸溜したものを使用した。

2. 測定試料

添加実験には薬剤を投与していない健康人の血漿および尿を使用し, 1M MOPS 液 (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, pH 7.0) と 1 : 1 に混合した液に化合物を添加して試料溶液とした。HPLC 法と bioassay 法による PAPM 濃度の相関については, PAPM/BP 第 I 相試験における血漿および尿検体を使用した。

3. 高速液体クロマトグラフ装置

島津高速液体クロマトグラフ LC-6A システムを用いた。本システムは, ポンプ: LC-6A, 紫外吸収検出器: SPD-6A, 冷却器付オートサンプラー: SIL-6B/SCL-6B/WIG-7000A, カラム恒温槽: CTO-6A, データ処理装置: C-R4A および カラムスイッチング装置: FCV

-2AH から成る。

4. 試料の測定法

1) PAPM の測定

PAPM 添加のヒト blank 血漿および尿を 1M MOPS 液と 1 : 1 に混合した測定試料液 0.5ml に, 内部標準物質 chloramphenicol base (10 μ g/ml) を含有する 0.5M MOPS 液 0.5ml を加え, エキクロディスク 13[®] (ゲルマン・サイエンス・ジャパン・株) を用いて濾過し, 濾液 10~20 μ l を HPLC 装置に注入して測定を行った。

2) R976-2 の測定

R976-2 添加のヒト blank 血漿を 1M MOPS 液と 1 : 1 に混合した測定試料液 0.5ml に, CH₃CN/CH₃OH (1 : 1) 混合液 0.5ml を加え, 10 分水冷後遠心分離して上澄を得, その 10~20 μ l を HPLC 装置に注入して測定を行った。また, R976-2 添加のヒト blank 尿を 1M MOPS 液と 1 : 1 に混合した測定試料液は 0.5M MOPS 液で 5~10 倍の範囲で希釈した後, エキクロディスク 13[®] で濾過し, その濾液 10~20 μ l を HPLC 装置に注入して測定を行った。なお, R976-2 測定の HPLC 法は, ゲル濾過カラムで粗分離した R976-2 の溶出分画をカラムスイッチング⁴⁾⁵⁾ により ODS 系分析カラムへと導入し, 分離測定を行うもので, ピーク高さによる絶対検量線法で測定した。

3) BP の測定

BP 添加のヒト blank 血漿を 1M MOPS 液と 1 : 1 に混合した測定試料液 0.5ml に, 内部標準物質 N-benzoyl-DL-alanine (20 μ g/ml) を含有する 10% trichloroacetic acid (TCA) 液 0.5ml を添加, 除蛋白して遠心分離し, その上澄 10~20 μ l を HPLC 装置に注入して測定を行った。また, BP 添加の尿およびその他の体液を 1M MOPS 液と 1 : 1 に混合した測定試料液 0.1~0.5ml に, N-benzoyl-DL-alanine (20 μ g/ml) を含む等容量の 0.5M MOPS 液を添加し, 尿試料はエキクロディスク 13[®] で濾過し, その他の体液は濾過しないで, 10~20 μ l を HPLC 装置に注入し測定を行った。

5. PAPM の bioassay 法による測定

Bioassay 法の詳細は別報⁶⁾に記載した。その測定条件の概要は以下の通りである。

測定法: 薄層ディスク法

検定菌: *Bacillus subtilis* SANK 76959

接種量: 1.7 \times 10⁵ CFU/ml・培地

培地: heart infusion agar

6. 血漿, 尿試料中の PAPM および BP の安定性

血漿および尿を 1M MOPS 液と 1 : 1 に混合した液に, PAPM または BP を添加して凍結し, -20 $^{\circ}$ C および -80 $^{\circ}$ C で保存して経時的に残存率を測定した。

II. 結 果

1. PAPMの定量法

ヒトblank血漿または尿にPAPMを添加して調製した試料を、実験方法の項に記載の定量操作法に従って処理し、Table 1に示したHPLC条件で分離定量を行った。この時に得られたクロマトグラムの1例をFig. 2に示した。

Table 1. HPLC conditions for the assay of panipenem in human plasma and urine

| | |
|--------------------|---|
| Column | PartiSphere SCX (7.5mm×12.5cm, Whatman) |
| Column temperature | 35°C |
| Mobile phase | 0.04M Acetate buffer (pH 4.8)/ CH ₃ CN (96:4) |
| Flow rate | 1.5 ml/min |
| Detect | UV 300nm |
| Internal standard | Chloramphenicol base |

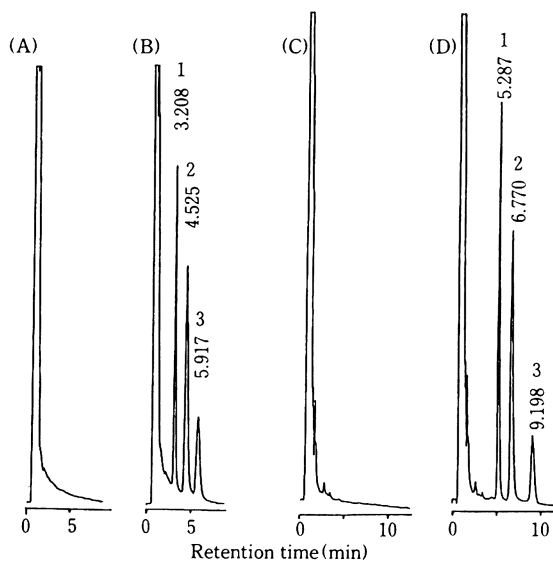


Fig. 2. HPLC chromatograms of panipenem in human plasma and urine.

(A) : blank plasma, (B) : plasma spiked with panipenem 25µg/ml and I.S., (C) : blank urine, (D) : urine spiked with panipenem 25µg/ml and I.S., peak 1 : I.S., peaks 2 and 3 : panipenem

血漿、尿のいずれの試料についても、PAPMおよび内部標準物質のクロマトグラフィー上の分離状況は良好であり、これら化合物のピークの位置には血漿および尿成分のblankピークは認められなかった。PAPMは互変異性体の混合物であるため本測定条件下ではFig. 2に見られるように、ピークNo. 2とNo. 3の2本のピークとして検出された。しかし、互変異性体の吸光係数は等しいことが認められており、定量計算は2つのピーク面積値の和を用いて行った。Fig. 3に内部標準物質に対するPAPMのピーク面積比により作成した検量線を示した。血漿・尿いずれの試料についても、それぞれの検量線は原点を通り、良好な直線性を示した。

本定量操作法によるPAPMの添加回収率を求めるため、ヒトblank血漿および尿にPAPMを加えて調製した測定試料を定量操作法に従って処理し、無処理の標準液を対照として回収率を求めた (Table 2)。血漿については、PAPM濃度が5、10および20 µg/mlとなるように調製し各濃度につき3回の測定で検討した結果、回収率は102.2~104.2%と良好な値を示し、また、定量値の変動率(C.V.値)は1.3~3.5%と小さく定量精度も良好なことが認められた。尿については、PAPM濃度が10、20および40 µg/mlの試料液を調製して同様の検討を行った結果、回収率は97.0~98.4%と良好で、C.V.値は0.9~5.3%と定量精度も満足できるものであった。

本定量法によるPAPMの定量限界は、測定の再現性

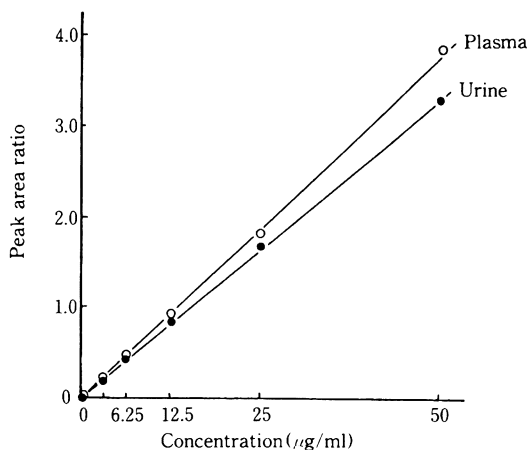


Fig. 3. Calibration curves of panipenem in human plasma and urine.

およびHPLC装置の検出感度等を考慮すると、血漿試料で約0.3 µg/ml、尿試料で約1.0 µg/mlであることが推定された。

HPLC法と抗菌活性によるbioassay法との測定値を比較するために、PAPM/BPの臨床試験で得られた血漿および尿の同一検体をそれぞれの方法で測定し、両測定値の相関性を検討した (Fig. 4, 5)。

Table 2. Recoveries of panipenem from human plasma and urine

| Amount added ($\mu\text{g/ml}$) | Plasma | | Urine | |
|-----------------------------------|-----------------|----------|----------------|----------|
| | Recovery* (%) | C.V. (%) | Recovery* (%) | C.V. (%) |
| 5 | 102.6 \pm 1.9 | 1.9 | — | — |
| 10 | 104.2 \pm 1.3 | 3.5 | 97.0 \pm 5.1 | 5.3 |
| 20 | 102.2 \pm 1.3 | 1.3 | 98.4 \pm 1.8 | 1.8 |
| 40 | — | — | 97.6 \pm 0.9 | 0.9 |

* Mean \pm S.D., n=5

血漿中濃度の相関については、最小二乗法で求めた回帰直線の勾配が1.015, 相関係数 $r=0.996$ ($p<0.01$) と良好な相関性が得られ、両測定値はほぼ等しいことが認められた。また、尿中濃度の相関についても、勾配1.012, 相関係数 $r=0.996$ ($p<0.01$) と良好な相関性が得られて、両測定値はほぼ等しいことが認められた。

以上の結果より、HPLC法とbioassay法による測定値は同等であることが認められ、同時に生体内における活性代謝物等の産生はほとんどないことが推察された。

2. R976-2の定量法

ヒトblank血漿および尿にR976-2を添加して調製した試料を、実験方法の項に記載の定量操作法に従って処理し、Table 3に示したHPLC条件で分離定量を行った。R976-2は通常のHPLC法では生体成分との分離が困難なため、近年その手技が発達してきたカラムスイッチ

ング法^{4,5)}を採用した。すなわち、前処理用カラムで粗分離したR976-2分画を、溶媒の流路系を自動的に切り換えて分析用カラムに導入し、分離定量する方法である。この定量法で得られたクロマトグラムの1例をFig. 6に示した。血漿・尿いずれの試料についても、R976-2の分離状況は良好であり、R976-2のピークの位置に血漿および尿成分のblankピークは認められなかった。

R976-2の測定は絶対検量線法によるもので、データ処理装置により計測されるピーク高の値で検量線作成および濃度算出を行った。血漿および尿試料についての検量線はFig. 7に示した通りで、いずれも原点を通り、極めて良好な直線性を示した。

R976-2をヒトblank血漿および尿に添加して求めた回収率をTable 4に示した。R976-2濃度が10, 20および40 $\mu\text{g/ml}$ の血漿試料液からの回収率は94.6~97.4%と良好で、C.V.値は3.0~4.7%と小さく定量精度の良好なことが認められた。R976-2の尿試料液は、50, 100および200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となるように調製したもので、回収率は97.2~100.5%と良好であり、C.V.値も0.4~2.3%と小さく定量精度の高いことが認められた。

以上の検討結果より、R976-2の定量限界は血漿試料で約1 $\mu\text{g/ml}$ 、尿試料で約5 $\mu\text{g/ml}$ と推定された。

3. BPの定量法

ヒトblank血漿および尿にBPを添加して調製した試料を、実験方法の項に記載の定量操作法に従って処理し、Table 5に示したHPLC条件で分離定量を行った。

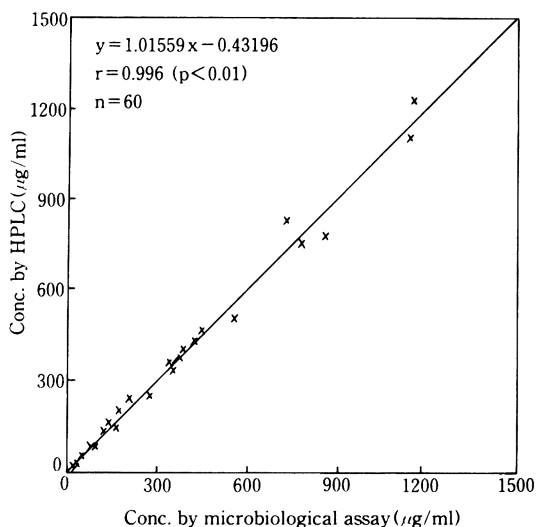


Fig. 4. Relationship between panipenem concentrations in plasma determined by microbiological assay and HPLC.

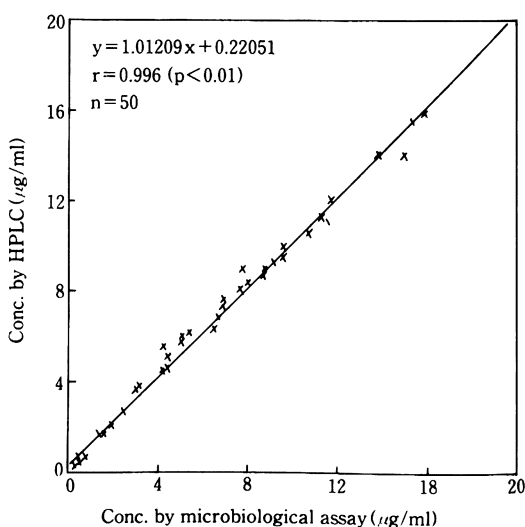


Fig. 5. Relationship between panipenem concentrations in urine determined by microbiological assay and HPLC.

Table 3. HPLC conditions for the assay of R976-2 in human plasma and urine

| Pretreatment | |
|--------------------|---|
| Column | TSK-GEL G2000SW (7.5mm×30cm, Tosoh) |
| Column temperature | Room temperature(25°C) |
| Mobile phase A | 10mM Phosphate buffer (pH6.0)/10mM Na ₂ SO ₄ (1:1, pH5.7) |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Analysis | |
| Column | Zolbax SAX (4.6mm×15cm, Dupont) |
| Column temperature | Room temperature (25°C) |
| Mobile phase B | Mobile phase A/CH ₃ CN (64.5:35.5) |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Detect | UV 220nm |

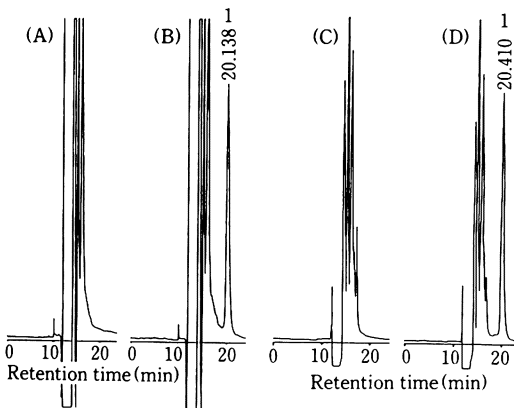


Fig. 6. HPLC chromatograms of R976-2 in human plasma and urine.

(A): blank plasma, (B): plasma spiked with R976-2 40 µg/ml, (C): blank urine, (D): urine spiked with R976-2, 200 µg/ml, peak 1: R976-2

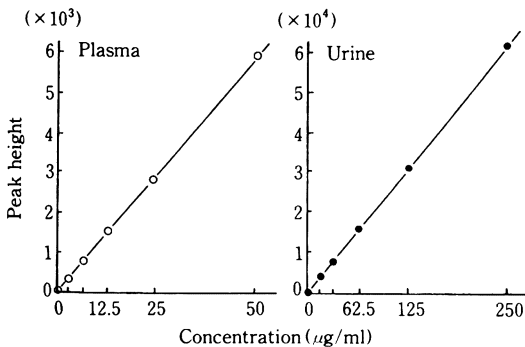


Fig. 7. Calibration curves of R976-2 in human plasma and urine.

この時に得られたクロマトグラムの1例をFig. 8に示した。血漿、尿のいずれの試料についても、BPおよび内部標準物質のクロマトグラフィー上の分離状況は良好であり、これらピーク的位置には血漿および尿成分のblankピークはほとんど見られなかった。内部標準物質に対するBPのピーク面積比により作成した検量線をFig. 9に示した。血漿・尿いずれの試料についても検量線は原点を通り、良好な直線性を示した。

本定量操作によるBPのヒト血漿および尿からの添加回収率をTable 6に示した。血漿、尿試料共にBP濃度が5, 10および20 µg/mlとなるように調製し、各濃度につき3回の測定で添加回収率を求めた。血漿試料については、回収率が93.9~95.7%と良好な値を示し、C.V.値は0.7~1.7%と良好な定量精度を示した。尿試料については、回収率が98.5~102.1%と良好で、C.V.値も0.2~1.4%と良好な定量精度を示した。

以上の検討結果より、BPの定量限界は血漿試料で約0.2 µg/ml、尿試料で約0.5 µg/mlと推定された。なお、種々組織抽出液中BP濃度の測定も血漿試料測定法に準ずるもので、良好な分離のクロマトグラムが得られており約0.4 µg/gまでの測定が可能であった。

4. 血漿、尿試料中のPAPMおよびBPの安定性

PAPMまたはBPを添加したヒト血漿および尿を1M MOPS液と1:1に混合し、-20°Cおよび-80°C保存における経時安定性を検討した(Table 7, 8)。

PAPMは、-20°Cで保存した場合血漿試料液中で5日間、尿試料液中では7日間安定であり、-80°Cで保存した場合には血漿試料液中で28日間、尿試料液中では42日間安定であることが認められた(Table 7)。また、

Table 4. Recoveries of SM-1 from human plasma and urine

| Plasma | | | Urine | | |
|-----------------------------------|----------------|-----------|-----------------------------------|-----------------|-----------|
| Amount added ($\mu\text{g/ml}$) | Recovery* (%) | C. V. (%) | Amount added ($\mu\text{g/ml}$) | Recovery* (%) | C. V. (%) |
| 10 | 96.7 \pm 4.1 | 4.2 | 50 | 99.6 \pm 2.3 | 2.3 |
| 20 | 97.4 \pm 4.6 | 4.7 | 100 | 97.2 \pm 0.3 | 0.4 |
| 40 | 94.6 \pm 2.8 | 3.0 | 200 | 100.5 \pm 0.4 | 0.4 |

* Mean \pm S.D., n=5

Table 5. HPLC conditions for the assay of betamipron in human plasma and urine

| | |
|--------------------|---|
| Column | Cosmosil 5 C ₁₈ (4.6mm \times 15cm, nacalai tesque) |
| Column temperature | 35°C |
| Mobile phase | CH ₃ CN/CH ₃ COOH/H ₂ O (18:1:81) |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Detect | UV 240nm |
| Internal standard | N-benzoyl-DL-alanine |

Table 6. Recoveries of betamipron from human plasma and urine

| Amount added ($\mu\text{g/ml}$) | Plasma | | Urine | |
|-----------------------------------|----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | Recovery* (%) | C. V. (%) | Recovery* (%) | C. V. (%) |
| 5 | 93.9 \pm 1.6 | 1.7 | 102.1 \pm 0.9 | 0.9 |
| 10 | 95.7 \pm 0.9 | 0.9 | 98.5 \pm 1.4 | 1.4 |
| 20 | 95.7 \pm 0.7 | 0.7 | 101.2 \pm 0.1 | 0.2 |

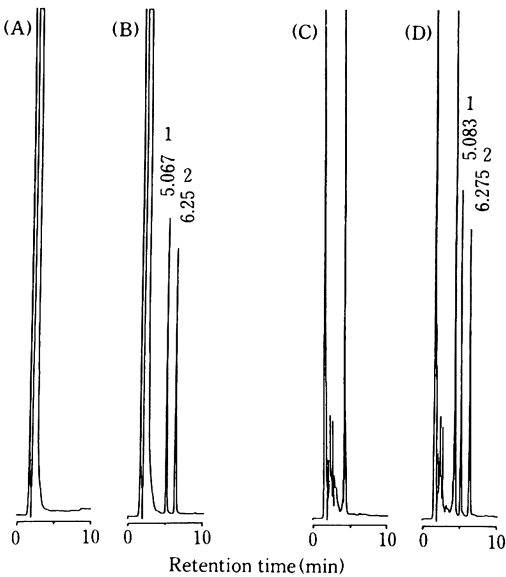
* Mean \pm S.D., n=5

Fig. 8. HPLC chromatograms of betamipron in human plasma and urine.

(A) : blank plasma. (B) : plasma spiked with betamipron 20 $\mu\text{g/ml}$ and I.S., (C) : blank urine, (D) : urine spiked with betamipron, 20 $\mu\text{g/ml}$ and I.S., peak 1; betamipron, peak 2 : I.S.

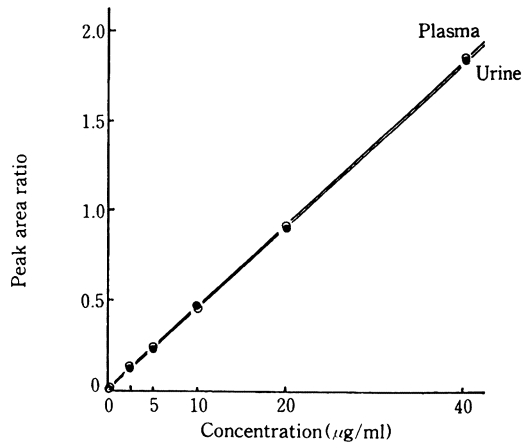


Fig. 9. Calibration curves of betamipron in human plasma and urine.

BPは、血漿、尿試料液中共に、 -20°C 、 -80°C いずれの保存条件下でも42日間安定であることが確認された。

III. 考 察

PAPM/BPの体内動態を検討するため、抗菌活性体PAPM、PAPMの生体内主要代謝物であるR976-2およ

び配合剤BPについて、操作性に優れたHPLC法による生体試料中濃度測定法を確立した。本測定法では、試料の前処理は出来るだけ簡単な操作に設定しており、回収率も95~100%と良好なことから、高い定量精度が得られたものと考えられる。従って、本法は、基礎お

Table 7. Stabilities of panipenem in samples of human plasma and urine after storage at -20°C and -80°C

Mean \pm S.D. (% , n=3)

| Sample | Panipenem ($\mu\text{g/ml}$) | Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | Days | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 5 | 7 | 14 | 28 | 42 |
| Plasma + 1M MOPS (1:1) | 10 | -20 | 100 | 103.2 ± 1.6 | 102.2 ± 0.7 | 98.9 ± 1.4 | 99.2 ± 1.4 | 88.2 ± 0.6 | 78.3 ± 0.7 | 66.1 ± 2.7 |
| | | -80 | 100 | 103.2 ± 2.5 | 103.4 ± 0.4 | 105.1 ± 3.3 | 104.5 ± 1.0 | 102.8 ± 1.0 | 102.8 ± 0.5 | 93.1 ± 1.1 |
| | 50 | -20 | 100 | 107.4 ± 5.4 | 107.3 ± 5.1 | 97.3 ± 2.7 | 97.9 ± 5.3 | 95.3 ± 5.2 | 86.9 ± 7.0 | 73.3 ± 3.1 |
| | | -80 | 100 | 107.3 ± 4.7 | 108.4 ± 4.9 | 105.9 ± 5.5 | 109.2 ± 4.4 | 108.5 ± 6.1 | 112.1 ± 5.8 | 99.9 ± 5.6 |
| Urine + 1M MOPS (1:1) | 50 | -20 | 100 | 100.8 ± 0.6 | — | 97.8 ± 7.9 | 102.8 ± 2.5 | 95.4 ± 5.5 | 84.6 ± 15.3 | 76.3 ± 15.5 |
| | | -80 | 100 | 99.5 ± 1.0 | — | 100.1 ± 2.0 | 106.2 ± 0.6 | 104.9 ± 0.6 | 117.2 ± 2.0 | 107.1 ± 2.1 |
| | 250 | -20 | 100 | 100.8 ± 1.1 | — | 99.9 ± 0.2 | 105.6 ± 1.9 | 96.9 ± 5.2 | 84.7 ± 12.0 | 79.9 ± 12.6 |
| | | -80 | 100 | 100.2 ± 0.5 | — | 101.7 ± 2.3 | 110.3 ± 1.2 | 109.2 ± 1.1 | 111.9 ± 2.5 | 108.5 ± 0.9 |

Table 8 Stabilities of betamipron in samples of human plasma and urine after storage at -20°C and -80°C

Mean \pm S.D. (% , n=3)

| Sample | Betamipron ($\mu\text{g/ml}$) | Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | Days | | | | | | | |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 5 | 7 | 14 | 28 | 42 |
| Plasma + 1M MOPS (1:1) | 10 | -20 | 100 | 99.6 ± 2.8 | 100.1 ± 0.6 | 100.1 ± 0.6 | 104.3 ± 4.1 | 106.5 ± 2.0 | 99.5 ± 2.3 | 103.8 ± 0.9 |
| | | -80 | 100 | 98.0 ± 2.2 | 98.5 ± 2.9 | 98.1 ± 2.6 | 103.7 ± 3.2 | 101.2 ± 2.5 | 96.9 ± 0.8 | 101.7 ± 2.5 |
| | 50 | -20 | 100 | 98.3 ± 1.5 | 97.5 ± 1.6 | 99.7 ± 0.2 | 103.5 ± 1.1 | 108.3 ± 2.6 | 99.3 ± 1.7 | 105.2 ± 1.3 |
| | | -80 | 100 | 100.5 ± 0.5 | 98.4 ± 2.5 | 99.8 ± 1.8 | 107.0 ± 4.3 | 104.6 ± 1.9 | 98.7 ± 1.7 | 103.0 ± 1.9 |
| Urine + 1M MOPS (1:1) | 50 | -20 | 100 | — | 100.5 ± 0.4 | — | 95.9 ± 5.3 | 98.1 ± 3.5 | 98.9 ± 1.5 | 99.5 ± 2.3 |
| | | -80 | 100 | — | 98.0 ± 1.3 | — | 95.1 ± 2.8 | 100.1 ± 2.5 | 98.0 ± 0.8 | 100.3 ± 1.7 |
| | 250 | -20 | 100 | — | 101.7 ± 2.5 | — | 100.1 ± 6.1 | 102.4 ± 1.8 | 102.0 ± 2.0 | 100.5 ± 2.0 |
| | | -80 | 100 | — | 100.4 ± 2.7 | — | 97.4 ± 3.4 | 102.4 ± 2.9 | 100.4 ± 2.3 | 102.2 ± 0.9 |

よび臨床における薬物動態研究に対応できる測定方法である。また、PAPMに関しては、このHPLC法とbioassay法との測定値が1:1の高い相関性を示すことから、臨床におけるdrug monitoringのための薬物濃度測定法としても本法が有用であると考えられる。

血漿および尿試料中でのPAPMは、 -80°C に凍結保存すればそれぞれ28日間および42日間は安定であり、BPはいずれの試料中においても -20°C 以下に保存すれば42日間は安定であることが確認された。従って、PAPM/BP投与後得られた体液試料は、直ちに1M MOPS液と混合して -80°C で凍結保存することとした。組織試料は採取後ドライアイス・アセトンで凍結し、 -80°C 保存とした。また、これら測定試料は出来るだけ速やかに定量分析を行うこととした。

文 献

- 1) 宇津井幸男, 他: Panipenem/betamipronに関する細菌学的評価(第1報) *In vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 39(S-3): 83~101, 1991
- 2) 高萩英邦, 広田孝司, 松下洋子, 村松重基, 田中実, 松尾英一: デヒドロペブチダーゼ-I(DHP-I)の組織内分布の種差とpanipenemの代謝に及ぼす影響. *Chemotherapy* 39(S-3): 236~241, 1991
- 3) 長沼英夫, 広内康邦, 川原幸則, 乾賢一, 谷川原祐介, 安原真人, 堀了平, 桑原章吾: Betamipronの腎毒性軽減作用とその作用機序(2)—腎排泄挙動との関連一. *Chemotherapy* 39(S-3): 178~189, 1991
- 4) Takahagi H, and Imai K: Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis. p. 453~457, Marcel Dekker, Inc., New York, 1991
- 5) 北村宏之, 林守正, 三上博文, 石田泰夫: 前処理を自動化した高速液体クロマトグラフィーによる血清中薬物の定量. *分析化学* 35:236~240, 1986
- 6) 久岡正史, 市川正人, 寺尾俊雄: Panipenemのbioassay法による体液内濃度測定法に関する検討. *Chemotherapy* 39(S-3): 190~196, 1991

1) 宇津井幸男, 他: Panipenem/betamipronに関する

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) FOR THE DETERMINATION OF PANIPENEM/BETAMIPRON CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

Masafumi Hisaoka¹⁾, Hideo Naganuma¹⁾, Yasushi Yamazaki²⁾,
Hidekuni Takahagi³⁾ and Yukinori Kawahara³⁾

¹⁾Product Development Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

2-58 Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan

²⁾Institute of Science Technology, Inc.

³⁾Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

High-performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the determination of concentrations of panipenem/betamipron (PAPM/BP), combination of a new carbapenem antibiotics, panipenem (PAPM), and an anionic transport inhibitor, betamipron (BP), and R976-2, main metabolite of PAPM. And also, stabilities of PAPM and BP in samples prepared by mixing body fluids and 1M MOPS solution (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid, pH 7.0) equivalently, were studied.

1) PAPM concentrations in human plasma and urine were determined by HPLC method with simple pretreatment of assay samples. Recoveries from plasma or urine were more than 97% and C.V. values were less than 5.3%, suggesting good accuracy of this method. Determination limits were about 0.3 $\mu\text{g/ml}$ for plasma and about 1.0 $\mu\text{g/ml}$ for urine.

2) R976-2 concentrations in plasma and urine were determined by column switching HPLC method. Recoveries from plasma and urine were approximately 100% and C.V. values were less than 4.7%, suggesting good accuracy of the method. Determination limits were about 1 $\mu\text{g/ml}$ for plasma and about 5 $\mu\text{g/ml}$ for urine.

3) BP in human plasma and urine were determined by HPLC method after extraction or dilution. Recoveries were approximately 95% and C.V. values were less than 1.7%, suggesting good accuracy of this method. Determination limits were about 0.2 $\mu\text{g/ml}$ for plasma, about 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for urine and about 0.4 $\mu\text{g/g}$ for tissues.

4) PAPM in plasma sample was stable for 5 days at -20°C and 28 days at -80°C , and also that in urine sample was stable for 7 days at -20°C and 42 days at -80°C . And BP in plasma and urine samples was stable for 42 days at both temperatures of -20°C and -80°C .