

## 高速液体クロマトグラフィーによる ritipenem の ヒト血漿および尿中濃度測定法

松岡正之・細見律子・真木照雄・伴野 清・佐藤忠司  
田辺製薬株式会社分析化学研究所\*

高速液体クロマトグラフィーによるヒト血漿および尿試料中の ritipenem (RIPM) の定量法について検討し、臨床試験における体液内濃度測定法を設定した。

試料は限外ろ過による前処理後、グラジエントモードの逆相カラムに注入した。注入法として、血漿試料はサンドイッチ法を、尿試料は直接法を用いた。本法は血漿および尿成分から目的成分を良好に分離でき、かつ、ブランク血漿あるいはブランク尿に添加して作成した検量線は原点を通る良好な直線性を示した。本法により血漿試料中 0.05~5.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲の RIPM を日内精度 4.8%, 日間精度 3.2% 以下でそれぞれ測定することができた。同様に尿試料についても、2.5~1000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で日内精度 11.9%, 日間精度 7.5% 以下でそれぞれ測定することができた。検出限界は、血漿中が約 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , 尿中では約 1.0  $\mu\text{g/ml}$  であった。

血漿中の RIPM は安定化剤を添加することにより、 $-20^{\circ}\text{C}$  および  $-80^{\circ}\text{C}$  保存で少なくとも約 1 ヶ月間は安定であった。

Ritipenem acoxil (RIPM-AC) を投与した臨床検体中の RIPM を本法で測定した結果は、血漿および尿ともに生物学的測定法による測定結果と良好な相関性を示した。

**Key words :** ritipenem acoxil, ritipenem, HPLC, plasma, urine

Ritipenem acoxil (RIPM-AC) は、1982 年にイタリアのファルミタリア カルロエルバ社 (現 ファルマシア社) で創製されたペネム系の新規経口抗生物質<sup>1)</sup> であり、その化学名は、(+)-(5R, 6S)-acetoxymethyl 3-carbamoyloxymethyl -6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylate monohydrate で示される。本剤は活性本体である ritipenem (RIPM) の 2 位カルボン酸に、アセトキシメチル基をエステル結合させることにより経口吸収を高めたもので、経口投与時には主に腸管壁のエステラーゼにより加水分解されて、活性な RIPM として循環血中に移行するプロドラッグである。

活性本体である RIPM は各種  $\beta$ -ラクタマーゼに安定であり、グラム陽性菌、グラム陰性菌に広範囲な抗菌スペクトルを有し、特に好気性グラム陽性菌ならびに嫌気性菌に対し、優れた抗菌力を示す<sup>2)</sup>。

今回著者らは、各種臨床検体中の RIPM の濃度測定に対応するために、ヒト血漿および尿試料を対象に、前処理操作が簡便で、測定感度に優れた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる測定法を検討した。さらに RIPM の生体試料中における安定性についても検討したので、以下に報告する。

### I. 試験方法

#### 1. 試料および試薬

RIPM (Lot. No. 003/7) は、ファルミタリア カルロエルバ社 (FCE 社) で合成されたものを用いた。アセトニトリルは和光純薬社製の HPLC 用を、3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) は和光純薬社製の試薬特級を用いた。その他の試薬は、市販の試薬特級を使用した。また、限外ろ過器はアミコン社製のセントリフリー (MPS-3) を使用した。ヒトブランク血漿および尿は健康人からそれぞれ採取し、使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 2. 標準溶液

RIPM 10 mg (力価) をとり、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 4.5) : アセトニトリル混液 (3 : 2) を加えて溶かし正確に 10 ml とし、標準原液とした。標準原液は適宜蒸留水で希釈し、標準溶液とした。なお、標準溶液は用時調製とした。

#### 3. 安定化剤

MOPS 104.6 g に蒸留水を加えて 500 ml とし、6N 水酸化カリウム溶液で pH 5.0 に調整した。これに等容量のエチレングリコールを加えてよく混合して安定化剤とし、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 4. 器具および装置

RIPM 測定のための HPLC 用分析カラムは、COSMOSIL5C<sub>18</sub> (4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mm, NACALAI

TESQUE 社製) にガードカラムとして LiChroCART 4-4 RP-18 (5  $\mu$ m, Merck 社製) を装着して用いた。HPLC 装置は島津製作所製 LC-10AD 型高速液体クロマトグラフを用い、データ処理には島津製作所製 C-R7A 型を使用した。

#### 5. 血漿および尿試料の操作法

血漿試料 0.5 ml (安定化剤 0.25 ml を含む) に蒸留水あるいは標準溶液 0.05 ml および 40 mM SDS 溶液 0.1 ml を加えて攪拌し、限外ろ過 (1200 g, 3 時間, 4  $^{\circ}$ C) を行い試料溶液とした。

尿試料 (等容量の安定化剤を含む) は、蒸留水で 50 倍に希釈した尿試料希釈液 0.5 ml に、蒸留水あるいは標準溶液 0.05 ml および 5 mM SDS 溶液 1.5 ml を加えて攪拌し、限外ろ過 (1200 g, 10 分間, 4  $^{\circ}$ C) を行い試料溶液とした。

#### 6. HPLC 測定条件

移動相は、A 液として 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.7), B 液は A 液とアセトニトリルを 3 : 2 に混合して使用した。グラジエント条件は、5 分まで B 液を 0 % で保持した後、25 分に B 液が 50 % となるように直線的に増加させた。その後 1 分間同条件で保持し、次の 5 分間で B 液が 100 % になるように直線的に増加させた。次に、初期条件で 10 分間保持した。流速は 1.0 ml/min で送液し、320 nm における吸光度を測定した。カラム温度は 40  $^{\circ}$ C に設定した。

#### 7. HPLC 注入法

血漿試料についてはサンドイッチ法を用いた。すなわち、試料溶液の両側を 0.05 ml の 1 M リン酸塩緩衝液 (pH 2.5) で挟み込み注入した。尿試料については直接注入した。

#### 8. 血漿中の検量線および添加回収率

血漿試料 0.5 ml (安定化剤 0.25 ml を含む) に RIPM 添加用標準溶液 (0, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 12.5 および 25.0  $\mu$ g/ml) 各 0.05 ml を加えて攪拌し、操作法に従い試料溶液とした。試料溶液の 50  $\mu$ l を HPLC に注入し、血漿中 RIPM 濃度に対するピーク面積をプロットし、検量線を作成した。

また、血漿試料 0.5 ml (安定化剤 0.25 ml を含む) に

RIPM 添加用標準溶液 (0.25, 2.5 および 25  $\mu$ g/ml) 各 0.05 ml を加えて操作し、試料溶液とした。別に安定化剤を蒸留水で 1/2 に希釈した溶液 0.5 ml に RIPM 添加用標準溶液各 0.05 ml を加えて標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液の各 50  $\mu$ l を HPLC に注入し、RIPM のピーク面積から回収率を求めた。

#### 9. 尿中の検量線および添加回収率

尿試料希釈液 0.5 ml に RIPM 添加用標準溶液 (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 および 100.0  $\mu$ g/ml) 各 0.05 ml を加えて操作し検量線を作成した。

また、尿試料希釈液 0.5 ml に RIPM 添加用標準溶液 (0.25, 5.0 および 100.0  $\mu$ g/ml) 各 0.05 ml を加えて同様に操作し、試料溶液とした。別に蒸留水 0.5 ml に RIPM 添加用標準溶液各 0.05 ml を加えて標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液の各 50  $\mu$ l を HPLC に注入し RIPM のピーク面積から回収率を求めた。

## II. 結 果

### 1. 検量線および添加回収率

ヒトブランク血漿に RIPM を 0 ~ 5.0  $\mu$ g/ml の濃度範囲で添加して得られた検量線は、Fig. 1 に示すように原点を通る良好な直線性を示し、その相関係数は 0.9998 であった。また、血漿に RIPM を 0.05, 0.5 および 5.0  $\mu$ g/ml の濃度で添加した時の回収率は、Table 1

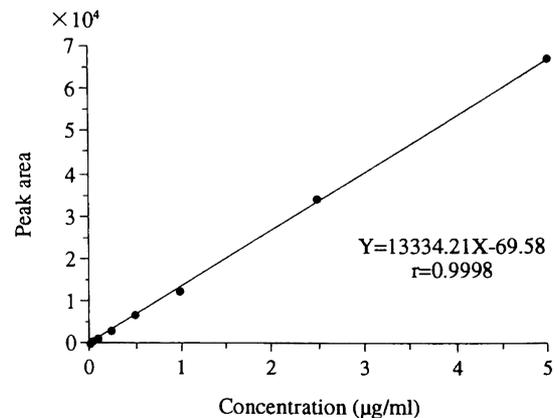


Fig. 1. Calibration curve for ritipenem in plasma

Table 1. Recovery of ritipenem from human plasma and urine

Sample	Concentration added ( $\mu$ g/ml)	Recovery (%)						Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5	6	
Plasma	0.05	99.1	101.7	98.3	95.5	103.6	97.2	99.2 $\pm$ 2.97
	0.5	98.2	101.0	100.9	96.1	100.4	100.5	99.5 $\pm$ 1.96
	5.0	103.0	107.4	103.6	103.6	102.5	105.8	104.3 $\pm$ 1.89
Urine	2.5	83.5	78.3	92.0	78.5	70.3	78.0	80.1 $\pm$ 7.20
	50.0	100.7	99.6	99.2	99.2	100.2	98.8	99.6 $\pm$ 0.71
	1000.0	102.3	101.4	100.7	102.5	101.2	102.0	101.7 $\pm$ 0.70

に示すように、平均回収率 (n=6) が、それぞれ 99.2, 99.5 および 104.3% であった。標準偏差 (SD) は、それぞれ 2.97, 1.96 および 1.89 となり、いずれの濃度においても良好な値を示した。

尿についても、0~1000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲における検量線を求めた結果、Fig. 2 に示すように良好な直線性を示し、その相関係数は 0.9997 であった。また、2.5, 50 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加した時の回収率は、それぞれ 80.1, 99.6 および 101.7%, 標準偏差についてもそれぞれ 7.20, 0.71 および 0.70 と良好な再現性を示した。

なお、検出限界は、血漿中が 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , 尿中が 1.0  $\mu\text{g/ml}$  であった。Fig. 3 および 4 にクロマトグラム例を示した。

## 2. 正確度および精度

本法における血漿および尿試料測定時の正確度および精度に関する結果を、Table 2 に示した。

血漿試料について、RIPM の正確度は各日の各濃度で 96.0~103.8% の範囲内であり、反復測定を含めた日間の正確度は 98.7~101.9% の範囲内であった。測定精度は各日の各濃度で 4.8% 以下であり、反復測定を含めた日間の精度は 3.2% 以下であった。

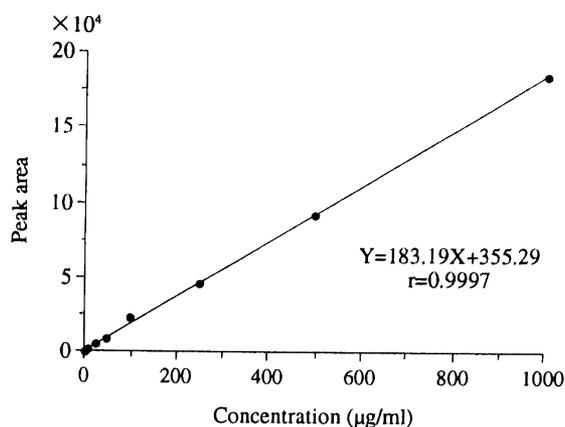


Fig. 2. Calibration curve for ritipenem in urine

尿試料についても、RIPM の正確度は各日の各濃度で 81.1~100.5% の範囲内であり、反復測定を含めた日間の正確度は 83.9~99.9% の範囲内であった。測定精度は各日の各濃度で 12% 以下であり、反復測定を含めた日間の精度は 8% 以下であった。

## 3. 安定性

### 1) 標準溶液

RIPM は標準原液として、4℃で保存することによ

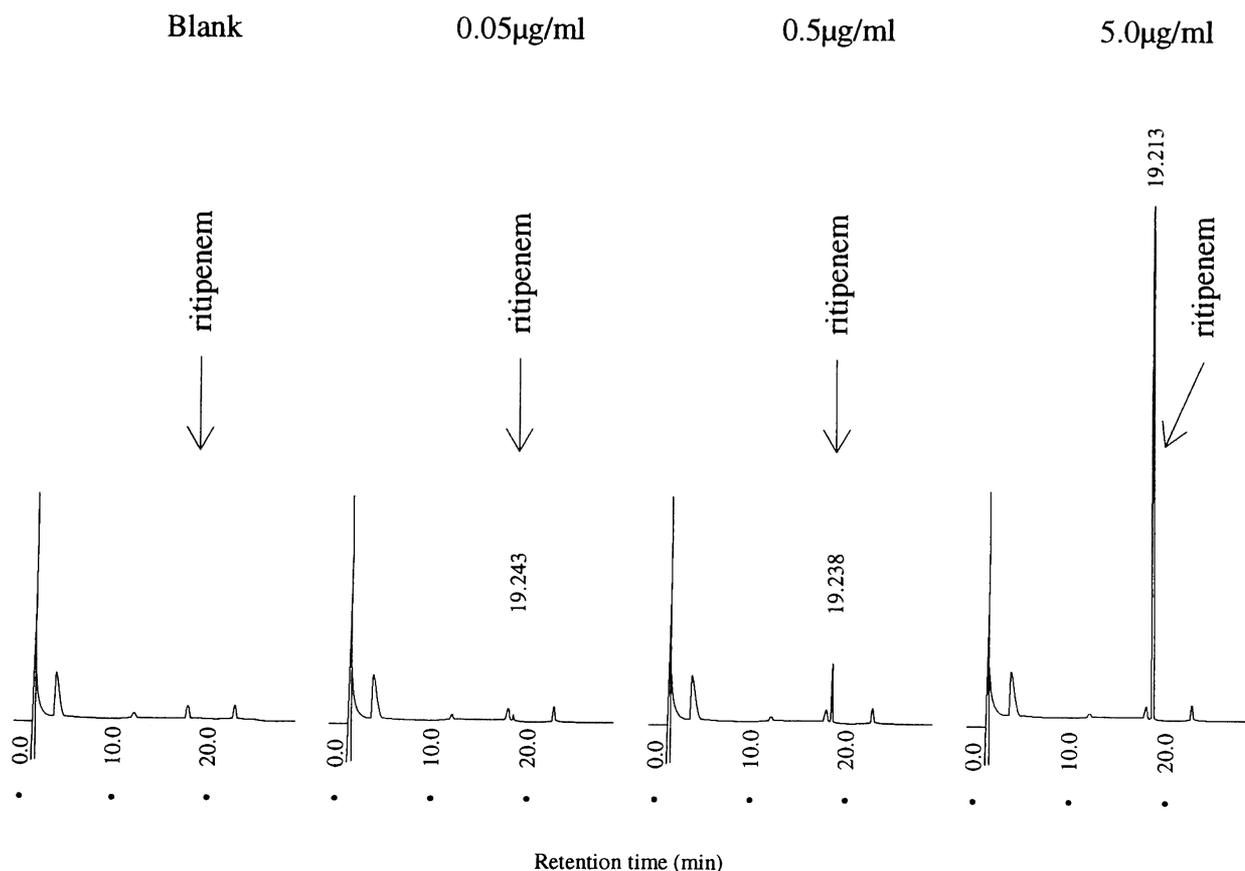


Fig. 3. Typical chromatograms of blank plasma and blank plasma spiked with ritipenem

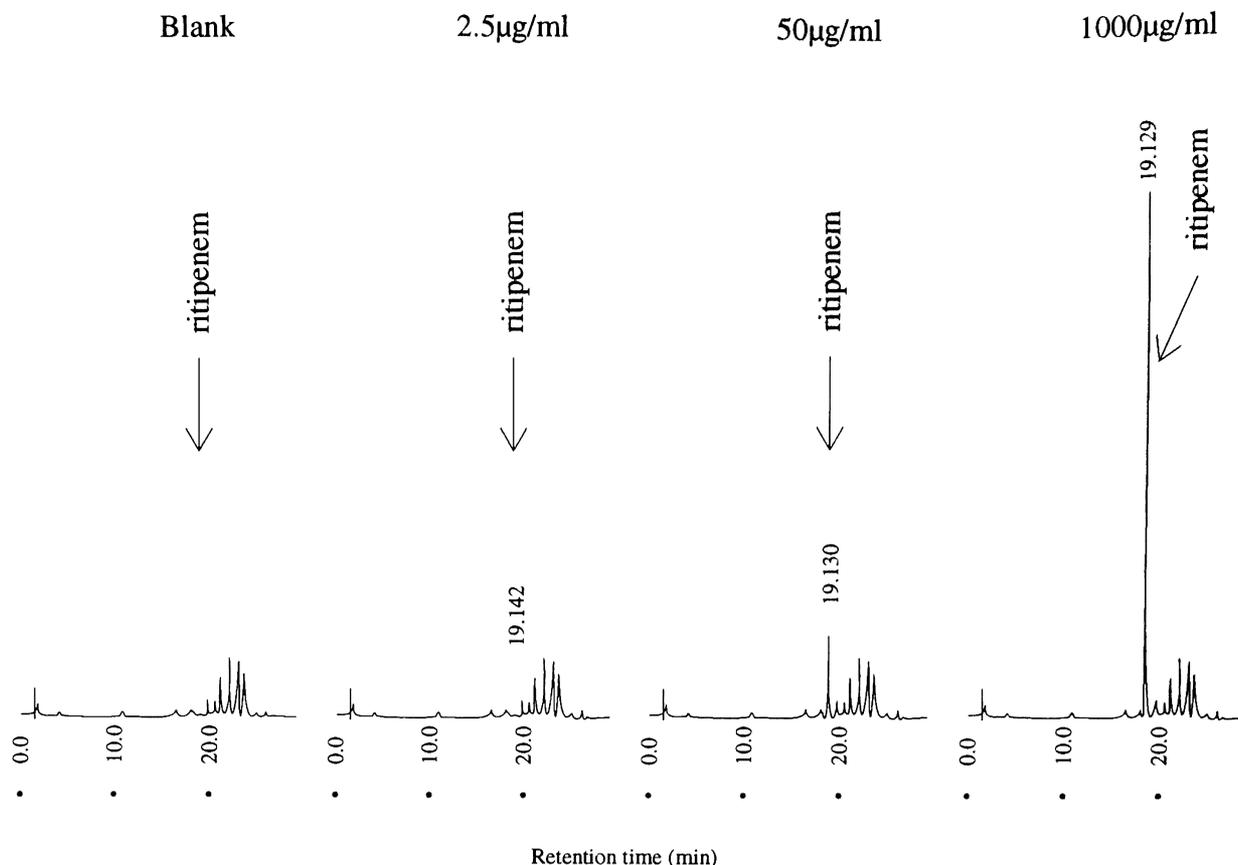


Fig. 4. Typical chromatograms of blank urine and blank urine spiked with ritipenem

Table 2. Accuracy and precision for plasma and urine samples spiked with ritipenem

Concentration added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Day 1			Day 2			Day 3			Day 4			Mean		
	found ( $\mu\text{g/ml}$ )	accuracy (%)	precision** (%)	found ( $\mu\text{g/ml}$ )	accuracy (%)	precision** (%)	found ( $\mu\text{g/ml}$ )	accuracy (%)	precision** (%)	found ( $\mu\text{g/ml}$ )	accuracy (%)	precision** (%)	found ( $\mu\text{g/ml}$ )	accuracy (%)	precision** (%)
Plasma															
0.050	0.049	98.9	4.8	0.049	98.8	1.3	0.049	97.9	2.1	0.049	99.1	1.3	0.049	98.7	2.4
0.500	0.518	103.6	2.7	0.494	98.9	1.0	0.502	100.3	0.7	0.480	96.0	0.8	0.499	99.7	3.2
5.000	5.077	101.5	0.2	5.187	103.8	2.4	5.135	102.7	0.7	4.970	99.4	0.6	5.092	101.9	2.0
Urine															
2.50	2.06	82.3	8.4	2.03	81.1	11.9	2.17	86.6	7.3	2.14	85.6	2.8	2.10	83.9	7.5
50.00	49.35	98.7	0.4	49.19	98.4	0.6	49.79	99.6	1.0	49.63	99.3	0.8	49.49	99.0	0.8
1000.00	990.35	99.0	1.0	997.95	99.8	0.7	1005.13	100.5	0.6	1001.86	100.2	1.0	998.82	99.9	0.9

Measured data are expressed as means(n=3)

accuracy\* : (found/added)×100

precision\*\* : coefficient of variation

り3日間の安定性が確保されたが、通常、用時調製で使用した。

## 2) 血漿試料

RIPMは血漿あるいは尿中では極めて不安定な化合物であり、 $-20^{\circ}\text{C}$ の凍結保存においても分解が生じることが確認されている。このため、血漿に等容量のpH 5.0および6.8 MOPSを安定化剤として添加し、 $-20^{\circ}\text{C}$ および $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した時の経時的な安定性を検討した。その結果、 $-20^{\circ}\text{C}$ で28日間保存後のRIPMの残存

率はpH 5.0 MOPS添加の条件で94.2%、pH 6.8 MOPS添加の条件で86.7%、無添加の条件で49.0%となり、pH 5.0 MOPSの添加が安定化の向上に有効であることがわかった。また、 $-80^{\circ}\text{C}$ の場合は28日間保存で、いずれの条件下でも93%以上の残存率が得られ、安定性が確保された (Fig. 5)。

## 4. 生物学的測定法との比較

臨床試験における血漿および尿試料中のRIPM濃度を、本法および生物学的測定法<sup>3)</sup>(bioassay)により測

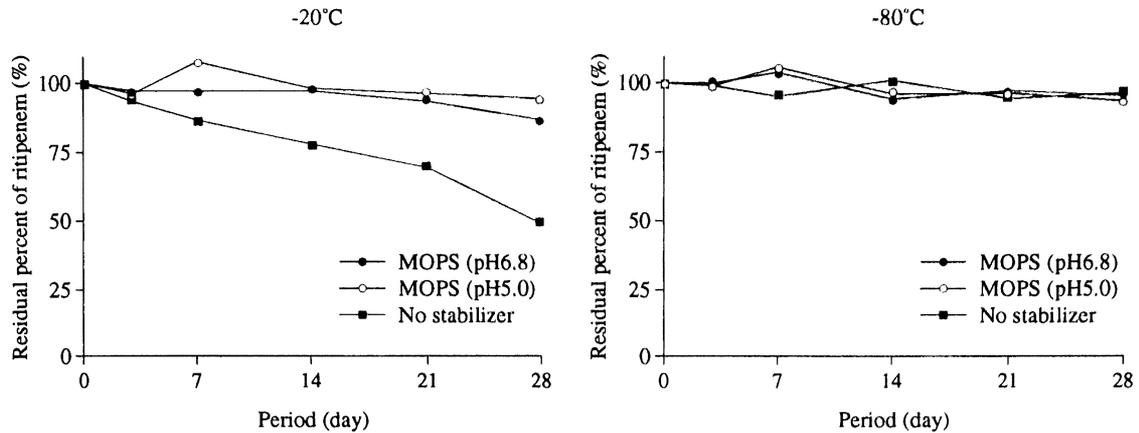


Fig. 5. Stability of ritipenem in samples of human plasma after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $n=1-2$ )

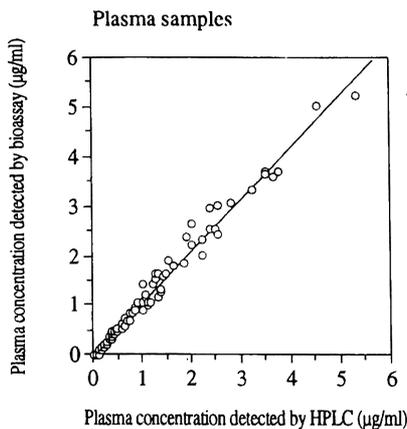


Fig. 6. Correlation between ritipenem concentrations obtained by bioassay and HPLC

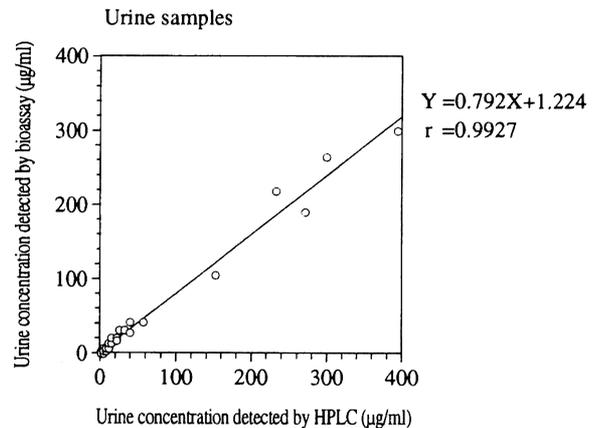


Fig. 7. Correlation between ritipenem concentrations obtained by bioassay and HPLC

定した実測値を比較し、相関性を求めた。血漿および尿試料における相関係数は、それぞれ 0.9933 ( $n=126$ ) および 0.9927 ( $n=48$ ) となり、本法と生物学的測定法による RIPM 測定値間にはいずれも良好な相関関係が認められた (Fig. 6, 7)。

### III. 考 察

ペネム系など  $\beta$ -ラクタム系の抗生物質の多くは、強酸およびアルカリ溶液など化学的に、あるいは酵素的に極めて不安定であることから、生体試料中の薬物濃度測定における前処理操作には、限られた方法しか選択することができない。

近年、前処理操作の簡略化を目的としたカラムスイッチングによる自動分析法が定量法に採用されるようになってきている<sup>4)</sup>。抗生物質の生体試料中測定法についてもカラムスイッチングを用いた HPLC 法<sup>5)</sup>の報告がみられる。しかし、この方法を数多くの臨床検体の分析手段として用いることは、複雑化した装置のメインテナ

ンスの面で、あるいは再現性などの測定精度の面で、いくつかの問題点を抱えている。

今回設定した限外ろ過を用いる HPLC 法は、血漿あるいは尿試料を直接 HPLC に注入する方法ではないが、簡便な前処理法で RIPM を十分な精度と正確さで測定することが可能であった。また、本法は HPLC 装置への注入法として、サンドイッチ法<sup>6)</sup>を採用した。通常の直接注入法では、血漿試料に添加した安定化剤中のエチレングリコールの影響で、カラムの先端に達するまでに試料溶液が拡散し、RIPM は鋭敏なピーク形状を示さず、かつ、測定感度の低下を招いた。しかし、本サンドイッチ法は、試料溶液の両側を 1M リン酸塩緩衝液で挟み込む方法であり、注入時の溶液層の状態がカラム内で維持される利点があった。このため、拡散によるピークテーリングやリーディング現象は見られなかった。注入された RIPM は、鋭敏なピーク形状を示し、その結果として、血漿中 RIPM の検出限界は、約 0.01  $\mu\text{g/ml}$  とペネム系抗菌剤としては比較的高感度の分析

が可能となった。尿試料については、蒸留水で50倍に希釈した後、直接注入する方法を用いた。

以上の検討結果から、本法は、RIPM-AC投与後の血漿および尿中RIPM濃度を十分な検出力で測定できることがわかった。また、本HPLC法によるRIPMの定量値は、生物学的測定法との間に良好な相関性を示したことから、臨床検体中のRIPMの測定法として十分な適用性を有することが確認できた。なお、血漿中RIPMの安定性については、安定化剤を添加することにより、 $-20^{\circ}\text{C}$ においても28日間の保存で残存率の低下はなく、安定性は確保された。

#### 文 献

1) Franceschi G, Foglio M, Alpegiani M, Battistini C, Bedeschi A, Perrone E, Zarini F, Arcamone F, Della C B, Sanfilippo A : Synthesis and biological properties of sodium (5R, 6S, 8R)-6-n-hydroxyethyl-2-carbamoyloxymethyl-2-penem-3-carboxylate (FCE 22101) and its orally absorbed esters

FCE22553 and FCE22891. *Journal of Antibiotics*, 36 : 938~941, 1983

- 2) 熊澤浄一 : 第42回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム。FC/TA-891, 福岡, 1994
- 3) 武田勝男, 矢野 茂, 平野直光, 松下忠弘, 大橋元明, 山口東太郎 : Ritipenem acoxil の Bioassay 法による体液内濃度測定法。日本化学療法学会雑誌 43 (S-3) : 97~102, 1995
- 4) 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
- 5) 富尾貞治, 納田浩司, 上月康生, 加藤益弘, 奥田隆夫, 深澤万左友 : Meropenem のヒト体液および組織内濃度測定法。Chemotherapy, 40 : 114~122, 1992
- 6) Claessens H A, Kuyken M A J : A comparative study of large volume injection techniques for micro bore columns in HPLC. *Chromatographia*, 23 : 331~336, 1987

## Determination of ritipenem in human plasma and urine by high performance liquid chromatography

Masayuki Matsuoka, Ritsuko Hosomi, Teruo Maki,  
Kiyoshi Banno and Tadashi Sato

Analytical Chemistry Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,  
3-16-89, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

A high performance liquid chromatographic method was developed for determination of ritipenem (RIPM), the active metabolite of ritipenem acoxil (RIPM-AC) ((+)-(5R, 6S)-acetoxymethyl 3-carbamoyloxymethyl-6-((1R)-1-hydroxyethyl)-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo(3.2.0)hept-2-ene-2-carboxylate monohydrate), in human plasma and urine. Plasma samples were deproteinized by the ultrafiltration method, and the filtrates were analyzed by a reversed-phase column using the two-sided bracketing injection technique. In the plasma samples spiked with RIPM, the calibration curve showed good linearity in the range of 0-5.0  $\mu\text{g/ml}$ . The recovery of RIPM was quantifiable; coefficients of within-day and between-day variation were less than 4.8% and 3.2%, respectively. In the urine samples spiked with RIPM, the calibration curve in the range of 0-1000  $\mu\text{g/ml}$  and the reproducibilities were similarly satisfactory. The determination limits were 0.05  $\mu\text{g/ml}$  in plasma and 2.5  $\mu\text{g/ml}$  in urine. The stability of RIPM in plasma was confirmed at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a month in addition to stabilizer. Correlations between the proposed method and bioassay were satisfactory for both plasma and urine samples.