(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
論文
26.5: 505 — 509 (2000)

高速液体クロマトグラフィーによる新生児血漿中パニペネム濃度の測定

国分秀也*†¹, 木村利美†¹, 村瀬勢津子†¹, 島田慈彦†¹, 久保博昭†²,
松本真紀†³, 野渡正彦†³, 松浦信夫†³

北里大学病院薬剤部†¹

北里大学薬学部†²

北里大学医学部小児科†³

Determination of Plasma Panipenem Concentration in Neonates by High-Performance Liquid Chromatography

HIDEYA KOKUBUN*†¹, TOSHIMI KIMURA†¹, SETSUKO MURASE†¹, SHIGEHICO SHIMADA†¹,
HIROAKI KUBO†², MAKI MATSUMOTO†³, MASAHICO NOWATARI†³ and NOBUO MATSUURA†³

Department of Pharmacy, Kitasato University Hospital†¹

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University†²

Department of Pediatrics, Kitasato University School of Medicine†³

(Received February 1, 2000)
(Accepted July 7, 2000)

A simple and fast determination of plasma panipenem (PAPM) in extremely low birth weight infants was established using reversed phase high-performance liquid chromatography. Solutions of 35% methanol (pH 5.8), including 5 mM NaH₂PO₄ and 5 mM sodium dodecylsulfate, were used for the mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min. UV detection was carried out at 300 nm. The pretreatment method was as follows: 200 mM 3-[morpholino] propansulfonic acid solution was added to the plasma as a stabilizer. It was then deproteinized with methanol. The calibration curve was linear in a range from 6.25 µg/mL to 100 µg/mL. The recovery rate from known concentration samples of PAPM was 98.4%. The within-run and day-to-day variations were below 2.5% and 2.7%, respectively. The PAPM concentrations in the plasma were determined in five infants. In immature patients, an extension of the half-life was also observed.

Key words — panipenem, neonate, infection, carbenin, high-performance liquid chromatography

緒 言

カルベニン® (パニペネム/ベタミブロン, 以下, PAPM/BP と略す) は, グラム陽性・陰性菌

に対し幅広い抗菌活性を有するカルバペネム系の抗生物質であり, 現在, 広く臨床で使用されている。小児科領域においては, 尿路感染症や髄膜炎, 敗血症等の重症感染症の治療に用いられ, 免疫能が不十分な超低出生体重児の重症感染症においては, 重要な役割を果たしている。しかしながら,

†1-3 神奈川県相模原市北里1-15-1; 1-15-1, Kitasato,
Sagamihara-shi, Kanagawa, 228-8555 Japan

小児に対する適応が認められているものの、新生児での至適投与量の検討はなされておらず、安全性が確立されていないのが現状である。そこでわれわれは、新生児における PAMP/BP の至適投与量を設定することを目的として血漿中 PAMP 濃度測定を試みた。

これまでに報告されている PAMP の濃度測定法¹⁾を行ったところ、PAMP が幾何異性体を持つためにチャート上ピークが 2 本となり新生児の極微量の検体では低濃度まで定量することが出来なかった。

そこで、幾何異性体を分離せずに、UV 検出器を用い、イオン対逆相クロマトグラフィーによる簡便な微量定量法を確立し、さらに数症例の新生児の PAMP 体内動態を検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 標準品と試薬

PAMP 原末 (Lot. No. 227) は三共株式会社より譲渡を受け、200mM 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid (MOPS) 液に溶解したものを標準液とした。MOPS はシグマ社のものを用いた。

移動相に用いた溶媒とイオンペア試薬は、高速液体クロマトグラフ用で、その他の有機溶媒および試薬は、すべて試薬特級を用いた。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC) は、Multisolute Delivery System 600 (Waters) を用いた。検出器は、UV-970 (日本分光) 使用し、検出波長は 300nm に設定した。

カラムは、細孔径 150Å 球状シリカゲルにオクタデシル基を化学結合した充填剤 (微粒子直径 5 μm) を使用している逆相系カラム Inertsil ODS-2 (4.6 $\times$ 150mm, GLScience) を用いた。

3. 移動相

5mM NaH_2PO_4 と 5mM ドデシル硫酸ナトリウムを含む 35% メタノール (pH 5.8) を用いた。なお、流速は 0.8mL/min とした。

4. 前処理法

PAMP は非常に不安定であるため、採血後、微量血漿 10 μL に対し、ただちに安定剤である 200mM MOPS 10 μL を加えた。次に、除蛋白剤としてメタノール 100 μL を加えボルテックスミキサーで混和し、析出した蛋白質を 5 分間 12,000 rpm で遠沈させ、その上清を HPLC の試料とした。また、操作は常に氷冷下で行った。

5. 血漿中 PAMP の安定性

PAMP が 25 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加調製されたヒト血漿と 200mM MOPS を 1 : 1 の割合で混合し、室温 (+23 $^{\circ}\text{C}$)、冷所 (+4 $^{\circ}\text{C}$) および凍結 (-30 $^{\circ}\text{C}$) に保存して経時的に残存率を測定した。

6. 新生児の血中濃度測定

北里大学病院 NICU 入院中に PAMP/BP 10~20mg/kg/回、1 日 2 回、輸注ポンプにて治療が行われ、両親からの同意を得た新生児 5 例を対象とした。採血は、原則として投与開始 3 日目の投与直前、1 時間後、2 時間後、6 時間後とした。

結果および考察

1. 分離条件の検討

移動相は、25% のメタノールを含む 1mM、5mM および 10mM NaH_2PO_4 とイオンペア試薬の 5mM デカンスルホン酸ナトリウム、5mM ウンデカンスルホン酸ナトリウムおよび 5mM ドデカンスルホン酸ナトリウムのそれぞれの組み合わせについて検討した。また、それぞれの移動相に対して、除蛋白剤としてメタノール²⁾あるいはアセトニトリル²⁾について検討した。その結果、除蛋白剤はメタノールで 5mM および 10mM NaH_2PO_4 と 5mM ウンデカンスルホン酸ナトリウムの組み合わせ、10mM NaH_2PO_4 と 5mM ドデカンスルホン酸ナトリウムの組み合わせが最も良好な 1 本のピークを示した。また、除蛋白剤をアセトニトリルにした時、すべての組み合わせにおいて幾何異性体が分離した。したがって、除蛋白剤をメタノールとし、上記の 3 つの組み合わせの移動相を用い、新生児の血漿中 PAMP 濃度測定を

行った。

しかし、新生児の血漿中 PAPM 濃度を測定すると正常血漿にはない夾雑物が PAPM とほぼ同じ位置に検出された。そこで、その夾雑物と PAPM を分離するために、イオンペア試薬として PAPM の保持時間がさらに長くなることが予測される 5 mM ドデシル硫酸ナトリウムを用い、緩衝液と除蛋白剤は同じもので移動相を 25%, 30% および 35% メタノールについて検討したところ、25% および 30% メタノールの場合、PAPM のピークが 2 つに割れてしまったが 35% メタノールを用いた場合、夾雑物の影響もなく、1 本の良好なピークになり、retention time も 5 分間と良好であった (Fig. 1)。よって、最終的にイオンペアとして 5 mM ドデシル硫酸ナトリウム、緩衝液として 5 mM NaH_2PO_4 および除蛋白剤としてメタノールを用い新生児の PAPM の体内動態を検討した。

2. 検量線の作成

PAPM 原末を 200 mM MOPS 液に溶解し、6.25

Fig. 1. Chromatograms Obtained from Control Plasma (A), and Newborn Plasma (B)

$\mu\text{g/mL}$, 12.50 $\mu\text{g/mL}$, 25.00 $\mu\text{g/mL}$, 50.00 $\mu\text{g/mL}$ および 100.00 $\mu\text{g/mL}$ の標準液を作成した後、それぞれ 10 μL 採取して、人血漿を 10 μL ずつ添加する。次に、定量操作に従って処理し、検量線を作成した。横軸に PAPM 濃度を、縦軸に PAPM のピーク高さをプロットした検量線を Fig. 2 に示した。検量線は原点を通る良好な直線関係を示し、相関係数は 1.000 であった。検出感度は、 $S/N=3$ で、PAPM 濃度は 0.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、新生児の極微量血漿 (10 μL) に対しても低濃度までの測定を可能とした。

3. 再現性および回収率

血漿中 PAPM 濃度として、低濃度 (6.25 $\mu\text{g/mL}$)、中濃度 (50 $\mu\text{g/mL}$) および高濃度 (100 $\mu\text{g/mL}$) について、日内・日差変動を検討した結果、各濃度とも日内変動は 2.5% 以下、日差変動は 2.7% 以下と良好な結果が得られた (Table 1)。

Fig. 2. Calibration Curve of Panipenem in Newborn Plasma

Table 1. Reproducibility for Analyses

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Within-run C.V.%, (n = 10)	Between-run C.V.%, (n = 5)
6.25	2.5	2.4
50	1.4	2.7
100	1.6	1.7

また、絶対検量線により回収率を求めた結果、98.4%と良好であった。

4. 試料の安定性

室温保存では残存力価が6時間で95.5%まで低下したが、冷所保存では6時間、凍結保存では4日間まで力価低下は認められなかった。これらの成績から PAPM 検体は凍結保存とし、保存後4日間は安定であると考えられた (Table 2)。

5. 新生児の血中 PAPM 濃度測定

PAPM を使用している新生児5例に対して、血中濃度測定を行った (Table 3, Fig. 3)。その結果、在胎週数が最も短かった症例①において半減期が最も長く、健常成人男性の平均半減期 (約70分)³⁾ や腎機能正常な小児の平均半減期 (約60分)⁴⁾ の2倍以上であった。その他の症例においても在胎週数が短いほど半減期が長くなる傾向に

あった。このことは、PAPM が腎臓より80%排泄され³⁾、腎機能低下が高度となるほど PAPM 半減期が延長する⁵⁾ことと、糸球体ろ過率が在胎週数34週を境に急速に増加する⁶⁾ことから腎機能の未熟により PAPM の排泄が遅延していたと考えられた。その他の症例においても在胎週数が短いほど半減期が延長する傾向にあった。

また、Fig. 3において、投与開始1時間値の血中濃度がほぼ消失相の直線の延長上であることから、PAPM の分布は、成人と同様に新生児においても1時間以内に終了しているものと考えられた。

今後、症例を積み重ね新生児における PAPM の至適投与量を決定したい。

謝辞 本研究に際し、パニペナム原末を提供していただいた三共株式会社に心より感謝いたします。

Table 2. Stabilities of Panipenam in Human Plasma

The human plasma and the solution of 25 $\mu\text{g/mL}$ PAPM in the stabilizer were mixed in the ratio of 1 : 1, and stored at room temperature (+23°C), in a cold place (+4°C) and froze (-30°C).

Temp (°C)	Time(hrs)							
	0	2	6	24	48	96	216	408
23	100 (%)	101.1 $\pm$ 2.1	95.5 $\pm$ 5.0	77.1 $\pm$ 6.8	-	-	-	-
4	100 (%)	101.6 $\pm$ 2.9	103.0 $\pm$ 6.3	99.3 $\pm$ 0.4	97.3 $\pm$ 4.0	87.2 $\pm$ 9.1	-	-
-30	100 (%)	102.6 $\pm$ 3.6	101.6 $\pm$ 4.4	102.7 $\pm$ 5.1	101.9 $\pm$ 2.7	104.6 $\pm$ 2.3	98.9 $\pm$ 5.8	95.5 $\pm$ 2.9

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

Table 3. Results of Determination of Plasma Panipenam Concentration in Neonates

case	sex	gestational	postconceptional	bodyweight (g)	PAPM dosage (mg/kg, daily times)	concentration ($\mu\text{g/mL}$)					t _{1/2} (hr)
		age	age			trough	1hr	2hr	4hr	6hr	
①	F	24w6d	25w4d	640	15.6 $\times$ 2	4.7	29.5		13.8		2.8
②	F	29w2d	31w0d	770	15.6 $\times$ 2	1.9	32.1	23.4		8.4	2.6
③	F	30w6d	33w3d	1272	18.9 $\times$ 3	7.4	37.1	29.0	15.8		2.6
④	F	35w1d	37w5d	1772	25.4 $\times$ 2	2.0	39.0	27.3		7.4	2.1
⑤	M	40w3d	42w4d	3218	15.5 $\times$ 2	1.2	27.6	17.5		4.0	1.7

Fig. 3. The Time Course of Concentration in Neonates

Back Ground :

(◆) gestational age ; 24 weeks, bodyweight ; 640 g, PAPM dosage ; 15.6 mg/kg two times a day

(□) gestational age ; 29 weeks, bodyweight ; 770 g, PAPM dosage ; 15.6 mg/kg two times a day

(△) gestational age ; 30 weeks, bodyweight ; 1272 g, PAPM dosage ; 18.9 mg/kg three times a day

(■) gestational age ; 35 weeks, bodyweight ; 1772 g, PAPM dosage ; 25.4 mg/kg two times a day

(●) gestational age ; 40 weeks, bodyweight ; 3218 g, PAPM dosage ; 15.5 mg/kg two times a day

引用文献

- 久岡正史, 長沼英夫, 高萩英邦, 川原幸則, 山崎泰志, *Chemotherapy*, **39**, 197-205 (1991).
- 久保博昭, 月刊薬事, **26**, 145-150 (1984).
- 中島光好, 植松俊彦, 長沼英夫, 久岡正史, 川原幸則, 金丸光隆, 田島政三, *Chemotherapy*, **39**, 242-264 (1991).
- 藤井良知, 阿部敏明, 田島剛, 寺島周, 目黒英典, 森淳夫, 中澤進, 佐藤肇, 新納憲司, 砂川慶介, 岩田敏, 秋田博伸, 佐藤吉壮, 豊永義清, 瀬尾究, 河村研一, 堀誠, 久野邦義, 岩井直一, 種田陽一, 中村はるひ, 桜井寛, 伊藤正寛, 神谷斉, 庵原俊昭, 西村忠史, 田吹和雄, 高木通生, 青木繁幸, 小林裕, 春田恒和, 古川正強, 岡本喬, 黒田泰弘, 武田英二, 倉繁隆信, 森田秀雄, 松田博, 貴田嘉一, 藤澤由樹, 辻芳郎, 林克敏, 富増邦夫, 森剛一, 遠矢芳一, 中下誠郎, 榎藤泉, 小林伸雄, 本廣孝, 高城信彦, 今井昌一, 荒木久昭, 林真夫, 小野栄一郎, 橋本武夫, 久保田薫, 石本耕治, 西山亨, 久田直樹, 富永薫, 安岡盟, 鈴木和重, 田中耕一, 藤本保, *Jpn. J. Antibio.*, **45**, 208-225 (1992).
- 青木信樹, 薄田芳丸, 甲田豊, 高沢哲也, 若林伸人, 林静一, 新田功, 本間千鶴子, 渡辺京子, *Chemotherapy*, **39**, 372-384(1991).
- 伊藤克巳, 白髪宏司, 周産期医学, **26**, 757-761 (1996).