

Aminobenzyl-Penicillin, Methylphenylisoxazolyl-Penicillin

合剤の分離定量法に関する研究

藤井良知・紺野昌俊・岡田一穂

東京大学医学部分院小児科

熊谷道彦・吉田昭雄・松崎明紀

万有製薬株式会社目黒第三研究課

(昭和 44 年 6 月 25 日受付)

抗生物質の分離定量法としては、従来用いられている抗菌性の違いによる定量の他、KARNOVSKY¹⁾ らはペーパークロマトグラフィーにより、LIGHTBOWN²⁾ らは寒天ゲル電気泳動法により分離定量出来ることを報告している。また多くの抗生物質が、薄層クロマトグラフィーにより分離することが出来る³⁾。

Aminobenzyl-Penicillin と Methylphenylisoxazolyl-Penicillin の分離定量に際して、迅速性、同時性、再現性を考慮し、同時に小児等の際しばしば必要となる少量の臨床材料についての測定などの点も考えた上、薄層クロマトグラフィー (以下、TLC と略) と寒天ゲル高圧電気泳動 (以下、寒天ゲル HVE と略) による分離定量について、検討を加えた。

その結果、シリカゲルによる TLC により両ペニシリンは分離可能であり、分離後 Bioautography によりその濃度も精度よく測定出来た。また TLC 分離測定法により、血液及び尿中濃度の測定も行なつたので、これらの結果について報告する。

I. 基礎的検討

(1) 使用薬剤

実験に使用した Aminobenzyl-Penicillin (以下、AB-PC と略) および Methylphenylisoxazolyl-Penicillin (以下 MPI-PC と略) は、Table 1 に示した。

(2) TLC による分離定量

TLC 用吸着プレートは市販の E. メルク社製シリカゲルガラスプレートを 5.0 mm 幅に細く切り使用した。

Table 2 に 0.5% 過マンガン酸カリウム溶液噴霧により発色させた時の AB-PC および MPI-PC のシリカゲル TLC での各種溶媒における Rf 値を示した。

Table 1 Source of samples

Penicillin	Source	Potency
AB-PC	Banyu Pharmaceutical Co., Ltd. Lot No. PXE-20	874 mcg/mg
MPI-PC	Banyu Pharmaceutical Co., Ltd. Lot No. DVPEI-22	831 mcg/mg

Table 2 にみられるように、水飽和-n-ブタノールが AB-PC と MPI-PC をよく分離する。以後の実験にはすべてこの溶媒を使用した。

AB-PC と MPI-PC の等比合剤 (以下 B-121 と略) を pH 7.0 M/15 phosphate buffer で、100 mcg/ml の濃度に溶解して標準原液とした (調製後 5°C に保存し 24 時間以内に使用)。

標準原液をメタノールで倍数希釈を行ない、20~0.039 mcg/ml の標準メタノール液を作つた。標準液はマイクロピペットを用いて正確にその 0.05 ml をシリカゲルプレートの原点にスポットする。メタノールを風乾させたのち上昇法により約 10 cm 展開させる。展開後プレートはなるべく低温で、すみやかに乾燥させる。

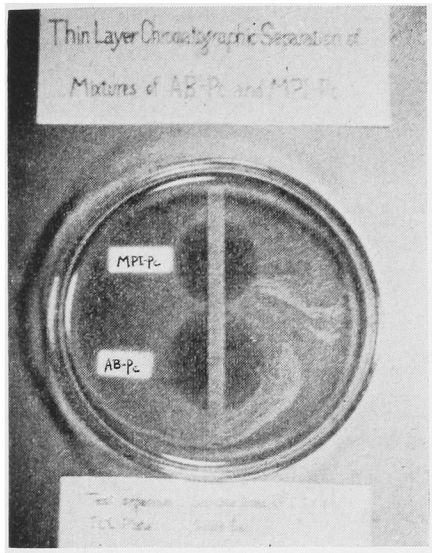
Bioautography 用の定量培地には、ペプトン 0.3%、酵母エキス 0.1%、肉エキス 0.1%、食塩 1.0%、寒天 1.6%、pH 6.5~6.6 からなる培地を使用した。

試験菌は *Sarcina lutea* P. C. I. 1001 (Code No. S-508) 株を用いた。試験菌の斜面寒天 24 時間培養菌をブイヨ

Table 2 Rf values of AB-PC and MPI-PC on silica gel TLC

Solvent	Rf value	
	AB-PC	MPI-PC
Methyl alcohol	0.72	0.83
Methyl alcohol-Acetone (5 : 5)	0	0
Methyl alcohol-Acetone (7 : 3)	0	0
Methyl alcohol-Acetone (9 : 1)	0.81	0.85
Acetone	0	0
Acetone-Water (95 : 5)	0.50	0.60
Acetone-Water (85 : 15)	0.80	0.90
Water	1.00	1.00
n-Butyl alcohol saturated with water	0.25	0.45
n-Butyl alcohol	0	0
Chloroform	0	0
Ethyl ether	0	0

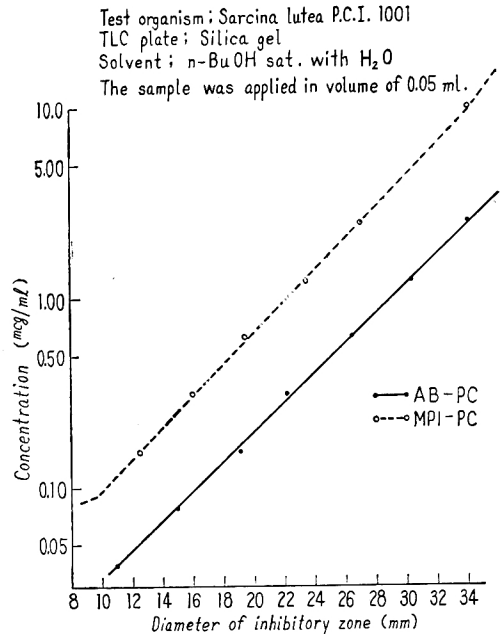
Fig. 1 Thin layer chromatographic separation of mixtures of AB-PC and MPI-PC



ンに懸濁させて、650 m μ における透過率が 10% となる菌液を調製する。

培地を高圧滅菌後 50°C に冷えてから菌液を 1% の割に混和接種して、水平に置かれた径 12 cm のシャーレに 9.0 ml ずつ分注し、平板に固める。

Fig. 2 Standard curve of AB-PC and MPI-PC (TLC Method)



展開後風乾したシリカゲルプレートを平板寒天に軽くおしつけるように貼り、3時間、5°C に静置したのち 31°C で 12~15 時間培養する。

Fig. 1 は前述の方法で得られた bioautography の 1

Table 3 Technical error of T.L.C. methods.

Drugs	Conc. (mcg/ml)	Inhibitory zone (mm)					Mean	S. E.	S. D.
AB-PC	10.0	40.5	42.0	40.5	39.0	42.0	40.80	0.56	1.15
	5.0	39.5	39.0	39.0	39.0	39.5	39.20	0.12	0.25
	2.5	35.0	34.5	34.0	34.0	34.0	34.30	0.20	0.40
	1.25	31.0	30.5	30.5	30.5	30.5	30.60	0.10	0.22
	0.625	26.5	27.0	26.5	26.5	26.5	26.60	0.10	0.22
	0.313	23.0	22.5	21.5	22.0	23.0	22.40	0.29	0.58
	0.156	19.0	19.0	19.5	20.0	19.5	19.40	0.18	0.37
	0.078	14.5	14.5	15.0	14.5		14.63	0.10	0.19
0.039	11.0	11.5	11.5	10.5	10.5	11.00	0.22	0.45	
MPI-PC	10.0	34.0	34.5	35.0	35.0	34.0	34.50	0.22	0.42
	5.0	30.0	30.5	30.5	30.5	30.5	30.40	0.10	0.22
	2.5	26.5	26.5	26.0	27.5	27.0	26.70	0.26	0.54
	1.25	22.0	22.0	21.5	22.5	22.0	22.00	0.16	0.32
	0.625	18.5	19.0	18.5	19.0	19.5	18.90	0.18	0.37
	0.313	15.5	16.0	15.5	16.0	16.0	15.80	0.12	0.25
	0.156	12.5	11.5	11.5	12.0	12.0	11.90	0.19	0.37
	0.078	9.0	10.0	10.0	8.0	—	9.25	0.37	0.75
0.039	—	—	—	—	—	—	—	—	

S. E.: Standard error

S. D.: Standard deviation

例を示した。阻止帯は貼りつけたシリカゲルプレートに沿ってやや楕円形になることがあるので、計測はつねにシリカゲルプレートに対して直角の方向に行なう。

前記の方法によつて得られた標準曲線を Fig. 2 に示した。

また Table 3 には、阻止帯の実測値から、平均値、標準誤差、標準偏差を求めた結果を表わした。Fig. 2 および Table 3 に見られるとおり、AB-PC は 0.04 mcg/ml から 10 mcg/ml, MPI-PC は 0.1 mcg/ml から 10 mcg/ml の間に、阻止帯の径と薬剤対数濃度の間に直線関係がみられ、その誤差、偏差も少なく、両ペニシリンの分離定量に、TLC 分離法が十分に使用出来ることが認められた。

(3) 寒天ゲル HVE による分離定量

ペプトン 0.6%, トリプトン 0.4%, 酵母エキス 0.3%, 肉エキス 0.15%, グルコース 0.1%, 寒天 1.5%, pH 6.5~6.6 からなる培地を 110°C 20 分間高圧滅菌する。滅菌後 50°C 前後に保つておく。

Sarcina lutea P. C. I. 1001 の 24 時間斜面寒天培養菌をブイヨンに懸濁させ 650 mμ における透過率が 50% を示す菌液をつくる。先に用意した寒天培地に菌液を 1% の割合で接種する。

薄層クロマトグラフィー用アプリーター (三田村理研工業 KK) を用いて、試験菌を含んだ寒天培地を厚さ 1.0 mm の薄い層にする。寒天薄層の中央部に一定間隔で径 1.0 mm 穴をあけその中へマイクロピペットを用いて、標準原液の phosphate buffer に希釈液 (0.039~10 mcg/ml) を 0.01 ml ずつ入れる。標準液あるいは試料注入後、この穴は同じ寒天培地で閉じておくことにより、泳動中の電流の流れを均一にし、移動距離の不均一さを防ぐことが出来る。

高圧電気泳動装置は KK 富士理研の PA 型を使用した。電気泳動を行なう時、Buffer Tank には Buffer を入れるが、我々はこの Tank に薄層作製のため使用した寒天培地から寒天を除いた液を入れた。

-10°C に冷やした冷却板の上にサンプルをつけた寒天ゲルを置き、ゲル・タンク間は Buffer Tank 中の液で潤おしたリント布で連結した。

泳動は 50 mA, 1400 V, 30 分間行ない、泳動後直ちに 31°C に移して 12~15 時間培養した。Fig. 3 にはその 1 例を示した。

前述の条件で泳動を行なうことにより、AB-PC は陰極側に 5 mm, MPI-PC は陽極側に 60 mm 移動した。

Fig. 4 には寒天ゲル HVE における薬剤濃度と阻止帯の径の関係を表わした。

AB-PC は 0.08 mcg/ml から 2.5 mcg/ml, MPI-PC

Fig. 3 High voltage electrophoretic separation of mixtures of AB-PC and MPI-PC

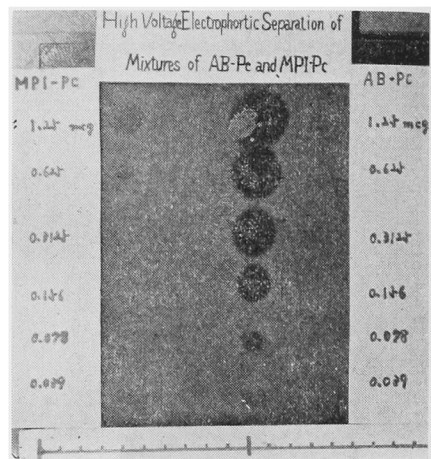
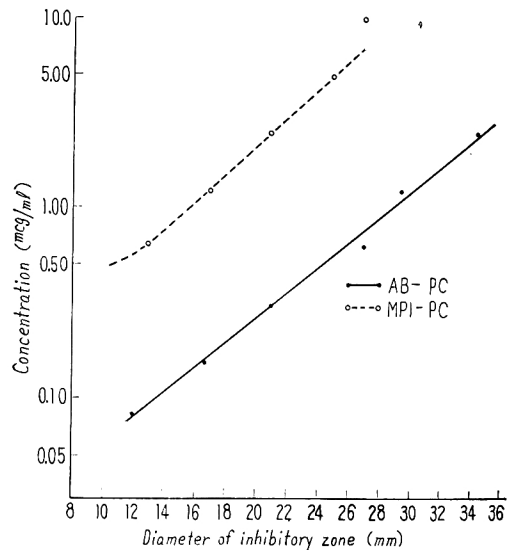


Fig. 4 Standard curve of AB-PC and MPI-PC (Agar gel HVE method)

Test Organism: *Sarcina lutea* P.C.I. 1001
The sample was applied in volume of 0.01 ml and an applied voltage of 1400 volts at 50 mA for 30 min.



は 0.6 mcg/ml から 5 mcg/ml の間にはほぼ直線関係がみられた。

(4) TLC 分離定量法と寒天ゲル HVE 分離定量法の比較

AB-PC と MPI-PC を分離したのち定量することにおいて、TLC と寒天ゲル HVE を比較すると、次のようなことが言える。

- 1) AB-PC, MPI-PC の分離能は寒天ゲル HVE のほうがすぐれている。
- 2) 発育阻止帯の径と薬剤濃度の間における関係は、

TLC のほうが広い範囲にわたり直線性があり、測定可能な最低濃度においても TLC のほうが優れていた(TLC 比での AB-PC は 0.04 mcg/ml, 寒天 HVE 法では 0.08 mcg/ml, MPI-PC は TLC 法で 0.1 mcg/ml, 寒天 HVE 法では 0.6 mcg/ml)。

3) 多数のサンプルを処理することにおいても TLC のほうが優れていた。

これらの点を考慮して、血液および尿中濃度の測定には、シリカゲル TLC による方法がより優れていると考えられる。

II. 血液及び尿中 AB-PC, MPI-PC の分離定量

前述した TLC 法により両 Penicillin を分離したのち測定する方法で行なつた。しかし TLC 法で血液試料を直接シリカゲルプレートにスポットすると血液が凝固するため、試料はメタノール処理をほどこした。

すなわち、血液は 3 倍量のメタノールに注ぎ込み、よく振り混ぜた後 3000 rpm, 5 分間遠心分離を行ない、その上澄を分取し測定した。被検体濃度が高い時は、さらにメタノールで希釈して、ほぼ 0.5~3 mcg/ml になるようにした。

このメタノール処理が測定値におよぼす影響について検討を加えた。その結果はメタノール処理を行なつた場合も、添加した AB-PC, MPI-PC 共にほぼ 100% 溶出することがたしかめられた。

また MPI-PC のタン白質との結合について犬の血漿を用いて調べた。MPI-PC 濃度は、50 mcg/ml, 12.5 mcg/ml の 2 種の薬用量、測定法は、平衡透析法と限外濾過法の 2 法により行なつた。その結果、MPI-PC はいずれの方法による場合も約 40% タン白と結合していた。

しかし血漿タン白と結合した MPI-PC もメタノールにより完全に溶出した。

尿はあらかじめ phosphate buffer で希釈した後、終末で水分が 25% 以下になるようにメタノールで希釈し、ほぼ 0.5~3 mcg/ml の濃度にした。

検液の 0.05~0.15 ml を正確にとり、シリカゲルプレートにスポットして、展開後 *Sarcina lutea* による抗菌検定を行なつた。

(1) イヌに於ける吸収排泄

血中濃度：体重 10 kg 前後の雌成犬を用いて臀部の筋肉内に Broadcillin を注射した。薬量は、20 mg/kg, 100 mg/kg とし、1 群 3 頭で実験を行なつた。

薬物投与後 1/2 時間、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間及び 8 時間に於ける血中濃度の測

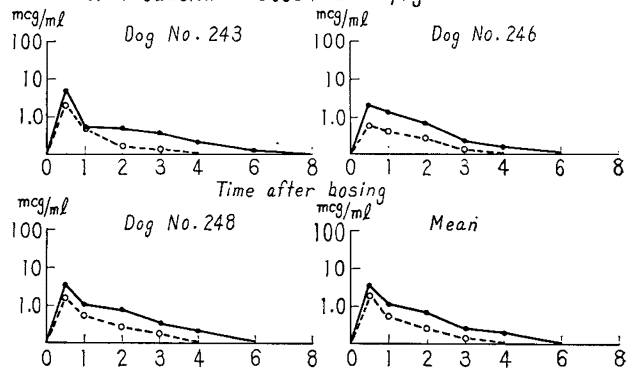
定を行なつた。結果を Fig. 5 に示した。

血中濃度は Broadcillin 投与後 1/2 時間~1 時間で、AB-PC, MPI-PC 共にピークを示し、その平均値は、20 mg/kg 投与群の AB-PC は 5.0 mcg/ml, MPI-PC 1.78 mcg/ml を示し、100 mg/kg 投与群の AB-PC 95.3 mcg/ml, MPI-PC 48.7 mcg/ml であつた。8 時間後では、100 mg/kg 投与群の AB-PC のみが 0.6 mcg/ml を示したにすぎず、MPI-PC の血中からの消失は早いという成績が得られた。

尿中排泄：血中濃度の測定と同時に尿中濃度、尿中排泄率を測定した。検定に用いた尿は、12~24 時間を除き他の時間はすべてカニューレにより採尿を行なつた。また、尿量を一定にするため薬物投与 1 時間前から 5 時間に渡り、全量 500 ml のリンゲルロノク液を腹腔内に 100 ml/hr の速度で点滴注入した。

Fig. 6 には 20 mg/kg 投与群、100 mg/kg 投与群共に 3 例の平均排泄量及び尿中排泄率を示した。24 時間までの排泄率は、20 mg/kg 群の AB-PC 53.1%, MPI-PC 29.0%, 100 mg/kg の AB-PC 75.0%, MPI-PC 50.0% であつた。

Fig. 5 Blood concentrations in dogs following I.M. administration of Broadcillin Dose; 20 mg/kg



Blood concentrations in dogs following I.M. administration of Broadcillin Dose; 100 mg/kg

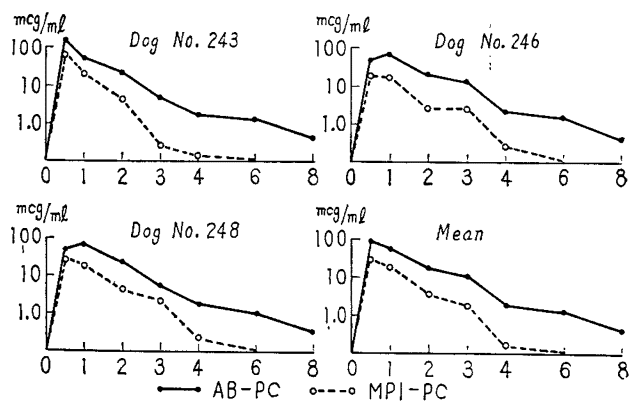


Table 4 Blood concentrations in man following I. M. administration of Broadcillin Dose ; mg/man

No.	Age (Y)	Sex	Body wt.	Drugs	Concentration in blood (mcg/ml)				
					1/2	1	2	4	6 hr
1	32	Male	65 kg	AB-PC	2.73	2.80	1.92	0.43	0.06
				MPI-PC	2.30	1.33	0.50	0.12	<0.10
2	26	Male	75 kg	AB-PC	2.60	2.82	2.10	0.32	0.05
				MPI-PC	2.20	1.04	0.30	0.10	<0.10
3	22	Male	65 kg	AB-PC	4.50	4.10	1.64	0.32	0.05
				MPI-PC	7.10	2.90	0.52	0.10	<0.10
4	32	Male	60 kg	AB-PC	3.20	3.50	0.88	0.12	<0.03
				MPI-PC	1.90	3.20	0.76	0.11	<0.10
5	27	Male	65 kg	AB-PC	4.60	2.04	0.44	0.13	0.05
				MPI-PC	4.20	1.65	0.34	0.12	<0.10
6	19	Male	48 kg	AB-PC	4.60	5.00	1.22	0.16	0.04
				MPI-PC	6.00	2.90	0.50	0.10	<0.10
Mean				AB-PC	3.71	3.38	1.37	0.25	0.05
				MPI-PC	3.95	2.17	0.49	0.11	<0.10

Table 5 Blood concentrations in sucklings following I. M. administration of Broadcillin Dose ; 50 mg/kg

No.	Age (M)	Body wt.	Drugs	Concentration in blood (mcg/ml)				
				1/2	1	2	4	6 hr
A	2	3.8 kg	AB-PC	20.0	32.8	27.0	14.0	4.6
			MPI-PC	20.0	28.4	5.2	3.4	0.1
B	5	7.8 kg	AB-PC	12.8	70.0	24.0	8.4	0.8
			MPI-PC	18.8	12.4	5.2	1.0	0.1
Mean			AB-PC	16.4	51.4	25.5	11.2	2.7
			MPI-PC	19.4	20.4	5.2	2.2	0.1

Table 6 Blood concentrations in infants following I. M. administration of Broadcillin Dose ; 50 mg/kg

No.	Age (Y)	Body wt.	Drugs	Concentration in blood (mcg/ml)				
				1/2	1	2	4	6 hr
C	6	18.8 kg	AB-PC	12.0	25.6	4.6	0.9	0.2
			MPI-PC	11.2	6.4	3.0	0.1	0.1
D	5	20.0 kg	AB-PC	60.0	32.0	23.2	2.5	0.8*
			MPI-PC	22.4	12.4	8.8	2.4	0.1*
Mean			AB-PC	36.0	28.8	13.9	1.7	0.5
			MPI-PC	16.8	9.4	5.9	1.3	0.1

* after 5 hr

(2) ヒトに於ける吸収排泄

血中濃度：成人6例，乳児2例，
 幼児2例，計10例について血中濃度を測定した。薬量は，成人については500 mg/man，乳児は50 mg/kgで，筋注による1回投与を行なった。投与後1/2，1，2，4時間及び6時間の5回に渡り，肘静脈より採血した血液を用いて測定した。測定結果は成人はTable 4，乳児はTable 5，幼児はTable 6に表わした。

成人では，AB-PCの血中濃度は1/2時間で最高4.60 mcg/ml，最低2.60 mcg/mlとなり，1時間値は最高5.00 mcg/ml，最低2.04 mcg/ml，2時間後には最高2.10 mcg/ml，最低0.44 mcg/mlと，かなりのばらつきがみられた。いつばら，MPI-PCも1/2時間の最高7.10 mcg/ml，最低1.90 mcg/ml，1時間値最高3.20 mcg/ml，最低1.04 mcg/ml，2時間での最高は0.76 mcg/ml，最低0.30 mcg/mlとばらつきがみられた。

乳児，幼児では，成人にくらべてより大きな差がみられ，乳児のAB-PCの血中濃度は1/2時間で20.0~12.8 mcg/ml，1時間は70.0~32.8 mcg/ml，6時間後においても4.6~0.8 mcg/mlとなり，MPI-PCも同様に1/2時間で20.0~18.8 mcg/ml，1時間は28.4~12.4 mcg/mlとばらついた値を示した。

幼児ではAB-PCの1/2時間60.0~12.0 mcg/ml，1時間32.0~25.6 mcg/ml，2時間後23.2~4.6 mcg/mlとなり，MPI-PCは1/2時間値22.4~11.2 mcg/ml，1時間12.4~6.4 mcg/ml，2時間値8.8~3.0 mcg/mlとばらつきがみられた。

しかし，平均すると，いずれの場合もピークは1/2時間ないし1時間の間にあり，これらの値は単味で投与した場合の血中濃度と大差はないと考えられる⁴⁻⁸⁾。

Fig. 6 Mean urinary excretions in dogs following I.M. administration of Broadcillin

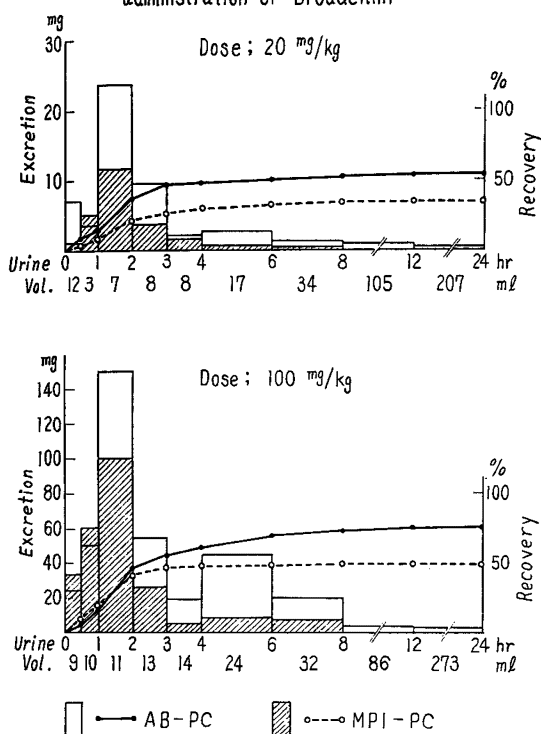


Fig. 7 Mean blood concentrations following administration of Broadcillin

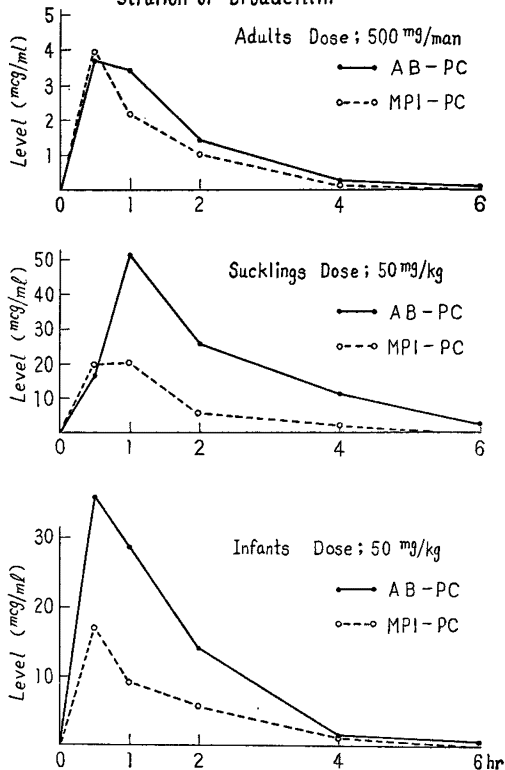


Fig. 7 にはそれぞれの平均値を図示した。

尿中排泄：薬物投与前に排尿させておき、2時間、4時間及び6時間後の採血後ただちに排尿させ、各時間に於ける尿中濃度、尿中排泄率について調べた。測定結果

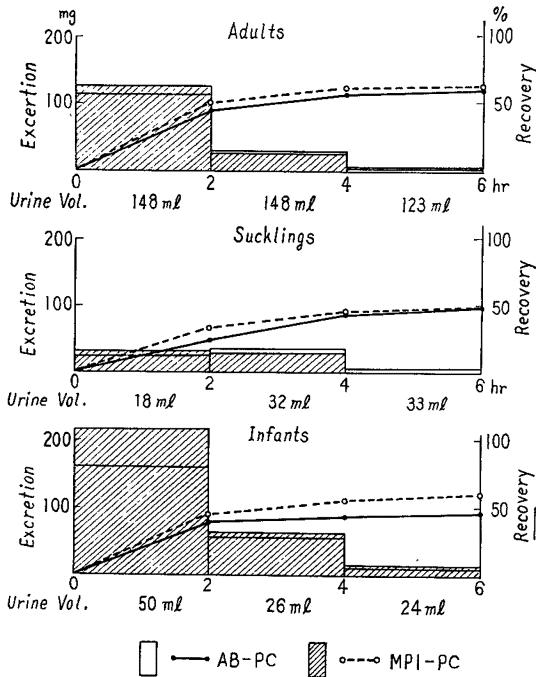
は Table 7 及び Fig. 8 に表わした。

尿中排泄率についてみると、成人の AB-PC は2時間までに 45.6%、6時間では 59.7% を示し、MPI-PC は2時間で 50.2%、6時間までに 61.4% とほぼ AB-PC

Table 7 Mean urinary excretions in adults, sucklings and infants following I.M. administration of Broadcillin

Time after dosing (hr)	Urine vol. (ml)	AB-PC			MPI-PC			
		Level (mcg/ml)	Total (mg)	Recovery (%)	Level (mcg/ml)	Total (mg)	Recovery (%)	
2	Adult	148	787	114	45.6	851	126	50.2
	Suckling	18	1350	24.3	24.3	1800	32.4	32.4
	Infant	50	3088	154	31.9	4276	214	44.0
4	Adult	148	193	28.6	11.5	176	26.1	10.4
	Suckling	16	1028	16.5	19.8	856	13.7	15.7
	Infant	26	2119	55	11.1	2354	61	12.2
6	Adult	123	35	4.3	1.7	17	2.1	0.9
	Suckling	33	142	4.7	3.2	58	1.9	1.3
	Infant	24	467	11.2	2.3	617	14.8	3.1
Total	Adult	419	357	149.5	59.7	367	153.7	61.4
	Suckling	74	673	49.8	47.3	615	45.5	79.1
	Infant	100	2030	203.0	45.5	2896	289.6	59.7

Fig. 8 Mean urinary Excretions following I.M. Administration of Broadcillin



と同じ値を示した。

乳児に於ける排泄率はやや低く、AB-PC の2時間値 24.3%、6時間で47.3%となり、MPI-PCは2時間で32.4%、6時間で49.1%の排泄率であった。

幼児は、AB-PCの排泄率2時間で31.9%、6時間までで45.5%を示し、MPI-PCは2時間までで44.0%、6時間で59.7%という成績が得られた。

III. TLC分離定量法とDisc法による定量法

TLCによる分離定量法と従来から慣用されている感受性の異なる2種類の菌を用いてのDisc法による定量法の値を比較検討した。

健康成人3例を用いて、1/2、1、2、4、6時間の血中濃度(メタノールで処理したもの)及び2、4、6時間に於ける尿中濃度をTLC法とDisc法により、比較定量した。

Disc法に使用した試験菌は、AB-PC用として *Bacillus anthracis* 115 (Code No. S-605) を、MPI-PCの定量には *Staph. aureus* Russer (PC-R) (Code No. S-4 B 52) を用いた。

結果はTable 8, Table 9に表わした。

血中濃度についてみると、AB-PCの1/2時間値はTLC法で4.10 mcg/mlに対し、Disc法は4.32 mcg/ml、1時間値はTLC法3.51 mcg/ml、Disc法3.53 mcg/ml、2時間値のTLC法は0.84 mcg/ml、Disc法0.97 mcg/mlとなり、両者はよく一致しているが、いく

Table 8 Comparison of blood concentrations, assayed by TLC method and disc method

Methods	Drugs	Concentration in blood (mcg/ml)				
		1/2	1	2	4	6 hr
TLC	AB-PC	4.10	3.51	0.84	0.14	0.04
		4.32	3.53	0.97	0.16	0.08
TLC	MPI-PC	4.03	2.58	0.53	0.11	.1
		3.21	2.17	0.51	0.10	.1

Used bacteria

TLC method ; *Sarcina lutea* P.C.I. 1001 s-508

Disc method ;

AB-PC : *Bacillus anthracis* 115 s-605

MPI-PC : *Staph. aureus* Russell (PC-R) s-4 B 52

Table 9 Comparison of urine concentrations, assayed by TLC method and disc method

Time after dosing	Urine vol. (ml)	Methods	AB-PC			MPI-PC		
			Level (mcg/ml)	Total (mg)	Rec. (%)	Level (mcg/ml)	Total (mg)	Rec. (%)
2	123	TLC	810	99.7	39.9	1005	123.7	49.5
		Disc	827	101.7	40.7	880	108.3	43.4
4	77	TLC	380	29.4	12.0	447	34.3	13.3
		Disc	367	28.2	11.3	318	24.5	9.8
6	123	TLC	27	3.3	1.3	15	1.8	0.7
		Disc	32	3.9	1.6	16	2.0	0.8
Total	323	TLC	410	132.4	53.0	498	159.8	64.0
		Disc	415	133.8	53.6	418	134.8	54.0

Used bacteria : The same to Table 8.

分 Disc 法が高い値を示した。

MPI-PC では、1/2 時間の TLC 法 4.03 mcg/ml, Disc 法 3.21 mcg/ml, 1 時間値は TLC 法で 2.58 mcg/ml に対し, Disc 法 2.17 mcg/ml, 2 時間では TLC 法 0.53 mcg/ml, Disc 法 0.51 mcg/ml となり, AB-PC と異なり MPI-PC では TLC 法による測定値がいくぶん高い値を示した。

この傾向は尿試料においてもみられ, 両定量法による測定値はおおむね一致するが, AB-PC は Disc 法によるほうが, MPI-PC は TLC 法によるほうがいくぶん高い値を示した。

総 括

AB-PC, MPI-PC 合剤をシリカゲル TLC により AB-PC と MPI-PC に分離した後, *Sarcina lutea* による抗菌検定を行なうことにより両者を同時に, 同一条件で測定することが出来た。またこの測定に際し, 使用した血液は, 全血で 0.2 ml 程度あれば十分に目的を達し得るものであることを確認した。

従来これらの合剤の血液及び尿中濃度の生物学的測定法は, 合剤を構成する組成成分それぞれの単味に対応する耐性菌を用いて, 別々に測定する方法が慣用されていた。この場合, 組成成分の薬剤に対応する耐性菌の発育阻止帯の長さを実測し, 合剤としての影響を受けない濃度範囲を設定して測定するという繁雑さと, 実測値の或る程度の不明瞭さをまぬがれることは出来なかつた。

我々が考案した TLC 分離定量法は, この点同一菌種を用いて, しかも同時に測定し得るという利点を有している。また実際に, 犬, ヒトの血液及び尿中の濃度を測

定し, その成績から充分に実用し得るものであることを証明した。

ヒトにみられた実測値のばらつきは, 測定方法の不確かさを示すものではなく, ヒトの個体差によるものであろう。なお, 今後, 従来の種々の方法による測定法との比較検討は行なう予定である。

文 献

- 1) KARNOVSKY, M. L. & M. J. JOHNSON: Filter paper chromatography of penicillin broths. *Analytical Chemistry* 21, 1125(1949)
- 2) LIGHTBOWN, J. W. & P. DE ROSSI: The identification and assay of mixtures of antibiotics by electrophoresis in agar gel. *Analyst* 90, 89(1965)
- 3) 池川哲郎: 薄層クロマトグラフィ, 第1集。化学の領域増刊 59号
- 4) 金沢 裕, 倉又利夫: 注射用 Aminobenzyl penicillin の使用経験。 *J. Antibiotics, Ser. B* 18, 176 (1965)
- 5) 中川圭一, 庄司文久, 渡辺健太郎: 注射用 Aminobenzyl penicillin の使用経験。 *J. Antibiotics, Ser. B* 18, 180(1965)
- 6) 柴田清人, 田中幸男, 等: Aminobenzyl penicillin の外科領域における臨床使用経験。 *J. Antibiotics, Ser. B* 18, 183(1965)
- 7) 上田 泰, 長谷川勢: Methyl Phenyl Isoxazolyl Penicillin について (II) 吸収, 排泄, 投与方法。 *Chemotherapy* 11, 33(1963)
- 8) 金沢 裕: Methyl chlorophenylisoxazolyl penicillin の吸収, 排泄。 *Chemotherapy* 11, 299 (1963)

STUDIES ON THE SEPARATION AND ASSAY OF MIXTURES OF AMINO BENZYL-PENICILLIN AND METHYLPHENYLISOXAZOLYL-PENICILLIN

RYOCHI FUJII, MASATOSHI KONDO and KAZUHO OKADA

Department of Pediatrics, Tokyo University Branch Hospital, Tokyo

MICHIHIKO KUMAGAI, AKIO YOSHIDA and MEIKI MATSUZAKI

Meguro Work, Banyu Seiyaku Co., Ltd., Tokyo

The mixtures of AB-PC and MPI-PC were separated and assayed by means of a thin layer chromatographic method and bioautographic technique.

This method was applicable to the quantitative assaying of AB-PC and MPI-PC in the blood and urine from human and dogs administered both penicillins simultaneously.