

Pipemidic acid の体液濃度測定に関する検討

清水喜八郎

筑波大学内科

紺野昌俊

帝京大学医学部小児科学教室

深谷一太

東京大学医科学研究所内科

松本文夫

東京慈恵会医科大学上田内科

中山一誠・岩井重富

日本大学医学部第三外科学教室

清水当尚・中村信一

大日本製薬株式会社総合研究所

63 研究機関からなる Pipemidic acid 研究会（世話人：東京慈恵会医科大学 上田 泰教授）において、Pipemidic acid (PPA) の基礎的および臨床的研究過程において、とくに人の血中濃度の測定値にばらつきがみられたため、その原因の究明を目的に、PPA 体液濃度測定小委員会が作られた。

その委員会において本剤の体液濃度測定について検討が行なわれ、ばらつきの要因を製剤側の因子と、測定法に分けて検討し、若干の知見が得られたので、その成績と Pipemidic acid 研究会において採用された PPA 体液濃度測定法について報告する。

1. 製剤に関する検討

PPA^{1,2)} の吸収に及ぼす製剤上の問題点について、以下のような検討を行なった。

〔実験方法〕

PPA の錠剤の含量測定ならびに溶出は、後述する化学的定量法により、また、血中濃度測定は後述する生物学的定量法により行なった。

崩壊度試験は第八改正日本薬局方に準拠して行なった。

〔実験結果〕

1) 錠剤の安定性

PPA 錠の安定性を Table 1 に示すような種々の条件下で経時的に調べた結果、錠剤の含量および崩壊度に变化はみられなかった。

2) 錠剤の含量および崩壊度

任意に抽出された数種のロットの PPA 錠の含量は 98.5~103.4% の範囲で、平均崩壊時間は 5 分 55 秒~13 分 23 秒の範囲であった (Table 2)。

3) 錠剤からの溶出

錠剤からの PPA の溶出は錠剤崩壊に要する時間のため、最初の 5 分間は PPA 三水和物の粉末の溶解よりやや遅れたが、10 分以後では溶解曲線はほぼ一致した (Fig. 1)。

4) *In vivo* での錠剤の崩壊および溶出

PPA 錠の *in vivo* における崩壊および溶出につき調べるため、beagle 犬に PPA 錠および懸濁液を crossover で投与し、血中濃度を測定した。Table 3 に示すとおり両投与剤型の平均血中濃度には大きな差はみられなかった。

Fig. 1 Dissolution of pipemidic acid from tablets

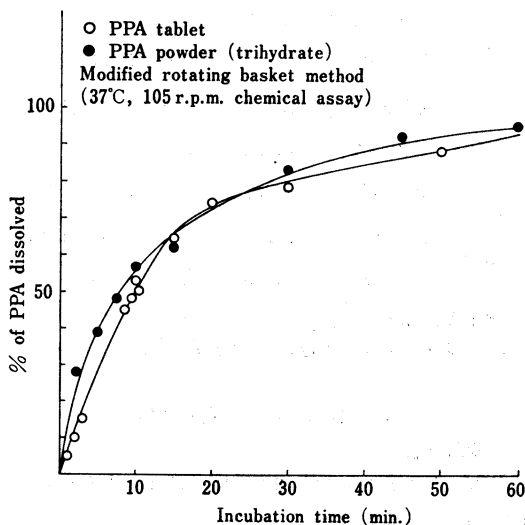


Table 1 Stability of pipemidic acid tablets

Storage condition	Storage period (month)	250 mg Tablet (AT 1)		500 mg Tablet (EKO28A)	
		Content ^{a)} (%)	Disintegration ^{b)} time (min. : sec.)	Content (%)	Disintegration time (min. : sec.)
50°C in a stoppered bottle	0	100.0	6:53*(4:20~10:20)	99.9	7:42(4:30~ 9:45)
	1	100.0	—	99.4	8:53(7:00~12:30)
	3	98.7	—	99.4	8:43(7:20~12:40)
40°C in a stoppered bottle	0	100.0	6:53(4:20~10:20)	99.9	7:42(4:30~ 9:45)
	3	99.6	—	100.0	10:42(7:10~13:06)
	6	100.6	—	99.9	10:33(9:10~14:30)
	12	98.6	—	99.8	10:29(10:40~16:20)
40°C, 80% R. H. in an open bottle	0	100.0	6:53(4:20~10:20)	99.9	7:42(4:30~ 9:45)
	1	100.6	—	99.1	12:50(9:30~15:20)
Irradiated with Xenon lamp in a polyethylene bag	0	100.0	6:53(4:20~10:20)	99.9	7:42(4:30~ 9:45)
	(5 hrs.)	99.3	—	99.2	10:16(7:50~12:45)
Room temperature in a stoppered bottle	0	100.0	6:53(4:20~10:20)	99.9	7:42(4:30~ 9:45)
	3	97.8	9:22(8:00~11:30)	101.9	12:07(11:00~14:00)
	6	100.9	7:43(4:30~13:45)	98.8	10:07(8:00~11:40)
	12	101.3	8:39(4:20~10:15)	97.8	10:15(4:50~14:00)

* : Average (range), a) : Chemical assay, b) : J.P. VIII

Table 2 Content and disintegration time of pipemidic acid tablets

Tablet (mg)	Lot No.	Content ^{a)} (%)	Disintegration ^{b)} time (min. : sec.)
50	E0031A	98.5	7:44*(6:35~ 9:00)
150	E0041A	99.5	6:43(6:00~ 9:00)
	E0046N	101.2	13:23(10:40~15:00)
250	E0026H	103.4	6:26(4:10~11:45)
	E0034A	100.2	5:55(5:10~ 6:20)
	E0047N	100.3	9:16(8:10~12:00)
500	E0035A	101.2	7:15(3:30~11:25)
	F0001P	99.9	7:42(4:30~ 9:45)

* : Average (range)

a) : Chemical assay, b) : J.P. VIII

2. 体液中における安定性

[実験方法]

PPA の血漿中および尿中濃度測定は後述する生物学的定量法により行なった。

[実験結果]

PPA を投与した人の血漿中および尿中活性物質は、4°C で保存した場合少なくとも 1 カ月間、冷凍庫中で -20°C に保存した場合少なくとも 50 日間は安定であった (Table 4, 5)。

3. 生物学的定量法に関する検討

カップ法につき、本剤測定上の条件を検討した。

1) 検定菌

大腸菌 Kp 株 (臨床分離株 : 大日本製薬総合研究所保存), 大腸菌 NIHJ JC-2 株および枯草菌 PCI 219 株を指示菌とし、薄層カップ法で検量線を作成 (pH 7.5, 1/15 M 磷酸緩衝液) したところ、阻止円のみやすさおよびばらつきには菌株間に大きな差はみられず、定量感度は大腸菌 Kp 株を用いた場合最も良好であった (Fig. 2)。

2) 培地

MÜLLER-HINTON Medium (Difco), Heart Infusion Agar (Difco), Nutrient Agar 1.5% (Difco) および Brain Heart Infusion Agar (Difco), pH 7.5 を用いて、大腸菌 Kp 株を指示菌とする薄層カップ法で検量線を作成 (pH 7.5, 1/15 M 磷酸緩衝液) したところ、阻止円のばらつきには差はみられず、定量感度は

Table 3 Comparison between tablet and suspension in the plasma levels of pipemidic acid in dogs

(500 mg/kg, single oral dose)

Dog No.	Sex	Body weight (kg)	Tablet ^{a)}				Suspension ^{b)}			
			Time after administration (hrs.)				Time after administration (hrs.)			
			2	4	6	8	2	4	6	8
587	female	10.5	9.6*	7.1	3.5	<1.5	8.1	6.6	3.5	1.6
578	female	9.5	14.3	11.0	6.8	3.4	8.1	6.0	3.6	<1.5
589	female	11.5	7.5	5.2	2.7	<1.5	6.4	5.4	3.3	<1.5
613	female	10.3	3.9	3.9	1.9	<1.5	5.8	4.6	2.9	<1.5
Mean		10.45	8.83	6.80	3.73	0.85	7.10	5.65	3.33	0.40

a) : 500 mg tablet administered with 20 ml milk

b) : 25 mg/ml suspension in 0.2% carboxymethyl cellulose

* : μg of PPA per ml assayed by the thin-layer cup-plate method

Table 4 Stability of pipemidic acid in human plasma and urine

(stored at 4°C)

Sample No.	Plasma		Urine	
	Initial	After 1 month	Initial	After 1 month
1	13.5*(100)**	13.4 (99)	2,200 (100)	2,200 (101)
2	9.4 (100)	9.2 (98)	1,210 (100)	1,080 (98)
3	8.4 (100)	7.8 (93)	520 (100)	580 (112)
4	2.7 (100)	2.6 (97)	58 (100)	59 (101)
Mean	(100)	(97)	(100)	(101)

* : $\mu\text{g/ml}$, ** : % (by the thin-layer cup-plate method)

Table 5 Stability of pipemidic acid in human plasma and urine

(stored at -20°C)

Sample No.	Plasma		Urine	
	Initial	After 50 days	Initial	After 4 month
1	10.7*(100)**	10.0 (94)	1,030 (100)	990 (96)
2	12.0 (100)	10.4 (87)	1,270 (100)	1,270 (100)
3	6.2 (100)	5.8 (94)	944 (100)	880 (93)
4	4.7 (100)	3.9 (83)	68 (100)	67 (99)
Mean	(100)	(89.5)	(100)	(97)

* : $\mu\text{g/ml}$, ** : % (by the thin-layer cup-plate method)

MÜLLER-HINTON Medium を用いた場合最もよかった (Fig. 3)。

3) 培地 pH

MÜLLER-HINTON Medium の pH を $1/15$ M 磷酸緩衝液で 6, 7 および 8 に変え, 大腸菌 Kp 株を指示菌とする薄層カップ法で検量線を比較したが, 阻止円の大きさやばらつきには大きな変動はみられなかった (Fig. 4)。

4) 基層

20 ml の寒天培地の基層の上に 5 ml の種層を播いた重層平板と 5 ml の種層のみの薄層平板で阻止円の大きさおよびばらつきを比較した。Fig. 5 に示したように, ばらつきには大きな差はみられなかったが, 阻止円直径は後者のほうがかなり大きかった。

5) 培地量

薄層平板を作る際, シャーレ (直径 9 cm) の培地量を

Fig. 2 Influence of indicator organisms

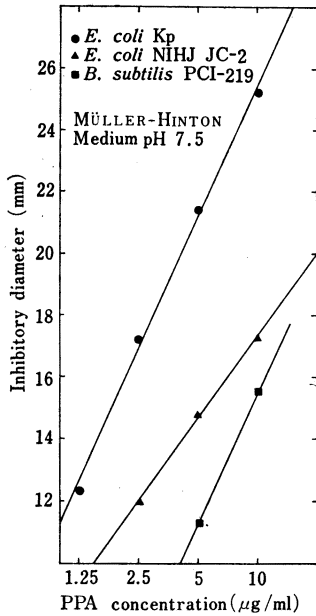


Fig. 3 Influence of media

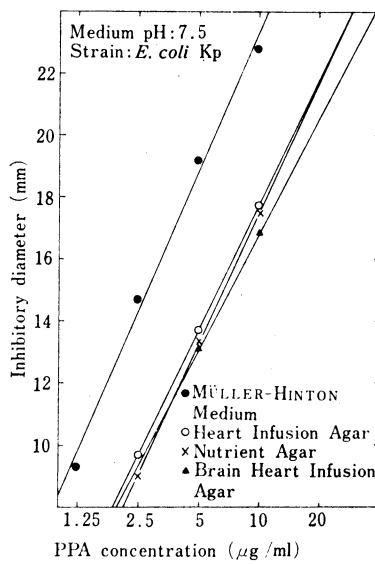


Fig. 4 Influence of medium pH

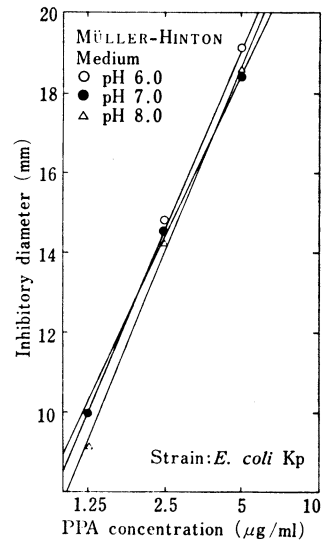


Fig. 5 Influence of a basic agar layer

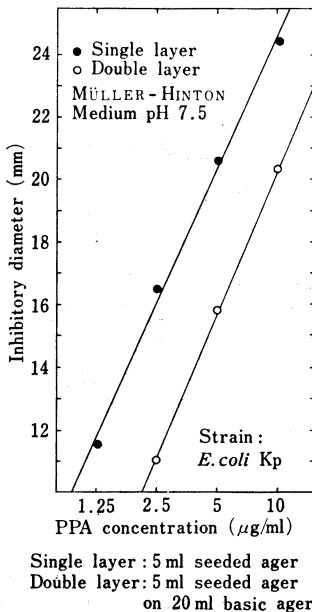


Fig. 6 Influence of medium volumes

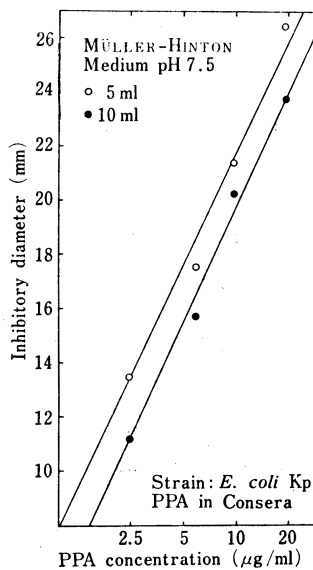
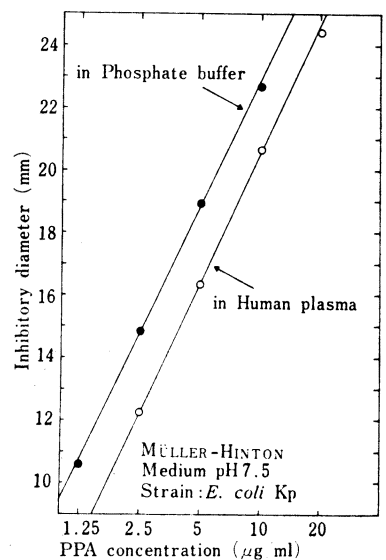


Fig. 7 Standard calibration lines using phosphate buffer and human plasma



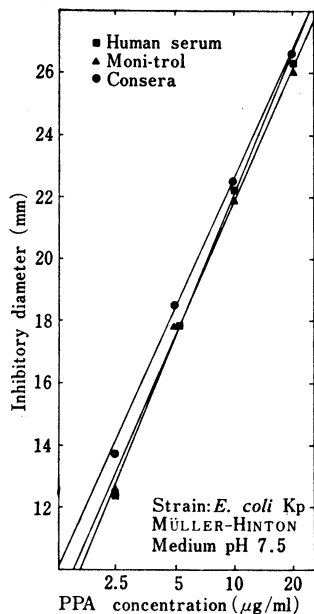
5 mlにした場合と10 mlにした場合を比較したところ、前者のほうが定量感度はやや良好であった (Fig. 6)。

6) 検量線

薄層カップ法において PPA を $1/15$ M 磷酸緩衝液 pH

7.5 および人血漿 pH 7.4 で希釈し 検量線を作成すると、前者の検量線は後者より平行に左にずれ、磷酸緩衝液の検量線から読み取った濃度は人血漿の検量線から読み取った濃度の 60% 前後に相当した (Fig. 7)。

Fig. 8 Standard calibration lines using human serum, Moni-trol and Consera



7) 血清の種類

薄層カップ法で血中濃度を測定する際、検量線作成に用いる血清として Human serum (Flow Laboratories Inc.), Moni-trol (DADE Division, American Hospital Supply Corporation) および Consera (Nissan) の3種を使用し比較したが、血清間に大きな差はみられなかった (Fig. 8)。

8) 検量線の変動

薄層カップ法では、標準液の阻止円の大きさは日により異なる場合があるので、磷酸緩衝液の検量線と Moni-trol の検量線の相対的間隔が日により変動することが予想される。そこで緩衝液検量線から読んだ濃度の Moni-trol 検量線から読んだ濃度に対する比率を各測定日ごとに算出したが、Table 6 に示すとおり 52~61% の範囲であり、あまり大きな変動はみられなかった。

4. 化学的定量値と生物学的定量値の一致性

PPA の血中および尿中濃度測定に用いる化学的定量法は以下に述べる蛍光法を用い、生物学的定量法は前述した方法を用いてその一致性について検討した。

[化学的定量法]

1) 薬物の溶解

58.9 mg の PPA 三水和物を 1 N 酢酸 5 ml に溶解後、水を加えて全量 50 ml とし、PPA 1 mg (無水物換算)/ml の薬物原液を調製した。

Table 6 The ratio of the drug concentrations read from buffer standard to those read from Moni-trol one

Date	Standard	PPA concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
April 10	Moni-trol	20	10	5	2.5
	buffer	11.8	5.9	2.95	1.48
	ratio*	59.0	59.0	59.0	59.2
April 16	Moni-trol	20	10	5	2.5
	buffer	12.2	6.0	2.93	1.43
	ratio	61.0	60.0	58.6	57.2
May 9	Moni-trol	20	10	5	2.5
	buffer	11.2	5.45	2.65	1.30
	ratio	56.0	54.5	53.0	52.0

* : (Buffer/Moni-trol) \times 100

Buffer : $1/15$ M Phosphate buffer, pH 7.5

Assay : The thin-layer cup-plate method using

E. coli Kp and MÜLLER-HINTON Medium, pH 7.5

2) 標準液の調製

血中濃度定量用標準液 : 薬物原液を 0.1 N 酢酸で希釈し、2.0, 1.5, 0.5 および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の標準液を調製した。

尿中濃度定量用標準液 : 薬物原液を $1/5$ M 磷酸緩衝液 pH 6.2 で希釈し、20, 15, 10, 5 および 1 $\mu\text{g/ml}$ の標準液を調製した。

3) 蛍光強度測定

Fluorescence spectrometer (日立 MPF-2A を用いたが他社の機種でもよい) を用い、励起波長 280 m μ 、蛍光波長 444 m μ で蛍光強度を測定した。

4) 検量線

血中濃度定量用検量線 : 各標準液ならびにブランクとして 0.1 N 酢酸 8 ml をそれぞれ 40 ml の遠沈管にとり、血清 (漿) 1 ml をよく混和した後、12% 過クロール酸 1 ml を加え、20 分間 3,000 r. p. m. で遠心分離して除蛋白を行なった。上清液 4 ml を 40 ml の遠沈管にとり、クロロホルム 8 ml を加え、室温で 30 分間振盪を行なった。3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離を行なった後、水層 2 ml を試験管にとり、0.1 N 酢酸 20 ml を加え、蛍光強度の測定を行なった。各標準液の蛍光強度から 0.1 N 酢酸の蛍光強度をブランクとして差引いた値と標準液濃度から換算した血清 (漿) 中濃度 (この場合は標準液濃度の 8 倍) との関係は直線となり、これを血清 (漿) 中濃度定量用の検量線とした。

尿中濃度定量用検量線 : 各標準液ならびにブランクとして $1/5$ M 磷酸緩衝液 pH 6.2 5 ml をそれぞれ 40 ml の遠沈管にとり、pH 6.2 の $1/5$ M 磷酸緩衝液で 5 倍に希

積した人尿希釈液 1 ml を加え、さらにクロロホルム 6 ml を加えて室温で 30 分間振盪した。3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離を行ない、クロロホルム層 3 ml を 10 ml の遠沈管にとり、0.1 N 酢酸 3 ml を加え、室温で 30 分間振盪し、3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離を行った後、水層 1 ml を試験管にとり、これに 0.1 N 酢酸 10 ml を加えて蛍光強度の測定を行なった。各標準液の蛍光強度から $\frac{1}{5}$ M 磷酸緩衝液の蛍光強度をblankとして差引いた値と標準液濃度から換算した尿中濃度（この場合は標準液濃度の 25 倍）との関係は直線となり、これを尿中濃度定量用の検量線とした。

5) 定量操作

血中濃度の定量：血清（漿）1 ml を 40 ml の遠沈管にとり、0.1 N 酢酸 8 ml を加えた。以下検量線作成の場合と同様、過クロール酸で除蛋白、定量妨害物質のクロロホルム抽出、蛍光強度測定、blankの補正を行ない、さきに作成した検量線を用いて得られた蛍光強度に対応する血清（漿）中濃度を求めた。

尿中濃度の定量： $\frac{1}{5}$ M 磷酸緩衝液 pH 6.2 で 5 倍に希釈した人尿希釈液 1 ml を 40 ml の遠沈管にとり、 $\frac{1}{5}$ M 磷酸緩衝液 5 ml を加えた。以下検量線作成の場合と同様、クロロホルム抽出、酢酸逆抽出、蛍光強度測定、blankの補正を行ない、さきに作成した検量線を用いて得られた蛍光強度に対応する尿中濃度を求めた。

用いて得られた蛍光強度に対応する尿中濃度を求めた。

なお、検量線は測定日ごとに必ず作成し、また、蛍光強度が強すぎ検量線の範囲内に入らない場合は 0.1 N 酢酸で試料を適宜希釈した。

6) 定量限界

本法による定量限界は、血清（漿）では約 0.5 μ g/ml、尿では約 50 μ g/ml であった。

〔実験成績〕

蛍光法による測定値と薄層カップ法（MÜLLER-HINTON Medium 使用）による測定値とがどの程度異なるかを調べるため、人の血中および尿中濃度を両法で同時に測定した。結果は Table 7 および 8 にみられるとおり、両測定値はきわめてよい一致を示した。

5. 研究機関間の変動

研究機関の間の測定値の変動を調べるため、同一検体（犬血漿および人血清）の定量を 6 カ所の研究機関で大腸菌 Kp 株を指示菌とする薄層カップ法（後述の小委員会法）により実施した。Heart Infusion Broth 中で 18 時間培養した菌を MÜLLER-HINTON Medium および Heart Infusion Agar に 1% および 0.1% の割合に接種して薄層平板を作製し、検量線は $\frac{1}{15}$ M 磷酸緩衝液 pH 7.0 および Moni-trol を用いて作成した。結果は Table 9 にみられるとおり、各研究機関の測定値は

Table 7 Plasma levels of pipemidic acid in men receiving a single oral dose of 0.5 g

Person	Fluorometry					Bioassay				
	Time after dosing (hrs.)					Time after dosing (hrs.)				
	0.5	1	2	4	6	0.5	1	2	4	6
Y. T.	3.5*	5.4	3.3	1.6	1.1	3.1	5.9	2.9	1.6	<1.2
T. O.	<0.5	6.7	4.7	3.2	—	<1.2	5.1	3.8	2.6	—
H. K.	0.8	3.8	4.2	2.9	2.2	1.3	3.0	3.6	2.2	1.4
Y. K.	3.9	3.7	3.5	2.1	1.6	4.1	3.4	3.3	1.8	1.4
Mean	2.05	4.90	3.93	2.45	1.63	2.13	4.35	3.40	2.05	0.93

* : μ g/ml

Table 8 Urinary levels of pipemidic acid in men receiving a single oral dose of 0.5 g

Person	Fluorometry						Bioassay					
	Time after dosing (hrs.)						Time after dosing (hrs.)					
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~12	12~24	0~2	2~4	4~6	6~8	8~12	12~24
Y. T.	1,801*	730	567	353	186	<100	1,740	920	570	430	205	58
T. O.	478	708	241	169	<100	<100	570	690	315	198	68	37
H. K.	567	1,104	1,149	523	325	126	699	1,080	950	530	375	101
Y. K.	780	2,447	1,276	413	254	<100	885	2,200	1,210	520	350	44
Mean	907	1,247	808	365	191	32	974	1,223	761	420	250	60

* : μ g/ml

Table 9 Consistency of the data of the same samples by the same methods in different research institutes

Sample	Research Institute	Fluorometry	Bioassay								
			Moni-trol				Buffer				
			MH-1%	MH-0.1%	HI-1%	HI-0.1%	MH-1%	MH-0.1%	HI-1%	HI-0.1%	
Human plasma	A		6.3*					6.6	6.3	6.3	
	B		5.2					3.0	2.5	3.1	
	C		6.6	5.4	3.5			3.6	3.2	3.5	
	D		6.8	5.7	6.5	8.7		3.4	4.5	2.2	6.3
	E	4.8*	4.8					3.9	4.1	3.3	
	F	4.87	4.75					2.75	2.82	2.91	
Dog plasma 1	A		16.5					18.0	19.0	19.0	
	B		15.0					9.9	10.05	11.5	
	C		16.2	14.5	12.0			11.0	11.2	9.1	
	D		28.0	14.3	20.0	14.5		15.0	11.2	10.6	12.0
	E	15.2	21.0					16.0	14.2	13.2	
	F	13.6	13.5					8.0	9.64	9.35	
Dog plasma 2	A		5.7					6.0	5.6	5.3	
	B		6.7					3.9	3.3	4.1	
	C		9.6	7.4	4.5			5.6	5.2	4.0	
	D		2.3	2.6	5.0	4.0		1.2	2.1	2.8	3.0
	E	5.6	6.5								
	F	5.36	6.03					3.53	3.44	3.73	

MH: MÜLLER-HINTON Medium
HI: Heart Infusion Agar

Buffer: $1/15$ M Phosphate buffer, pH 7.0
*: $\mu\text{g/ml}$

比較的よく一致し、とくに Moni-trol 検量線を用いた場合、よい一致が得られた。接種菌量は 0.1%，培地は MÜLLER-HINTON Medium の場合定量感度がよかったが、接種菌量 0.1% では菌の発育が薄く、阻止円がみにくい欠点があった。検体の濃度は Moni-trol 検量線から読み取った場合のほうが緩衝液検量線から読み取った場合より高く、前者は同時に測定された蛍光法による定量値とよい一致を示した。

6. PPA 体液濃度測定法

以上の検討結果をもとに、PPA 体液濃度測定小委員会により最終的にまとめられ、本剤の検討に用いられた PPA 体液濃度測定法は以下のとおりである。

大腸菌 Kp 株を検定菌とする薄層カップ法を用いる。

1) 薬物の溶解

PPA は水に難溶であるが、アルカリ溶液には易溶であるので、通常 0.2 N-NaOH を等モル加えて溶解し、水で適宜希釈して 1 mg 力価/ml の薬物原液を調製する（注：PPA 三水和物の原末は 849 μg 力価/mg であ

る）。このように調製した薬物原液は、常温で少なくとも 1 週間は安定である。

2) 標準液の調製

薬物原液を $1/15$ M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で 9 : 1 に希釈し、以後同緩衝液で 2 倍希釈して標準液を調製する。人血清 (漿)、Moni-trol および Consera で標準液を作る場合も緩衝液の場合に準じて行なう（注：人血中濃度を測定する場合は後者の標準液を使用するほうが測定誤差が少ない）。

3) 定量用検定菌

大腸菌 Kp 株を用いる。

4) 定量用菌液の調製

ブイオン寒天斜面培養菌（培養後 7 日間使用可能）1 白金耳（内径 1 mm）を Heart Infusion Broth 10 ml に接種し、37°C で 18 時間培養したものを接種菌液とする。

5) 定量用培地

市販の MÜLLER-HINTON Medium または Heart

Infusion Agar を用いる (註: Heart Infusion Agar より MÜLLER-HINTON Medium のほうが定量感度がよい。なお、通常 1 L に溶解する量を 1.5 L に溶解すると寒天濃度が 1% となり薄層平板が作りやすい)。

6) 薄層平板の作製

定量用培地を溶解後 44~45°C に調整し、定量用菌液を 1% の割合に混和して 5 または 10 ml ずつペトリ皿 (直径 9 cm) に分注し、水平に固まらせる。この場合、培地の温度が 48°C を越えると指示菌が死滅するので注意を要する (註: 5 ml ずつ分注する場合はペトリ皿を 37°C のフラン器中であらかじめ温めておくと、寒天が部分的に固まることなく均一な平板を作りやすい)。

7) 定量用試料

検体を希釈する場合は $1/15$ M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を用いる。

8) 定量操作

カップ法により行ない、37°C、18 時間培養後、測定する。

考 察

PPA の基礎的検討の時点において、生物学的定量法による血中濃度の測定値を各研究機関間で比較すると、ばらつきがみられ、その測定値は 2~5 倍の差が認められた。したがって、このばらつきの要因を究明するために、①製剤上になんらかの問題点があるか否か、②生物学的測定方法自体に問題点があるか否か、の 2 点について検討を行なった。

前者については、錠剤の安定性、含量、*in vitro*, *in vivo* における崩壊性、溶出などについての検討では、とくに問題点は認められなかった。

そこで生物学的測定方法について、検定菌、培地、検量線作成に用いる標準液などについて検討を行ない、本論文で述べたような、一定の方法を設定した。

その方法を用い、同一検体を 6 研究施設で測定し、その測定値を比較したところ、Table 9 に示したとおり比較的よく一致した成績が得られた。

とくに Moni-trol による検量線を用いた場合によく一致した成績が得られた。さらに、その測定値が化学的定量法による測定値と一致した。

以上のような成績から、この方法を PPA の体液濃度測定法の生物学的的方法の標準法とし、各研究施設から了承を得たので、本剤の体液内濃度測定にはすべてこの方法が用いられている。

さきに述べた当初にみられた各研究施設間における血中濃度のばらつきの要因としては、①検量線作成のための標準液の差、②本剤の吸収に対する摂取水分量、食事の影響などが考えられる。

①については、磷酸緩衝液により作成した検量線、血清により作成した検量線から読みとる測定値間に差を認めた。このことは本剤の血清蛋白結合 (Table 10) を示すもので、したがって、その測定に当たってはいかなる検量線を用いたかを明記する必要があるであろう。その点を考慮のうえで測定値を比較すべきである。

Table 10 Pipemidic acid binding with human serum proteins

Filtrate (ml)		0.5~1.5	1.5~2.5	2.5~3.5	3.5~4.5	4.5~5.5	5.5~6.5
serum (%)		47.1	53.3	61.5	72.7	88.9	114.3
Conc. of PPA ($\mu\text{g/ml}$)	2.87	88.6*	85.4	80.1	74.3	72.8	70.9
	6.76	79.1	78.6	74.8	74.5	73.9	71.5
	13.21	81.1	77.5	72.8	69.4	68.0	68.6
	26.93	79.7	74.4	70.8	68.1	66.7	64.0

* : unbound PPA (%)

Experimental conditions

Filtration equipment : a 10-ml filtration cell (Amicon, model 12) with a PM-30 membrane (Amicon) and a magnetic stirrer (Toyo, model MS-16B)

Pressure : 2 kg/cm² with N₂ gas

Temperature : 37°C in an incubator box (Nikon)

Serum : Human serum was purchased from Flow Laboratories, Inc.

(pH 7.2, stored at -20°C till use)

Drug : ¹⁴C-labeled PPA (specific activity; 11.6 $\mu\text{Ci/mg}$)

Assay of drug concentration : radioactivity counting by a Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (Packard, model 3380)

50 μl samples were dissolved in 10-ml dioxane scintillator (protein-free samples) or in a mixture of 0.5-ml solouene 100 (Packard), 10-ml of toluene scintillator and 2 drops of acetic acid (protein-containing samples)

Table 11 Influence of water intake on the plasma levels of pipemidic acid in dogs
(PPA tablet, 500 mg/kg, single oral dose)

Dog No.	Sex & Weight (kg)	With 20 ml milk				Dog No.	Sex & Weight (kg)	With 200 ml milk			
		Time after administration (hrs.)						Time after administration (hrs.)			
		2	4	6	8			2	4	6	8
587	female 10.5	9.6	7.1	3.5	<1.5	1	male 12.0	8.2	5.4	3.1	<1.4
578	female 9.5	14.3	11.0	6.8	3.4	2	male 11.8	11.9	9.5	5.8	2.8
589	female 11.5	7.5	5.2	2.7	<1.5	3	female 13.2	8.9	11.5	—	5.2
613	female 10.3	3.9	3.9	1.9	<1.5	4	female 10.4	12.0	6.6	—	2.2
Mean	10.45	8.83	6.80	3.73	0.85	Mean	11.8	10.3	8.3	4.5	2.6

Assay : The thin-layer cup-plate method using *E. coli* Kp and MÜLLER-HINTON Medium, pH 7.5

②については、摂取水分量 (Table 11)、食事が本剤の吸収にある程度影響を及ぼすことが考えられることである。

しかし成績によっては必ずしも食事の影響は一定しないともいわれているが、成績を比較する場合には、これらの点についての考慮も必要であろう。

ま と め

PPA の血中濃度のばらつきの原因を種々の角度から検討し、以下の結果を得た。

1. PPA 錠の安定性、崩壊および溶出など、製剤上の問題は認められなかった。
2. 血中および尿中の PPA は 4°C および -20°C で安定であった。
3. PPA の生物学的定量法は種々の因子により影響

されるが、条件を一定にすれば精度はよく、低濃度まで測定可能である。

4. 小委員会でもとめた PPA の生物学的定量法と、蛍光法による測定値は一致した。

文 献

- 1) MATSUMOTO, J. & MINAMI, S.: Pyrido [2, 3-d] pyrimidine antibacterial agents. 3. 8-Alkyl- and 8-vinyl-5,8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylic acids and their derivatives. *J. Med. Chem.* 18(1) : 74~79, 1975
- 2) SHIMIZU, M., *et al.*: Pipemidic acid: Absorption, distribution, and excretion. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 7(4) : 441~446, 1975

THE METHOD OF PIPEMIDIC ACID DETERMINATION
SUBCOMMITTEE ON PIPEMIDIC ACID DETERMINATION

KIHACHIRO SHIMIZU

Institute of Clinical Medicine, Tsukuba University

MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, Teikyo University, School of Medicine

KAZUFUTO FUKAYA

Department of Internal Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo

FUMIO MATSUMOTO

Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine

ISSEI NAKAYAMA and SHIGETOMI IWAI

The Third Department of Surgery, School of Medicine, Nihon University

MASANA O SHIMIZU and SHIN-ICHI NAKAMURA

Research and Development Division, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

The subcommittee on pipemidic acid determination examined various factors which might affect bioassay data of pipemidic acid, and following conclusions were obtained.

1. Pipemidic acid tablets were found to be good in their content, stability, disintegration and dissolution.
2. Pipemidic acid in plasma and urine was stable at both 4°C and -20°C.
3. The thin-layer cup-plate method using *Escherichia coli* Kp as an indicator organism was a simple and accurate method of pipemidic acid determination with high sensitivity provided that important factors were controlled properly.
4. The data determined by the thin-layer cup-plate method recommended by the subcommittee were consistent with those determined by the fluorometry.