

Cefotetan (YM09330) の微生物学的定量法による体液内濃度測定法

小宮正行・菊地康博・立花章男・矢野邦一郎
山之内製薬株式会社中央研究所

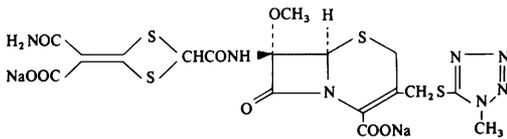
要 旨

新しいセファマイシン系抗生物質である Cefotetan (CTT, YM09330) の体液内濃度測定法ならびに体液中で安定性を検討した。Cefotetan の血漿、尿および胆汁中濃度は、*E. coli* NIHJ を検定菌とし、測定培地には Sensitivity test agar (栄研) を使用し、Trypticase soy broth (BBL) にて 37°C 一夜培養した菌を 1% 接種した場合に鮮明な阻止帯が得られた。薄層ディスク法による Cefotetan の測定感度は 0.1M phosphate buffer で 0.2 μ g/ml, ヒト血漿, Consera, Moni-trol I で 0.78 μ g/ml であった。またヒト血漿, Consera および Moni-trol I で希釈した検量線は phosphate buffer 希釈の検量線より阻止帯が小さかった。しかしヒト血漿を用いた場合と Consera を使用した場合の検量線は良く一致し、Cefotetan のヒト血漿中濃度測定の際には Consera を代用することもできると考えられた。Cefotetan を投与した実験動物から得られた尿、胆汁試料について bioassay 法および高速液体クロマトグラフィー法で測定した値は一致し、両者間で高い相関係数が得られた。Cefotetan はヒトの血漿および尿中において -20°C 凍結保存で、少なくとも 30 日間は安定であった。ラット胆汁中では 4°C 保存で 7 日目に力価低下がみられ、-20°C 凍結保存では、7 日間は安定であった。

結 言

Cefotetan (CTT, YM09330) (Fig. 1) は新しい注射用のセファマイシン系薬剤で、特にインドール陽性 *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* 等のグラム陰性菌に対して強い抗菌力を有し、しかも各種細菌が産生する β -lactamase に対してきわめて安定である^{1,2)}。CTT の吸収、排泄および体内分布を測定するにあたり、体液内濃度測定法ならびに体液中で安定性について検討したのでその結果を報告する。

Fig. 1 Chemical structure of cefotetan (CTT, YM09330)



実験材料および方法

1. 使用薬剤

CTT は当社開発研究所において凍結乾燥された Lot No. L1F を使用した。

2. 検定菌

E. coli NIHJ, *B. subtilis* ATCC 6633 および *M. luteus* ATCC9341 を用いた。

3. 検定用培地

クエン酸ナトリウム培地 (Mycin assay agar + 1% クエン酸ナトリウム), Nutrient agar (NA, 栄研), Sensitivity test agar (STA, 栄研), Antibiotic medium 1 (AM-1, Difco), Heart infusion agar (HIA, Difco), Trypticase soy agar (TSA, BBL) を用いた。

4. 菌液

E. coli NIHJ は TSA にて 37°C 一夜培養した菌を Trypticase soy broth (9ml) に一白金耳接種し 37°C 18~20 時間培養したものを菌液とし検定用培地に 1% 接種した。*B. subtilis* ATCC 6633 は日抗基、一般試験法³⁾に準じて調製した孢子を 640nm における透過率が 7% を示す孢子浮遊液を調整し検定用培地に 1% 接種した。*M. luteus* ATCC 9341 は日抗基、一般試験法に準じて調製した菌液を検定用培地に 1% 接種した。

5. 検定方法

1) 薄層カップ法

検定菌を接種した検定用培地 8ml を直径 9cm のプラスチック・シャーレに分注し、水平台上で固化させた。寒天平板上に cup dropper (永井商会) を用いて stainless cup (内径×外径×高さ = 6 × 8 × 10mm) を 4 個立て、4°C で 30 分程度保存したのち、標準希釈液を cup 内に注入し、予備拡散後培養した。

2) 薄層ディスク法

寒天平板は薄層カップ法で述べた方法で作製し、4℃30分程度保存した。ペーパーディスク(東洋濾紙 K. K. thick 8mm)に一定量の標準希釈液を染み込ませた後、それぞれの間隔が均等になるように1シャーレにつき4枚を寒天平板上に張り付け、予備拡散後培養した。

3) Agar well 法

直径9cmのプラスチック・シャーレに基層19mlを分注し、その上に検定菌を接種した種層培地を5ml重層し水平台上で固化させた。この寒天平板に寒天穿孔機(武田薬品工業 K. K.)を用いて4個のwellを開け、4℃で30分程度保存したのちwell内に100μlの標準希釈液を注入し予備拡散後培養した。

6. 標準曲線

阻止円の直径を正確に計測しその平均値を求め、片対数グラフ上にplotし検量線とした。試料の濃度はこの検量線から読みとった。

7. 標準溶液および希釈液

標準溶液はCTTを0.1M phosphate buffer(pH 7.0)に溶解して1,000μg/ml溶液を調製した。標準希釈液は上記buffer、健康人プール血漿、Moni-trol I(Dada)、Consera(日水製薬 K. K.)、健康成人尿を用いて2倍希釈を行った。また胆汁の場合は胆道疾患の手術例から菌汚染のないことを確かめた胆汁を用い適宜希釈して標準希釈液を作製した。

8. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法

以下の条件下で測定した。

Column	Nucleosil 5C ₁₈ (150mm×4mm)
Column temp.	40~45℃
Mobile phase	0.1M NaH ₂ PO ₄ : CH ₃ CN=92 : 8
Flow rate	1.0~1.4ml/min
Pressure	1600~2000 p. s. i.
Detector	UV(280nm)

9. 尿および胆汁中濃度の測定

CTTを静脈内投与して得られた尿(マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル)および胆汁(ラット、ウサギ、イヌ)をbioassay(薄層ディスク法)ならびにHPLC assayにより測定した。

10. 血漿、尿および胆汁中での安定性

健康成人から得られたプール血漿、尿およびラット胆汁の9容にCTTの10,000μg/ml~100μg/mlの標準溶液1容を加え、血漿では100μg/mlおよび10μg/ml、尿および胆汁では1,000μg/mlおよび100μg/mlの溶液を調製した。これらをtest tubeに小分けして各条件下で保存した。保存条件は血漿および尿中では4℃で7日間、-20℃で30日間とし、胆汁中では4℃および-20℃ともに

Fig. 2 Comparison of standard curves of CTT on various test organisms by cylinder plate method

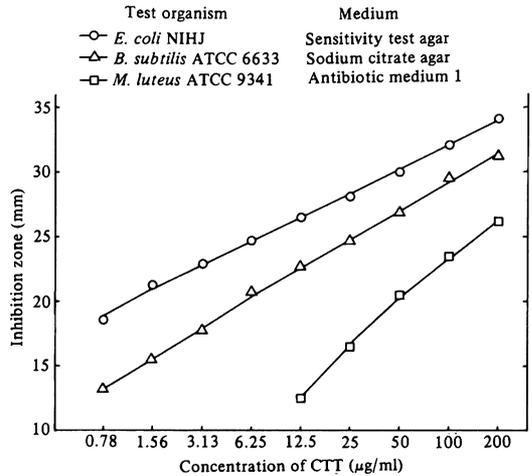


Fig. 3 Comparison of standard curves of CTT on various test organisms by agar well method

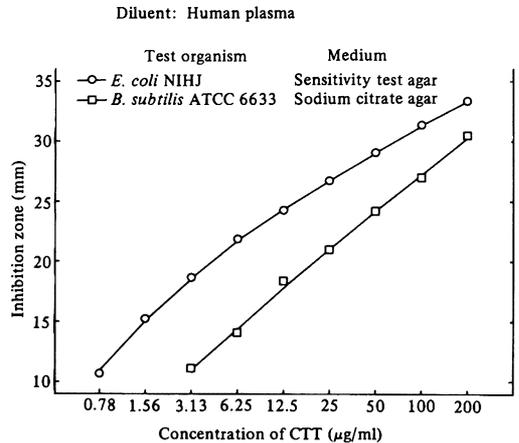
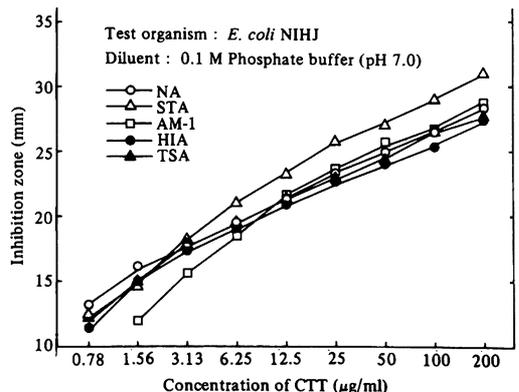


Fig. 4 Comparison of standard curves of CTT on various test medium by disc plate method



7日間行った。

実験結果

1. 検定菌の選択

E. coli NIHJ, *B. subtilis* ATCC 6633 および *M. luteus* ATCC 9341 に対する CTT の感受性を HIA 培地を用い、日本化学療法学会標準法により測定した結果、MIC はそれぞれ $0.1\mu\text{g/ml}$, $3.13\mu\text{g/ml}$, $3.13\mu\text{g/ml}$ となり、三菌種の間では *E. coli* NIHJ が明らかにすぐれていた。これら菌株について、薄層カップ法を用いて 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) で作製した標準希釈液 ($0.78\sim 200\mu\text{g/ml}$) の検量線を比較し Fig. 2 に示した。阻止円径は *E. coli* NIHJ が最大であり、ついで *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 の順となり、特に *M. luteus* ATCC 9341 の測定感度は $12.5\mu\text{g/ml}$ であり最も劣っていた。他の菌種では $0.78\mu\text{g/ml}$ でも測定可能であった。そこで *E. coli* NIHJ および *B. subtilis* ATCC 6633 について、ヒト血漿で作製した標準希釈液 ($0.78\sim 200\mu\text{g/ml}$) を agar well 法により比較した検量線を Fig. 3 に示したが、この血漿を用いた場合でも CTT の検量線は *E. coli* NIHJ が高かった。しかも測定感度でも *E. coli* NIHJ では $0.78\mu\text{g/ml}$ であるのに対し、*B. subtilis* ATCC 6633 では $3.13\mu\text{g/ml}$ となり測定感度は悪かった。以上の結果から CTT の体液内濃度測定における検定菌は、測定感度の高い *E. coli* NIHJ が適当と考えこれを選択することとした。

2. 濃度測定条件の検討

1) 培地の選択

E. coli NIHJ を検定菌とし薄層ディスク法により、phosphate buffer 標準希釈液 ($0.78\sim 200\mu\text{g/ml}$) を用い、NA, STA, AM-1, HIA および TSA 培地の検量線を比較し Fig. 4 に示した。各培地の阻止円径は高濃度域で STA 培地が最も大きく、他の培地間では差がなかった。低濃度域では STA, NA, HIA および TSA 培地間では差は認められなかったが、AM-1 培地の阻止円径は小さくしかも測定感度も $1.56\mu\text{g/ml}$ と他培地に比較し劣っていた。阻止円の形成状態は STA 培地が最も鮮明でついで NA 培地となり、その他の培地は不鮮明な阻止円であった。したがって CTT の濃度測定の場合、*E. coli* NIHJ を検定菌としたときの検定用培地は阻止円の鮮明さならびに検量線の傾きの高い STA 培地が適当と考え選定した。STA 培地の pH を pH6.0, 7.0 および 8.0 とかえたときの検量線に及ぼす影響を phosphate buffer 標準希釈液 ($0.78\sim 200\mu\text{g/ml}$) を用い薄層ディスク法により比較した結果を Fig. 5 に示したが、阻止円径の大きさは高濃度域で若干の差がみられ pH 8.0, 7.0, 6.0 の順に阻

Fig. 5 Effect of medium pH on standard curves of CTT by disc plate method

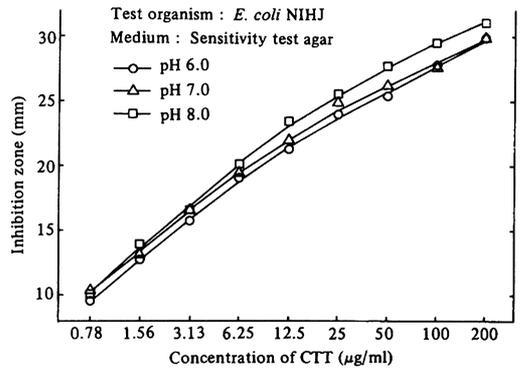


Fig. 6 Comparison of standard curves of CTT on various inoculum sizes using *E. coli* NIHJ (Disc plate method)

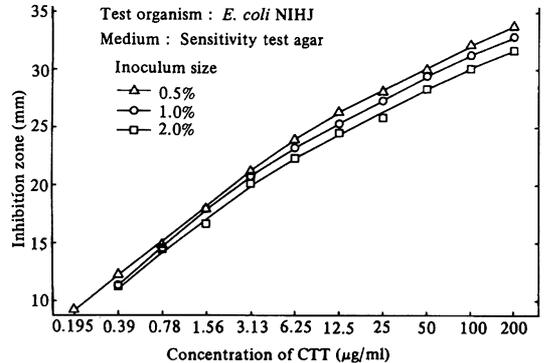
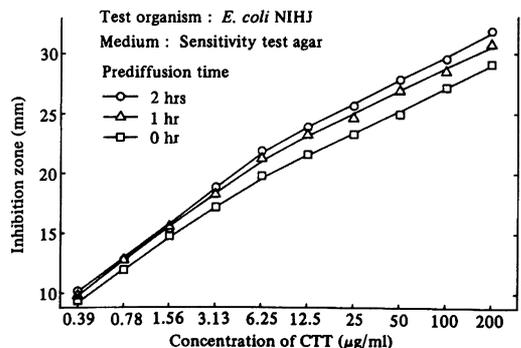


Fig. 7 Comparison of standard curves of CTT on various prediffusion time at 4°C by disc plate method



止円径は小さくなった。しかし低濃度域では各 pH 間に差をほとんど認めず、STA 培地の pH の阻止円に及ぼす影響は少ないと判断でき、培地調製を処方どおり (pH 7.4) 行っても差し支えないと考えられた。

2) 接種菌量の影響

E. coli NIHJ の STA 培地に接種する菌量を 0.5%、1% および 2% としたときの phosphate buffer 標準希釈液 (0.195~200 $\mu\text{g/ml}$) を薄層ディスク法により検量線を求めた。それらを比較して Fig. 6 に示した。阻止円径の最大は 0.5% 接種でみられ、ついで 1%、2% 接種の順に小さくなった。すなわち接種菌量が少ない程阻止円は増大した。測定感度については 0.5% 接種において 0.195 $\mu\text{g/ml}$ まで検出され 1% および 2% 接種では 0.39 $\mu\text{g/ml}$ となり、接種菌量の増加に伴って測定感度が若干低下したがいずれも濃度測定には十分使用しうる感度であった。阻止円の形成状態については 0.5% 接種では colony が疎となりやや不鮮明となった。1% および 2% 接種では鮮明な阻止円が形成されたことから、*E. coli* NIHJ の接種菌量は 1~2% が適当と考えられた。

3) 予備拡散の影響

薄層ディスク法の場合について phosphate buffer 標準希釈液 (0.39~200 $\mu\text{g/ml}$) を用い予備拡散を 0, 1 および 2 時間とかえたときの検量線を Fig. 7 に示した。阻止円径の大きさは 2 時間拡散の場合が最大で、ついで 1 時間、0 時間拡散の順に小さくなった。すなわち予備拡散時間の延長により阻止円径は増大した。しかし測定感度については予備拡散の時間に関係なく 0.39 $\mu\text{g/ml}$ と差がなかった。このことは予備拡散の実施により検量線の傾きが高くなることを意味し、しかも予備拡散しない場合に比し予備拡散した場合の方が、阻止円の鮮明度が高いことから予備拡散の実施が望ましいと考えられた。

4) Phosphate buffer の pH の影響

Phosphate buffer の pH を pH 6.0, 7.0, 8.0 の三種類とし、これを希釈液として用いた場合の標準希釈液 (0.78~200 $\mu\text{g/ml}$) を薄層ディスク法を用いて比較し Fig. 8 に示した。阻止円径への影響は高濃度域ではほとんど差がみられず、低濃度域で大差ではないが pH 8.0, 7.0, 6.0 の順に阻止円径は小さくなった。阻止円の形成状態については各 pH 間に差はなく、いずれの pH でも鮮明な阻止円がえられ希釈液の pH の検量線に及ぼす影響は少ないと判断した。したがって CTT の濃度測定の場合の希釈液の pH については培地 pH に近い pH 7.0 を選んだ。

5) 血漿の影響

ヒトのプール血漿、Moni-trol I、Consera および phosphate buffer で希釈した標準希釈液を、薄層ディスク法により検量線を求めそれらを比較し Fig. 9 に示し

Fig. 8 Effect of diluents on standard curves of CTT by disc plate method

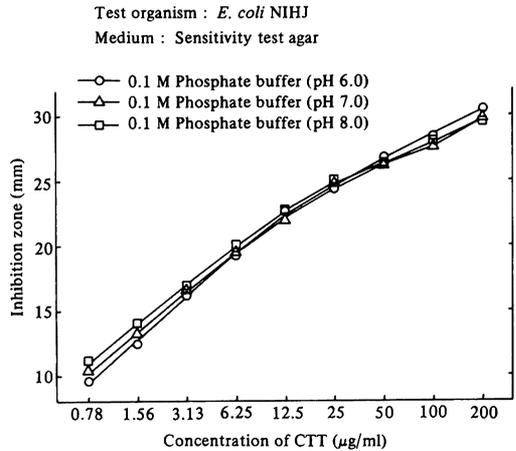


Fig. 9 Effect of diluents on standard curves of CTT by disc plate method

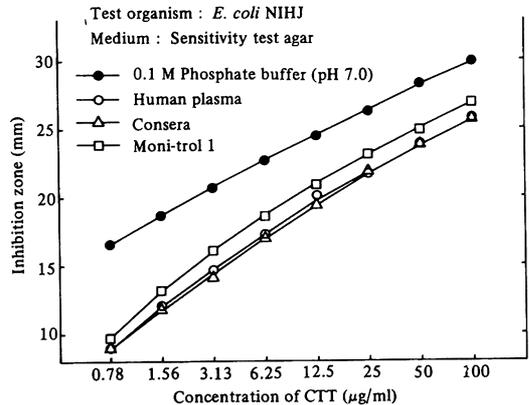
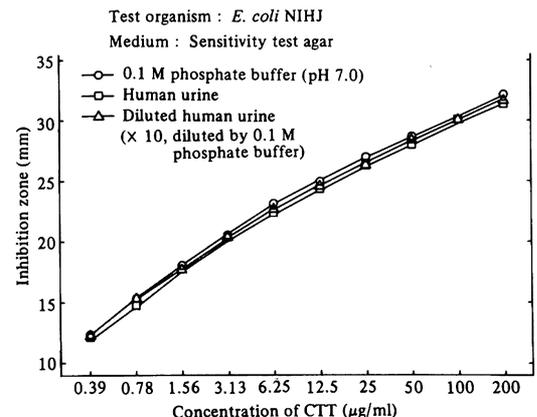


Fig. 10 Effect of diluents on standard curves of CTT by disc plate method



た。ヒト血漿を用いた場合の阻止円径は phosphate buffer の場合に比較し小さく、同一阻止円をえるには 2 ~ 4 倍の濃度が必要となった。ヒト血漿と Moni-trol I および Consera について比較すると、ヒト血漿と Consera の検量線はほぼ一致しているが、両者の検量線は Moni-trol I の検量線よりは若干低めとなった。以上の結果からヒト血漿中濃度測定時の検量線には、ヒトブール血漿を用いるのが好ましいが Consera でも代用できると考えられた。

6) 尿および胆汁の影響

ヒトの尿および胆汁を用いて作製した標準希釈液と phosphate buffer 標準希釈液の検量線を薄層ディスクにより比較し Fig. 10, 11 に示した。原尿および原胆汁を用いた場合の阻止円径は phosphate buffer の場合に比し若干小さくなった。しかし、一般に尿および胆汁中濃度測定の場合には濃度が高いので希釈測定する機会が多い。Fig. 10, 11 に示したごとく、この原液を phosphate buffer で 10 倍希釈した標準希釈液の検量線は phosphate buffer の場合とほぼ一致した。このことからヒトの尿および胆汁中濃度の測定に際しては、原液を 10 倍以上希釈して測定することによって測定誤差は少なくなるものと考えられた。

7) 測定方法の比較

薄層ディスク法、薄層カップ法および agar well 法の三種類の定量法に関して、CTT の phosphate buffer 標準希釈液の検量線を Fig. 12 に示した。高濃度域における阻止円径は agar well 法が最大で薄層カップ、薄層ディスク法の順となり、低濃度域では薄層カップ法が最大で agar well 法および薄層ディスク法は同程度となった。検量線の傾きは三種類の方法のうち agar well 法が最も高かった。測定感度については薄層カップ法が 0.098 μg/ml であったのに対し、agar well 法および薄層ディスク法では 0.195 μg/ml とわずかに悪かったが、いずれの方法を用いても MIC に近い濃度まで検出され、生体内動態を測定するには十分な感度がえられた。

3. Bioassay 法と HPLC 法の比較

CTT を実験動物に静脈内投与してえられた尿および胆汁中濃度を、本実験で検討した bioassay 法(薄層ディスク法)によって測定した値と、これらを HPLC assay 法によって測定した CTT と tautomer を合した total の値とを比較し両方法間の相関を検討した。尿中濃度に関しては bioassay 法および HPLC assay 法の間では相関係数 $r=0.9834$ 、回帰直線方程式 $Y=0.9981X+13.81$ がえられ、両方法の間に高い相関関係が認められた。胆汁中濃度においても相関係数 $r=0.9953$ 、回帰直線方程式 $Y=1.013X+6.849$ となり、尿中ならびに胆汁中ともに

Fig. 11 Effect of diluents on standard curves of CTT by disc plate method

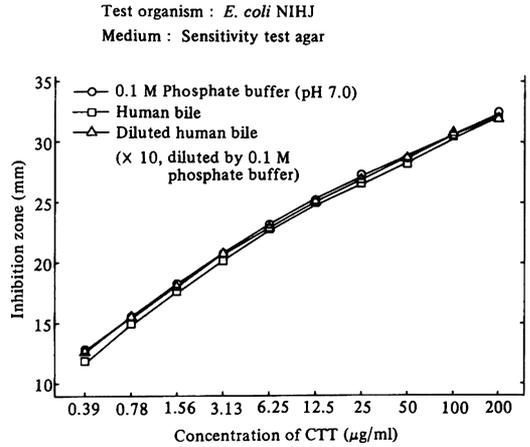


Fig. 12 Comparison of standard curves of CTT on various assay method

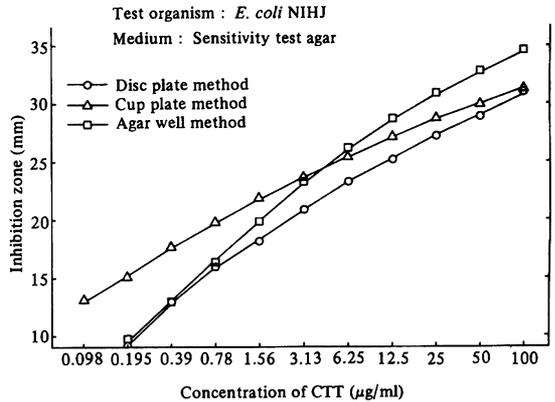
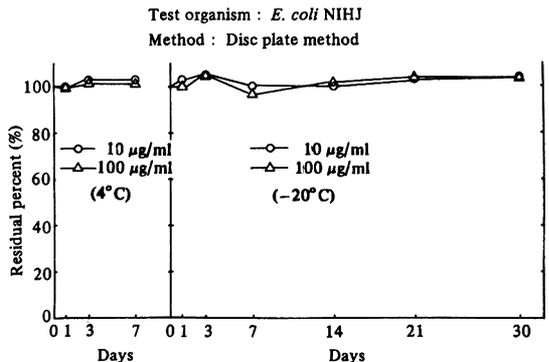


Fig. 13 Stability of CTT in human plasma



bioassay 法と HPLC assay 法による測定値の間には高い相関関係がえられ bioassay 法の妥当性が確認された。

4. 体液中での安定性

CTT のヒト血漿および尿中での安定性を薄層ディスク法により測定し Fig. 13, 14 に示した。血漿中では $10\mu\text{g/ml}$ および $100\mu\text{g/ml}$ とともに 4°C 冷蔵庫保存で7日および -20°C 凍結保存で30日間まで検討したが残存力価の低下は認められなかった。尿中では $100\mu\text{g/ml}$ および $1,000\mu\text{g/ml}$ とともに 4°C で7日および -20°C で30日間まで検討しいずれも力価の低下は認められなかった。一方、ラットの胆汁中における安定性を Fig. 15 に示したように 4°C 保存で7日目に $100\mu\text{g/ml}$ では83%、 $1,000\mu\text{g/ml}$ では86%と残存力価の若干の低下が認められた。しかし、 -20°C に保存した場合には7日間まで検討し、 $100\mu\text{g/ml}$ および $1,000\mu\text{g/ml}$ のいずれの濃度においても力価の低下は認められなかった。

考察および結論

CTT の体液内濃度測定用の検定菌は検出感度の高い *E. coli* NIHJ を選んだ。検定用培地としては阻止円が鮮明で検量線の傾きの高い Sensitivity test agar (STA) を選択し検定条件を検討した。

STA 培地の pH の影響を pH 6.0, 7.0, 8.0 で検討しこれらの検量線と比較すると各 pH 間にはほとんど差がないことから、市販培地 (pH 7.4) を修正することなく使用しうるものと考えられた。接種菌量を 0.5%, 1% および 2% とかえたときの影響は測定感度が $0.5\% > 1\% > 2\%$ の接種順に良かったが、0.5% 接種で colony が疎となるため阻止円が不鮮明となった。したがって 1~2% 接種が適当と考えられた。予備拡散を 0, 1 および 2 時間とかえたときの影響は検出感度の上昇には結びつかなかったが、1~2 時間の予備拡散の実施により阻止円の鮮明度が増し阻止円径の判読が容易となった。希釈液の pH の影響を pH 6.0, 7.0 および 8.0 の 0.1M phosphate buffer で作製した標準希釈液について検討した結果、各 pH 間にはほとんど差がないことから培地 pH に近い 7.0 を選択した。測定方法の違いによる測定感度を phosphate buffer を用いた標準希釈液で比較したところ、薄層カップ法の測定感度が最も高く測定可能な最低濃度は $0.098\mu\text{g/ml}$ で、ついで agar well 法および薄層ディスク法の $0.195\mu\text{g/ml}$ となった。したがっていずれの測定方法を用いても MIC 付近まで検出可能であり、生体試料の濃度測定にはいずれも十分使用可能と考えられた。

ヒトの血漿中濃度測定に際し、標準希釈液としてヒト血漿あるいは phosphate buffer を用いるかにより測定値に違いが生ずることが予想される。ヒトのプール血漿

Fig. 14 Stability of CTT in human urine

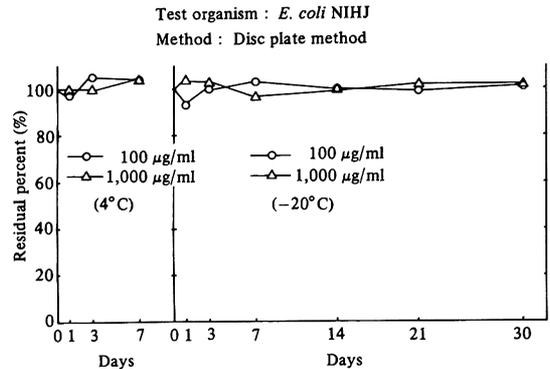
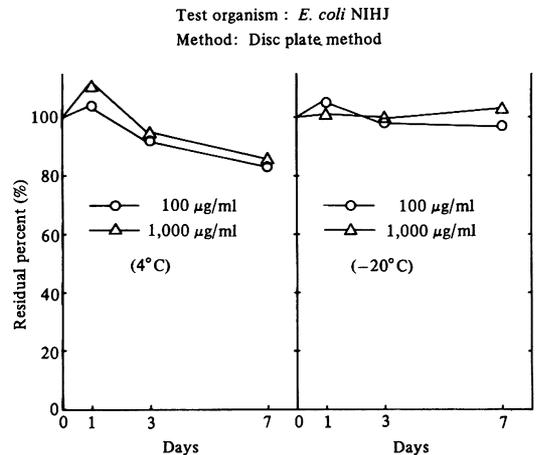


Fig. 15 Stability of CTT in rat bile



と phosphate buffer 標準希釈液の検量線を薄層ディスク法を用いて比較したところ、ヒト血漿を用いた場合の検量線は phosphate buffer の検量線に比し右側に大きく移動し血漿の影響が認められた。この場合ヒト血漿の阻止円が phosphate buffer の検量線と同一の阻止円を示すには 2~4 倍の濃度が必要となった。これは主に CTT の血清蛋白結合率が (約 91%)⁴⁾ 高いことに起因しているものと考えられた。また、ヒト血漿と Moni-trol I および Consera との検量線比較ではヒト血漿と Consera の検量線は良く一致し、Moni-trol I の検量線はそれらより若干高めであった。CTT のヒト血漿中濃度測定時の標準希釈液の作製はヒト血漿が望ましいが、Consera も代用できると考えられた。尿および胆汁で希釈した標準希釈液の検量線を phosphate buffer のそれと比較したが、原尿および原胆汁の検量線は phosphate buffer より若干低めとなり、尿および胆汁を phosphate buffer で 10 倍希釈した検量線は phosphate buffer と良

く一致した。CTTの尿および胆汁中の濃度測定において phosphate buffer で10倍以上希釈すれば測定誤差は少なくなると考えられた。

CTTを実験動物に投与してえられた尿および胆汁を薄層ディスク法およびHPLC法により測定し比較した。CTTはpHおよび体液中のMgイオン等により互変異性体(tautomer)を生じ、採取した尿および胆汁中にも約5%がHPLC法により検出されている⁹⁾。また、tautomerの抗菌価はCTTのそれとほとんど同等であることも報告されている⁹⁾。したがってHPLC法においてはCTTとtautomerが分離定量されるがそれらを合した値を用いた。一方、薄層ディスク法における測定値はCTTとそのtautomerの抗菌活性の総和として計測され、CTTの当量として表現される。両測定法における実測値は、尿では相関係数 $r=0.9834$ および胆汁では $r=0.9953$ となり、bioassay法とHPLC assay法の間で良好な相関性が確認された。

CTTのヒト血漿および尿中での安定性を4℃の冷蔵庫保存ならびに-20℃の凍結保存で検討した。ヒト血漿および尿中ともに4℃で7日間、-20℃で30日間は力価の低下なく安定であった。一方、ラット胆汁中では4℃保存で7日目に残存力価は83~86%と低下した。この傾向はCefmetazole⁷⁾のヒト胆汁中での結果と同じ傾向と考えられた。しかし-20℃保存では7日目までは残存力価の低下は認められなかった。これらのことからすくなくとも-20℃に保存することによって抗菌価の低下を少なくすることができると考えられた。以上の結果からCTTの体液内濃度測定法として次の測定方法が適していると考えられる。

- 1) 検定菌
E. coli NIHJ
- 2) 検定用培地
Sensitivity test agar 培地
- 3) 接種菌液および菌量
Trypticase soy broth(BBL)にて37℃一夜培養した菌液を1~2%接種する。
- 4) 検定方法
薄層カップ法、薄層ディスク法およびagar well法のいずれでもよい。90mmのシャーレを用いるときは薄層では8mlを、agar well法では19ml

(基層)+5ml(種層)を分注する。

- 5) 検体の希釈液
血漿試料は血漿またはConseraで希釈する。尿および胆汁については0.1M phosphate buffer(pH 7.0)を用いて希釈する。
- 6) 標準希釈液
血漿試料を測定する際は血漿またはConseraで作製する。尿および胆汁を測定する際は0.1M phosphate buffer(pH 7.0)で作製する。
- 7) 培養条件
37℃, 18~20時間

文 献

- 1) YANO, K.; K. SUZAKI, M. SAITO, M. TODA, T. SAITO & S. MITSUHASHI *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of YM09330, a new cephamycin derivative. 11th International Congress of Chemotherapy and 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstr. No. 564, 1979
- 2) YANO, K.; K. SUZAKI, M. TODA, T. SAITO & S. MITSUHASHI: β -Lactamase inhibitory activity of YM09330. 20th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstr. No. 159, 1980
- 3) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法。1974
- 4) 小宮正行, 菊地康博, 立花章男, 矢野邦一郎: Cefotetan (YM09330)の実験動物における吸収, 分布, 代謝, 排泄。Chemotherapy 30(S-1): 106~118, 1982
- 5) 菊地康博, 小宮正行, 立花章男, 矢野邦一郎: Cefotetan (YM09330)を実験動物に投与した時のYM09330およびその互変異性体について。Chemotherapy 30(S-1): 137~143, 1982
- 6) TACHIBANA, A.; M. KOMIYA, Y. KIKUCHI, K. YANO & K. MASHIMO Pharmacological studies on YM09330, a new parenteral cephamycin derivative. 11th International Congress of Chemotherapy and 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstr. No. 563, 1979
- 7) 佐橋佳郎, 小島敏昌, 市川正人, 笹原邦宏: CS-1170の体液内濃度測定法に関する研究。Chemotherapy 26(S-5): 127~136, 1978

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHODS OF CEFOTETAN (YM09330) CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

MASAYUKI KOMIYA, YASUHIRO KIKUCHI, AKIO TACHIBANA and KUNIICHIRO YANO

Central Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

The microbiological assay methods for antibiotic concentration in body fluids after treatment of cefotetan (CTT, YM09330), a new semisynthetic cephamycin antibiotic, were described.

The suitable conditions for the assay of the concentration resulted from using of *E. coli* NIHJ as the test organism and sensitivity test agar as the medium, in which 1% of over-night precultured Trypticase soy broth inoculated with the test organism was added. For the determination of the antibiotic concentration in biological specimens, three assay methods, thin-layer cup, thin-layer disc and agar well method, gave the suitable long-range standard curves and revealed good sensitivity. Cefotetan standard curve was not markedly influenced by pH of the medium and of the diluent buffer solution. By the thin-layer disc method, the detectable concentrations of cefotetan were, at the lowest, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ for 1/10M phosphate buffer pH 7.0, and 0.78 $\mu\text{g/ml}$ for human plasma, Consera and Moni-trol I when used as the diluent for the standard solution. The inhibition zone sizes of cefotetan dissolved in human plasma, Consera and Moni-trol I were smaller than those in phosphate buffer solution at pH 7.0. However, the standard curves of cefotetan using human plasma and Consera as the diluent showed almost the same figure. The concentrations of cefotetan in urine and bile detected by the bioassay method were in good agreement with those obtained by HPLC method.

Cefotetan was stable in phosphate buffer solution at pH 7.0, human plasma and human urine at -20°C over a period of 30 days. In rat bile, cefotetan was unstable somewhat at 4°C but was stable during 7 days storage at -20°C .