

Cefixime (CFIX) の体液内濃度測定法

坂本 博・広瀬俊治

大木俊光・峯 靖弘

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

新しい経口用セフェム剤 Cefixime (CFIX) の体液内濃度の測定法、活性代謝物の検索法および体液中での安定性について検討した。

CFIX の血清、尿および胆汁中濃度は通常 *E. coli* ATCC 39188 を検定菌とし、Nutrient agar を検定培地とする寒天平板拡散法で測定でき、その測定感度はカップ法で $0.03\sim 0.06\mu\text{g/ml}$ 、ディスク法で $0.06\sim 0.13\mu\text{g/ml}$ であった。しかし必要に応じてさらに低濃度の CFIX を測定する際は *P. rettgeri* ATCC 35565 を検定菌に用いれば、ディスク法で $0.016\sim 0.03\mu\text{g/ml}$ まで測定可能で、高濃度の場合は *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌に用いれば測定感度は $2\sim 4\mu\text{g/ml}$ と劣るが鮮明な阻止円が得られる。血清中濃度を測定する際の標準液はヒト血清で調製することが望ましいが、コンセーラ等を使用する場合は、ヒト血清による標準曲線と差を認めないロットを使用すべきである。尿、胆汁中濃度の測定には試料を M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で5倍以上希釈することにより、同緩衝液を標準液として使用できる。血清中および尿中濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によっても測定できる。抗菌活性代謝物の検索は薄層 chromatography 後、*E. coli* ATCC 39188 および *B. subtilis* ATCC 6633 を試験菌とする bioautography により可能で、ヒト尿中の活性物質は CFIX のみであった。CFIX は血清および尿中で安定で、 -20°C 、40日間の保存においても約95%以上の残存活性を示した。

序 文

新しい経口用セフェム剤 Cefixime (CFIX) は、グラム陽性菌および陰性菌に広範な抗菌スペクトルを有し、特に弱毒菌を含むグラム陰性桿菌に対しては、従来の経口セフェム剤およびペニシリン剤に比べはるかに強い抗菌活性を示す¹⁾。本報告では CFIX の体液内濃度測定法、bioautography 法による活性代謝物の検索および体液中での安定性について検討したので、以下に成績を述べる。

実験材料および方法

1. 使用薬剤

CFIX は当研究所で合成された力価検定用の標準品 (lot. 100145 G, 力価 $881\mu\text{g/ml}$) を使用した。

2. 検定菌

検定菌として当研究所で保存中の *Escherichia coli* ATCC 39188, *E. coli* ATCC 33546, *E. coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418, *Proteus vulgaris* IAH 1025, *Providencia rettgeri* ATCC 35565 および *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を使用した。*B. subtilis* を除き、検定菌は Trypticase soy agar (BBL) に 37°C 、一夜斜面培養し、0.85% NaCl 溶液で O.D. $660\text{ nm}=1.6$ の懸濁液を調製した。*B. subtilis* ATCC 6633 は日抗基・一般試験法・力価試験法²⁾ に準じて孢子液

を調製した。

3. 感受性試験

Nutrient agar (Difco) および MUELLER HINTON agar (Difco) を用いて、寒天平板希釈法³⁾ により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。接種菌液は Trypticase soy broth で一夜前培養したものを100倍希釈して使用した。

4. 検定用培地

Table 1 に示す培地を使用した。Sodium citrate agar を除き、通常処方⁴⁾の80%に調製して用いた。培地はオートクレーブ滅菌後、約 50°C に冷却し、検定菌を所定量接種し、プラスチックシャーレ (直径 9 cm) に 5 ml あるいは 10 ml を分注し、水平台上で固化させた。

5. 標準溶液の希釈

CFIX の約 10 mg を正確に秤量し、少量の 5% NaHCO₃ で溶解後、M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を加えて、 $1,600\mu\text{g}$ (力価) / ml の溶液を作製した。この溶液を実験の目的に応じて、M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) および体液 (血清、尿、胆汁) で 50 倍に希釈後、同体液で 2 倍系列希釈を行い、標準希釈系列を作製した。血清は健康人から得た血清のプールしたものを、Consera (日水製薬) および Moni-Trol I (ディド社) は処方通りに調製して使用した。尿は健康人数名か

Table 1 Assay media

Medium		Composition(g) per 1000 ml
Nutrient agar(NA)	Difco	18.4
Trypticase soy agar(TSA)	BBL	32.0
Antibiotic medium I(AM-1)	Difco	24.4
D.S.T. agar(DST)	Oxoid	32.0
MEULLER HINTON agar(MHA)	Difco	30.4
Sodium citrate agar		
Trisodium citrate dihydrate	Hayashi Pure Chemical	10.0
Polypepton	Daigo Eiyo Chemical	5.0
Beef extract	Difco	3.0
Bacto-agar	Difco	10.0

ら採尿してプールした。胆汁は胆道疾患の手術例から得たものを、0.45 μ mのフィルターで無菌濾過して用いた。

6. 微生物学的定量法 (bioassay)

1) 薄層ディスク法

濾紙ディスクは直径 8 mm [Thin, size 8 M/M Dia. 東洋製作所(株)] を用いた。3枚のディスクを同一検体に浸し、直ちに濾紙上に約1分間放置して、過剰の検液を除去した後、それぞれ3枚の異った平板上に張り付けた。30分間、室温で予備拡散後、培養した。

2) 薄層カップ法

ステンレス・カップ (内径×外径×高さ: 6×8×10 mm) を平板上に立て、検液0.2mlを注入し、予備拡散後、培養した。

以上のいずれの方法においても、1検体につき異った3枚の平板を使用し、37°C、18~20時間培養後、阻止円径をゾーン・リーダー (永井商会) または画像解析装置 Tospix (東芝) を用い0.1mm単位まで計測し、各阻止円径の平均値を求めた。

7. 検液中の濃度算出法

ディスク法およびカップ法での標準曲線は、一般に薬剤濃度(x)の対数と阻止円直径(y)を2次式: $y = a(\log x)^2 + b(\log x) + c$ に近似させる BENNET らの方法⁴⁾により作成されているが、われわれは非線形最小2乗法により、次に示す3次式に近似して求めた。

$$\log x = ay^3 + by^2 + cy + d$$

x: CFIX 濃度 (μ g/ml), y: 阻止円直径 (mm) この3次式に回帰したときの標準偏差の1例は0.0383で、2次式および1次式に近似させたときの標準偏差、それぞれ0.0470および0.356よりも小さく、また BENNET

らの方法と比較して低濃度での適合性に優れる。検液から得られた y 値の実測値をこの式に代入して、CFIX 濃度 x を求めた。

8. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

1) 血清・尿検体の前処理

血清または尿0.5mlに精製水0.5mlを加え、6%トリクロル酢酸1mlを加えて攪拌し、10,000 r.p.m. 2分間遠心 (Eppendorf Centrifuge 5414) し、その上清を試料とした。標準液は精製水の代りに既知濃度の CFIX 溶液0.5mlを加え、同様な操作を行なった。

2) HPLC 測定条件

カラムは Radial pack C18 (Cartridge column, Waters) を使用し、移動相として血清分析用には、KH₂PO₄: 3g, CH₃CN: 130ml, 蒸留水: 1,000ml, 尿分析用には KH₂PO₄: 1.5g, H₃PO₄: 1.3ml, CH₃CN: 300ml, 蒸留水: 1,000ml を用いた。流速は 2 ml/min, 溶出液は UV, 254 nm で検出した。定量はピーク面積法で行なった。

9. Bioassay および HPLC による再現性

ヒト血清および尿で一定濃度の CFIX 溶液を作製し、*E. coli* ATCC 39188 および *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌として、くり返し実験による精度を求めた。同様に HPLC によっても検討した。

10. 各測定法による測定値の相関性

浜松医科大学・薬理で実施された CFIX 第一相試験 (100mg 単回投与) での血清および尿試料につき、bioassay および HPLC を行ない、両測定での相関性を直線回帰により求めた。また血清試料および尿試料の一部については、それぞれ *E. coli* ATCC 39188, *P. rettgeri* ATCC 33565, および *E. coli* ATCC 39188, *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌としたときの測定値の相関性についても検討した。

11. Bioautography

薄層クロマトグラフィー (TLC) 用シリカゲルシート (No. 5748, Merck 社) に検液の 5~20 μ l をマイクロシリンジでスポットし、風乾後、n-butanol-酢酸-水 (4:1:2) を展開溶媒として、上昇法で約12cm展開した。一方、逆相クロマトグラフィーの場合はシリカゲルシート (No. 805013, Macherey-Nagel 社) を 4% シリコンオイルで処理し、検液をスポット後、M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で展開した。展開後、約1時間風乾し、シートを検体毎に切断した。検定菌、*E. coli* ATCC 39188 を接種した Nutrient agar (Difco) 150ml および *B. subtilis* ATCC 6633 を接種した Sodium citrate agar 150ml をバイオオートグラム用角型シャーレ (320×240×20mm) に分注して水平で固化させた。

上記シートを平板上に貼り付け、20分間室温で放置後、シートを取り除き、37°Cで18~20時間培養し、阻止帯を検出した。

12. 体液中安定性

健康人からのプール血清および尿を用いて、各温度条件下でのCFIXの安定性を検討した。血清9容にCFIX水溶液1容を加え、2および5 $\mu\text{g/ml}$ のCFIX血清試料を作製した。同様にCFIXを20および100 $\mu\text{g/ml}$ 含有する尿試料を調製した。各試料の1mlを試験管に分注し、-20°C、5°Cおよび23°Cに静置し、各時点でのCFIXの残存濃度をbioassayにより測定した。なお尿中濃度はM/15リン酸塩緩衝液(pH7.0)で10倍に希釈して測定した。

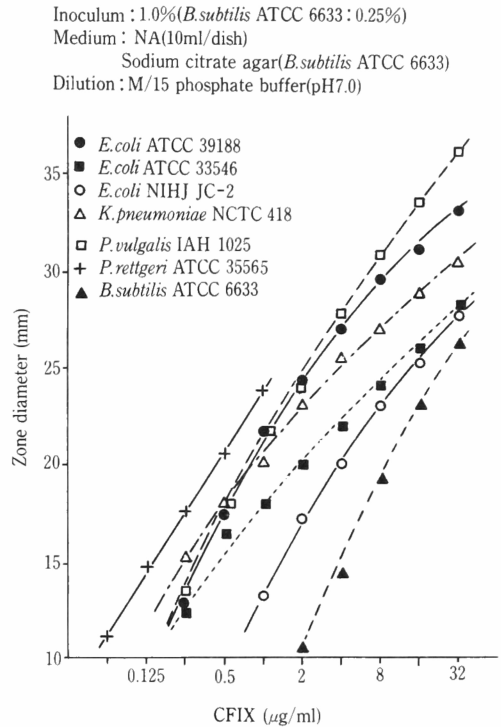
結果および考察

1. 検定菌の選択

Cefixime (CFIX) に感受性の高いグラム陰性桿菌6株とbioassayに汎用される*B. subtilis* ATCC 6633のCFIXに対する感受性をNutrient agar (NA, Difco) およびMUELLER HINTON agar (MHA, Difco) で測定した結果をTable 2に示す。*B. subtilis* ATCC 6633に対するCFIXのMICは100 $\mu\text{g/ml}$ 以上と劣ったが、グラム陰性桿菌はいずれも高い感受性を示した。各菌株について阻止円の鮮明度および測定感度を調べるために、グラム陰性菌ではNAを、*B. subtilis* ATCC 6633ではSodium citrate agarを検定培地として用い、ディスク法で検討した (Fig. 1)。

測定感度は*P. rettgeri* ATCC 35565で最も優れ、次いで*K. pneumoniae* NCTC 418、*P. vulgaris* IAH 1025、*E. coli* ATCC 39188および*E. coli* ATCC 33546が同程度であり、*E. coli* NIHJ JC-2および*B. subtilis* ATCC 6633は前者に比べ劣った。阻止円の鮮明度は*E. coli* ATCC 39188、*E. coli* ATCC 33546、*B. subtilis* ATCC

Fig. 1 Comparison of standard curve of CFIX on various test organism by disc-plate method



6633で良好であり、判定が容易であったが、*K. pneumoniae* NCTC 418、*P. vulgaris* IAH 1025では高濃度で二重阻止帯を生じ、不鮮明であった。また*P. rettgeri* ATCC 35565では、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で不鮮明なため判定が困難であった。*B. subtilis* ATCC 6633は感受性は劣ったが、2 $\mu\text{g/ml}$ まで明瞭な阻止帯を生じた。これは測定培地にクエン酸ナトリウムを添加したため、菌の過度な発育が抑制されたと考えられる。以上の結果より、CFIXの体内液内濃度測定の検定菌として、阻止帯が鮮明で、かつ標準曲線の勾配が比較的大きい*E. coli* ATCC 39188を選定した。さらに感度の点で優れる*P. rettgeri* ATCC 35565および汎用性が高く、高濃度のCFIXを測定できる*B. subtilis* ATCC 6633も併せて選定した。

2. 測定条件の検討

1) 検定培地の検討

寒天培地は一般に処方通り調製して使用されているが、成分量を減らすことにより阻止帯径が大きくなることが判明したので、通常処方の80%に希釈して調製した。

E. coli ATCC 39188を検定菌として5種類の寒天培地

Table 2 Susceptibility of test organisms to CFIX

Test organism	MIC($\mu\text{g/ml}$), $\times 10^{-2}$	
	NA	MHA
<i>E. coli</i> ATCC 38188	0.0125	0.05
<i>E. coli</i> ATCC 33546	0.025	0.025
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.05
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 418	0.0125	<0.00625
<i>P. vulgaris</i> IAH 1025	0.0125	0.0125
<i>P. rettgeri</i> ATCC 35565	<0.00625	<0.00625
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	>100	>100

でディスク法により CFIX の標準曲線を求めた (Fig. 2)。NA, AM-5, AM-1の各培地において, 感度良く測定できたが, 鮮明度の点で NA が最も優れた。DST, MHA および TSA での阻止円径は著しく小さくなった。一方, *P. rettgeri* ATCC 35565 を検定菌とした場合には, TSA および MHA での標準曲線には差が認められなかったが, TSA でより鮮明な阻止円が得られた。NA での菌の発育は不良であるため, 阻止円径の判定は容易でなかった (Fig. 3)。

2) 培地量の検討

寒天平板拡散法では種層が厚くなると, 平板表面と底部への薬剤の拡散が不均一になり, 二重阻止円の原因の一つとなる場合がある。

そこで *E. coli* ATCC 39188 を接種した NA を直径 90 mm のプラスチックシャーレに 10ml および 5 ml 分注した際の阻止円径を比較した。いずれにおいても, 二重阻止円は生じなかったが, 5 ml 分注時, 低濃度で阻止円径は大きくなり, したがって測定感度も優れた (Fig. 4)。*P. rettgeri* ATCC 35565 でも同様な傾向が認められた。

3) 接種菌量の影響

E. coli ATCC 39188 および *P. rettgeri* ATCC 35565 を検定菌とし, ディスク法を用いて接種菌量による標準曲

Fig. 2 Standard curves of CFIX with various media by disc-plate method

Test organism : *E. coli* ATCC 39188
 Inoculum : 1.0%
 Medium : 10ml/dish
 Dilution : M/15 phosphate buffer(pH7.0)

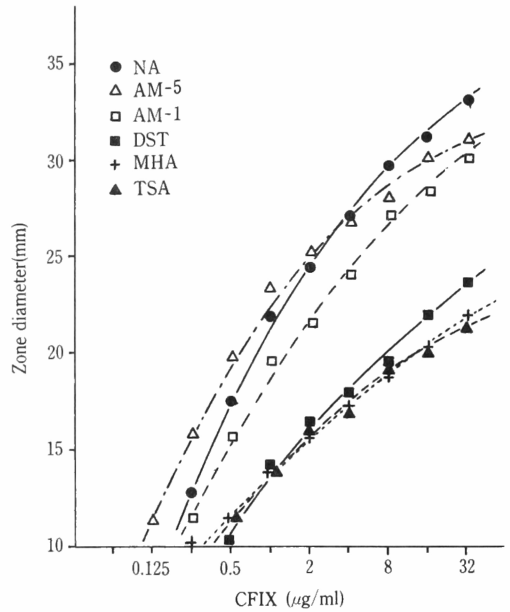


Fig. 4 Influence of amount of medium on standard curve of CFIX by disc-plate method

Test organism : *E. coli* ATCC 39188
 Inoculum : 1.0%
 Dilution : M/15 phosphate buffer (pH7.0)

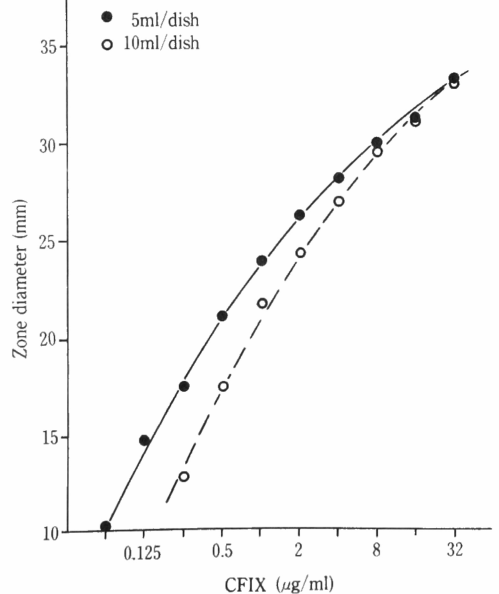
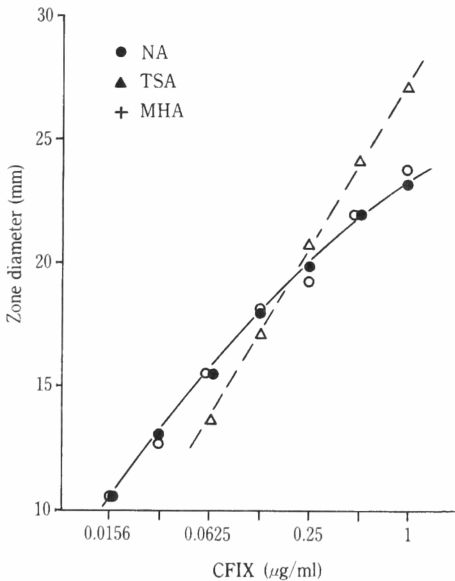


Fig. 3 Standard curves of CFIX with various media by disc-plate method

Test organism : *P. rettgeri* ATCC 35565
 Inoculum : 0.1%
 Medium : 5ml/dish
 Dilution : M/15 phosphate buffer (pH7.0)



線を比較した (Fig. 5, 6)。両検定菌とも接種菌量を減らすと、阻止円径は大きくなり、鮮明度にはほとんど差を認めなかった。したがって、測定感度の点で優れる低接種菌量、*E. coli* ATCC 39188:0.2%、*P. rettgeri* ATCC 35565:0.05% (いずれも O.D.660nm=1.6の菌液) が適当と考えられた。この場合の最終菌量は、前者で 1×10^7 C.F.U./ml、後者で 8×10^6 C.F.U./ml であった。

3. 測定方法

1), 2), 3)の結果から設定された測定条件により、*E. coli* ATCC 39188、*P. rettgeri* ATCC 35565および*B. subtilis* ATCC 6633を検定菌として、カップ法およびディスク法での M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 希釈による標準曲線を比較した (Fig. 7)。

E. coli ATCC 39188を検定菌としたときの検出感度はカップ法で $0.03 \sim 0.06 \mu\text{g/ml}$ 、ディスク法では $0.06 \sim 0.13 \mu\text{g/ml}$ であった。*P. rettgeri* ATCC 35565ではディスク法で $0.016 \sim 0.03 \mu\text{g/ml}$ まで検出可能であった。*B. subtilis* ATCC 6633での感度は前二者より劣り、ディスク法で $2 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ であった。ディスク法はカップ法より測定感度の点で劣ったが、CFIXの体内濃度測定において問題とならないと考えられる。ディスク法

において我々は従来より、ディスクを検液に浸した後、濾紙上に約1分間放置し、過剰の検液を除き、検定培地上に貼り付ける方法をとっている。この方法は迅速性に富むか、マイクロシリンジ等で検液の一定量をディスクに添加するよりは不正確な印象を与える。しかしディスクに付着する液量は約 $20 \mu\text{l}$ と一定であり、両方法により生じる阻止円径にはほとんど差が認められなかった。カップ法では、約1 mlの試料を必要とし、かつ操作に習熟を要する点、試料の注入の迅速さを欠く点等から、比較的少量の試料 (約0.2ml) で、操作も簡単なディスク法は、精度上からも問題ないものと考えられた。

4. 標準曲線に及ぼす希釈液の影響

1) 緩衝液の pH の影響

検定菌として *E. coli* ATCC 39188を用い、pH 5, 6, 7, 8の M 15リン酸塩緩衝液希釈による CFIX の標準曲線を Fig. 8 に示す。各緩衝液間には阻止円径に大きな差はなかったが、pH 8で多少阻止円径は小さくなった。

2) 血清の影響

希釈液としてプールした新鮮ヒト血清、精度管理用血清 (コンセーラおよび Moni-Trol I) を用いたときのカップ法およびディスク法での標準曲線を比較した。

Fig. 5 Influence of inoculum size on standard curve of CFIX by disc-plate method

Test organism : *E. coli* ATCC 39188
Medium : NA(5ml dish)
Dilution : M 15 phosphate buffer (pH7.0)

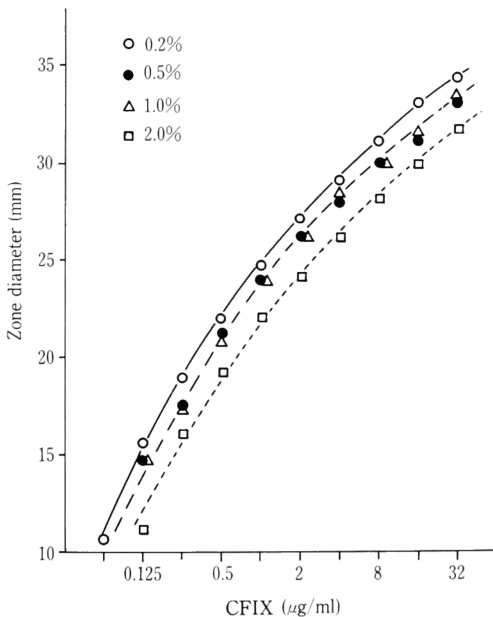


Fig. 6 Influence of inoculum size on standard curve of CFIX by disc-plate method

Test organism : *P. rettgeri* ATCC 35565
Medium : TSA(5ml dish)
Dilution : M 15 phosphate buffer (pH7.0)

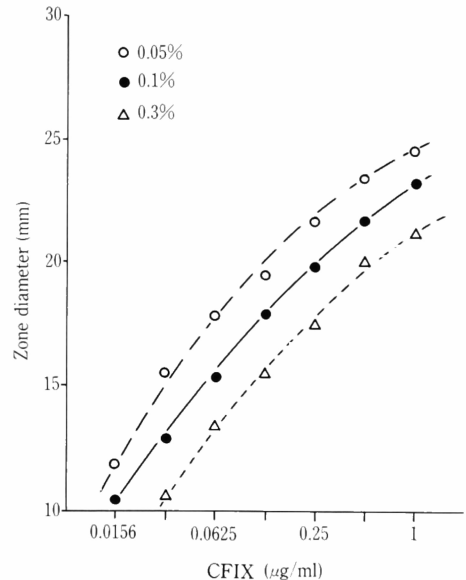


Fig. 7 Standard curve of CFIX in cup-plate and disc-plate methods

Dilution : M 15 phosphate buffer (pH7.0)

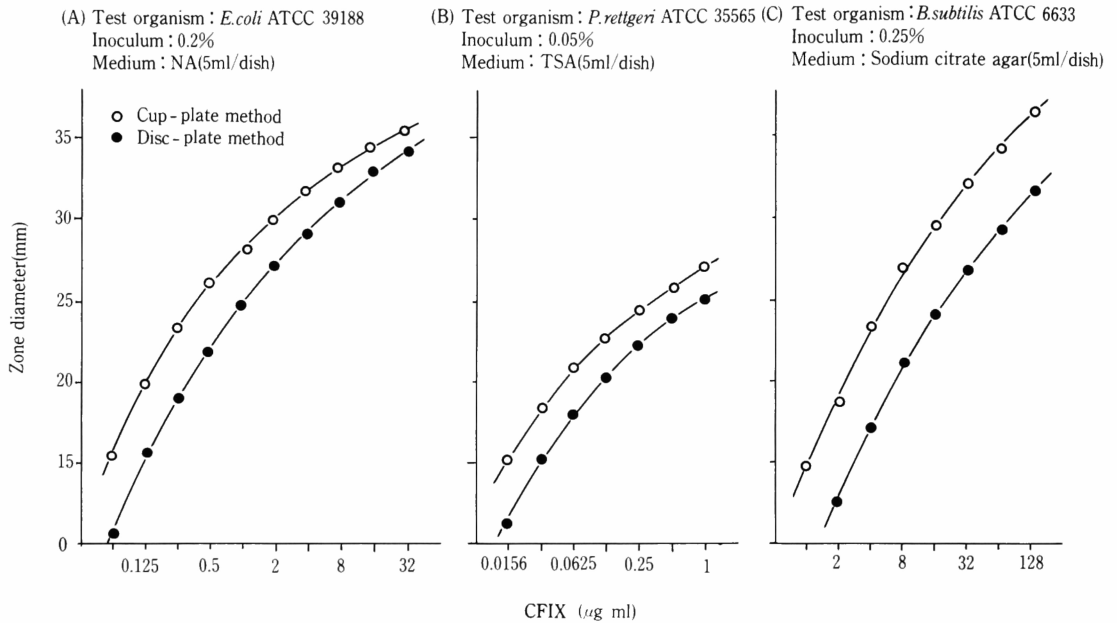


Fig. 9 に示すように、*E.coli* ATCC 39188を検定菌としたとき、カップ法では血清希釈液で緩衝液希釈液より阻止円径は約 4 mm、ディスク法では約 3 mm 小さくなった。新鮮ヒト血清の代わりに、精度管理用血清を用いると、コンセーラではロット間で差が認められ、lot. 186309で調製した希釈液の標準曲線は新鮮血清の場合とほとんど差が認められなかったが、lot. 177211での阻止円径は新鮮血清より大きくなり、低濃度で、その差は拡大した。この lot.を用いた標準曲線から求めた CFIX 濃度は新鮮血清での標準曲線から算出される濃度の約70~80% (ディスク法) および60~70% (カップ法) であった。Moni-Trol Iではコンセーラと異なり、新鮮血清より阻止円は小さくなり、測定値は新鮮血清で算出される濃度より10~20%高くなった。*P.rettgeri* ATCC 35565を検定菌とした場合、*E.coli* ATCC 39188と同様に血清希釈液での阻止円径は緩衝液希釈液より小さくなった (Fig. 10)。以上の結果から、血清中濃度測定に際しては、原液をそのままプールした新鮮ヒト血清で作製した標準液で測定することが望ましい。しかし、代用血清を使用する場合は、予め新鮮血清での標準曲線との間に差がないことを確認したロットを使用すべきと考えられる。

Fig. 8 Influence of buffer pH on standard curve of CFIX by disc-plate method

Test organism : *E.coli* ATCC 39188
Inoculum : 0.2%
Medium : NA(5ml/dish)
Dilution : M/15 phosphate buffer

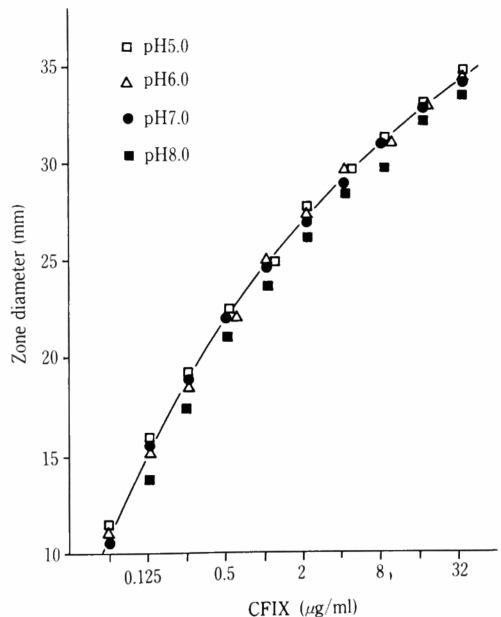


Fig. 9 Influence of human serum on standard curve of CFIX

Test organism : *E.coli* ATCC 39188
Inoculum : 0.2%
Medium : NA(5ml/dish)

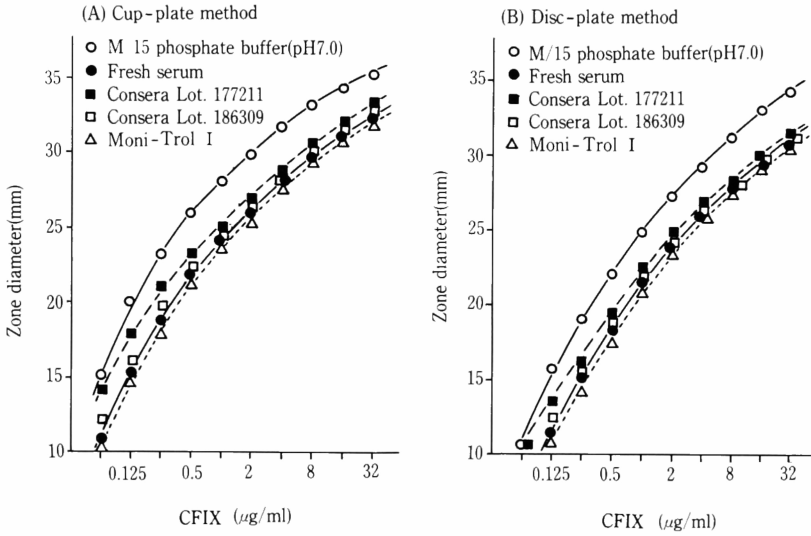


Fig. 10 Influence of human serum on standard curve of CFIX

Test organism : *P.rettgeri* ATCC 35565
Inoculum : 0.05%
Medium : TSA(5mi dish)

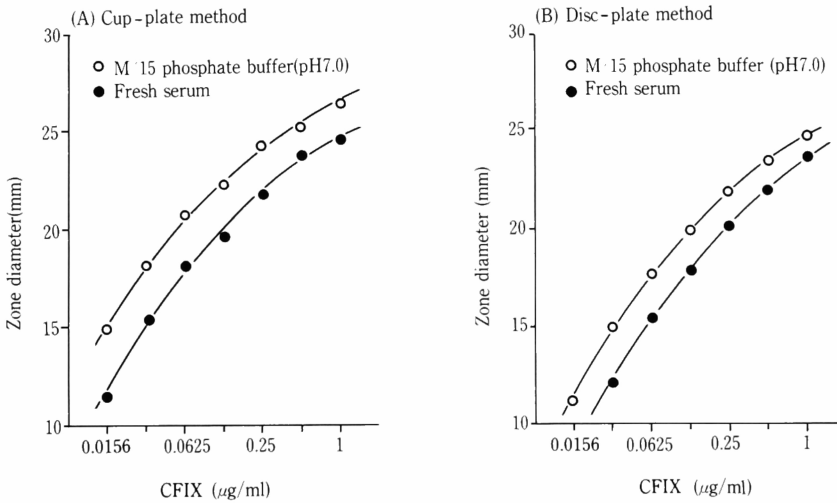
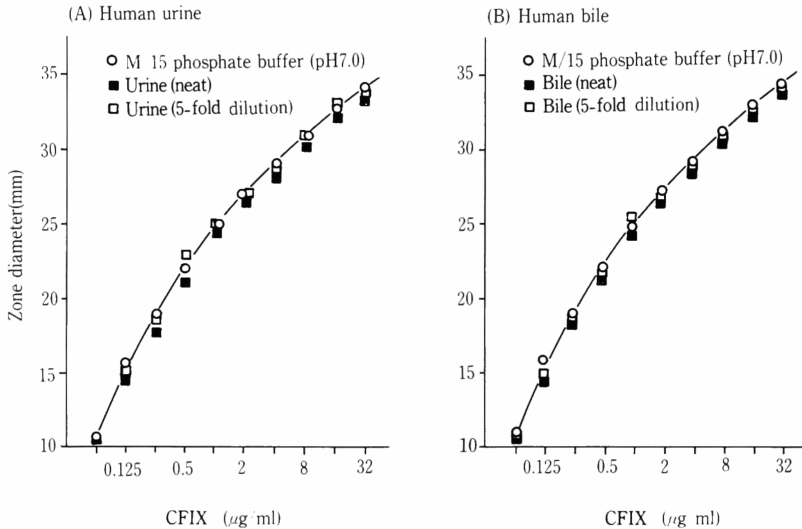


Fig. 11 Influence of human urine and bile on standard curve of CFIX by disc-plate method

Test organism : *E. coli* ATCC 39188
 Inoculum : 0.2%
 Medium : NA(5ml dish)



3) 尿, 胆汁の影響

ヒト尿および胆汁の原液と M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で 5 倍に希釈した時の標準曲線を Fig. 11 に示す。尿, 胆汁ともに標準曲線に与える影響は小さく, 緩衝液で 5 倍に希釈することにより, 緩衝液での標準曲線と一致した。従って尿および胆汁中濃度の測定に際して M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で 5~125 倍に希釈し, 連続する 2~3 段階の希釈液の実測値を平均して算出する方法で, 高濃度の場合でも誤差を少なくし, 精度良く測定可能である。

5. 精度に関する検討

ヒト血清および尿で作製した CFIX の一定濃度の溶液を bioassay (ディスク法) および HPLC 法により, 3~5 回くり返して測定した。Table 3 に示すように, ディスク法による 0.25~2 µg/ml の血清検液での CV%(±標準偏差×100/平均) は 2.3~8.5%, 尿検液では 5.6~19.0% の範囲にあり, 低濃度の血清および尿検液での CV% が大きくなった。しかし 5 回くり返した場合の平均濃度は設定値の 10% 以内で満足できる値であった。尿中濃度は *B. subtilis* ATCC 6633 でも測定した。精度良く測定できた。HPLC 法でのくり返し測定における再現性は血清および尿中濃度ともに, bioassay より優れ, CV% はともに 3% 以下であった。

6. 各測定法による測定値の相関性

ヒトに 100mg 経口投与後の血清および尿中濃度につ

いて, *E. coli* ATCC 39188 を検定菌とするディスク法と HPLC 法で測定したときの相関を Fig. 12 に示す。最小 2 乗法で求めた回帰直線の勾配は, ほぼ 1.0 であり, 相関係数も 0.97~0.99 を示し, 良好な相関関係が認められた。血清検体を *E. coli* ATCC 39188 と *P. rettgeri* ATCC 35565, 尿検体を *E. coli* ATCC 39188 と *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌として測定したときの回帰直線をそれぞれ Fig. 13 および 14 に示す。各測定間の相関性は高く, いずれの方法によっても測定値はほぼ一致した。

以上の結果から, CFIX の bioassay 法を Table 4 に要約した。血清, 尿, 胆汁等 CFIX 濃度が約 0.1 µg/ml 以上を含む体液中濃度は *E. coli* ATCC 39188 を検定菌として Nutrient agar (Difco) を検定培地とするディスク法またはカップ法により測定できる。血清中濃度の測定は新鮮血清で標準液を調整するほうが望ましいが, 代用血清を使用する場合, 予め新鮮血清での標準曲線と差がないことを確認する必要がある。尿および胆汁中濃度は M/15リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で 5 倍以上希釈し, 同緩衝液で調製した標準液によって測定できる。検出感度はディスク法で 0.06~0.13 µg/ml である。喀痰等低濃度の CFIX は *P. rettgeri* ATCC 35565 で測定可能であり, この場合, 測定範囲はディスク法で 0.016~1 µg/ml である。高濃度の CFIX は *B. subtilis* ATCC 6633 でも測定できるが, 検出感度は劣り, 2~4 µg/ml

Table 3 Reproducibility of CFIX determination by bioassay and HPLC in human serum and urine

Method	Test organism	Specimen	Actual conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Analysed conc. ($\mu\text{g/ml}$)		Percentage of actual conc.	S.D.	Coefficient of variation (%)
				Mean	Range			
Bioassay	<i>E. coli</i> ATCC 39188	Serum (n=5)	2	1.97	1.88-2.08	98.5	0.009	4.6
			1	1.03	0.95-1.13	103	0.07	6.8
			0.5	0.50	0.48-0.51	100	0.01	2.3
		Urine (n=5)	0.25	0.27	0.23-0.29	108	0.02	8.5
			32	31.4	29.8-33.9	98.1	1.77	5.6
			8	8.18	7.51-8.84	102	0.52	6.4
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Urine (n=5)	2	2.06	1.78-2.46	103	0.29	14.0
			1	1.03	0.82-1.25	103	0.18	17.4
			0.5	0.53	0.42-0.64	106	0.10	19.0
		Urine (n=5)	128	128	118-137	100	8.17	6.4
			32	31.1	28.3-33.9	97.2	2.16	7.0
			8	8.31	7.87-8.76	104	0.42	5.1
HPLC	Serum (n=3)	0.5	0.51	0.50-0.52	102	0.01	2.3	
		1.0	0.98	0.97-0.99	98.0	0.01	1.2	
		2.0	2.01	1.97-2.04	101	0.04	1.8	
	Urine (n=4)	10	10.2	9.9-10.0	101	0.10	1.3	
		20	19.9	19.3-20.6	99.5	0.50	2.7	
		40	40.1	39.0-41.2	100	1.00	2.4	
		60	60.2	59.2-60.8	100	0.70	1.1	
		80	79.9	78.9-81.4	99.9	1.10	1.4	

Fig. 12 Correlation between CFIX concentrations obtained from bioassay and HPLC assay

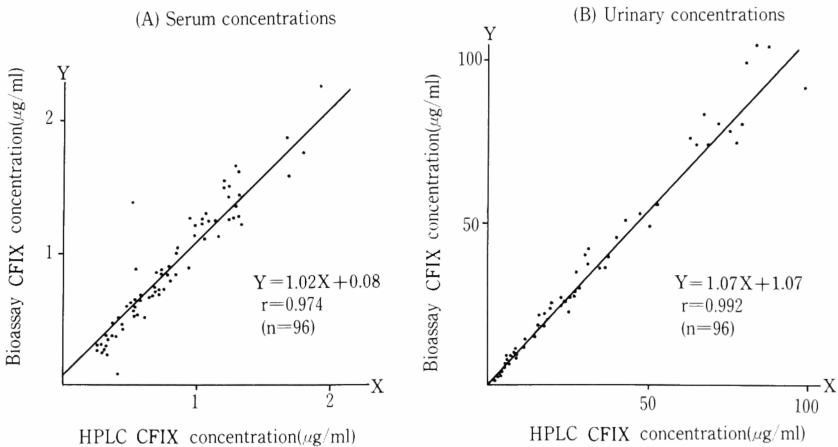


Fig. 13 Correlation between the serum levels obtained from disc-plate method with *E.coli* ATCC 39188 and *P.rettgeri* ATCC 35565

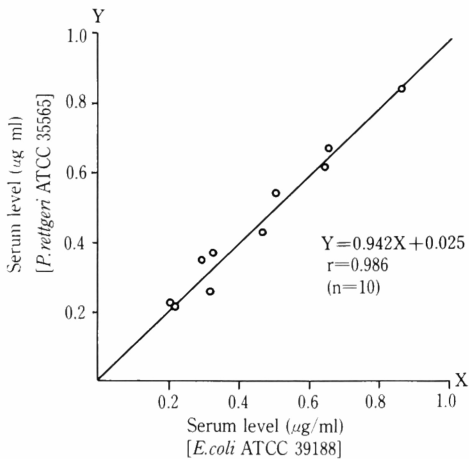


Fig. 14 Correlation between the urinary levels obtained from disc-plate method with *E.coli* ATCC 39188 and *B.subtilis* ATCC 6633

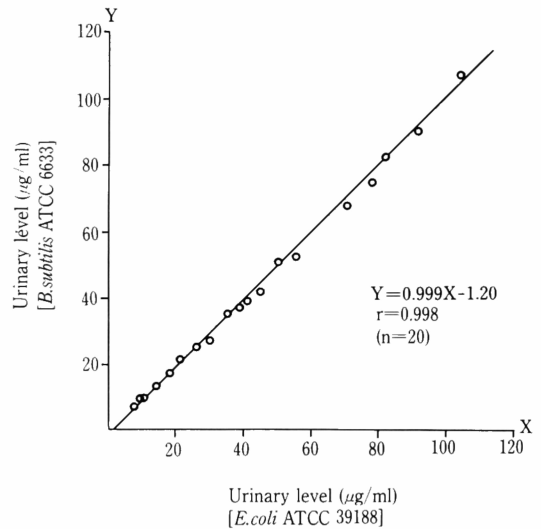


Table 4 Standardization of bioassay of CFIX in biological specimens

Test organism	<i>E. coli</i> ATCC 39188	<i>P. rettgeri</i> ATCC 35565	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
Inoculum	0.2% of cell suspension (O.D. ² =1.6, 5×10^8 CFU/ml)	0.05% of cell suspension (O.D.=1.6, 8×10^8 CFU/ml)	0.25% of spore suspension (O.D.=2.0, 2×10^9 spores/ml)
Medium(per 1000ml of dist. water) ¹⁾	Nutrient agar(Difco) 18.4g	Trypticase soy agar(BBL) 32.0g	Sodium citrate agar Sodium citrate 10g Polypeptone 5g Beef extract 3g Bact-agar 10g
Assay range ($\mu\text{g/ml}$)	0.03–32.0	0.008–1.0	1.0–128
Specimen	Serum, Urine, Bile, Tissue	Serum, Sputum, Tissue	Urine
Minimal detectable concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
Cup method	0.03–0.06	0.008–0.016	1.0
Disc method	0.06–0.13	0.016–0.03	2.0–4.0
Standard solution		Fresh serum (Consera) ³⁾ M/15 phosphate buffer (pH7.0)	
Serum assay			
Assay for others (Urine, Bile, etc)			
Incubation		37°C, 18–20h	

1) Inoculated medium (5 to 6ml) distributed to petri dishes (9mm I.D.)

2) O.D. reading taken in a Hitachi Model 100-22 Spectrophotometer at 660 nm and 1-cm cell

3) It is necessary to confirm that the standard curve prepared with consera is agreement with that with fresh serum.

mlである。

7. 活性代謝物質の検索

CFIXの100mgをヒトに経口投与した時の尿について、活性代謝物をTLC-bioautographyで検索した。展開溶媒としてn-butanol-酢酸-水(4:1:2)を用いた系で、*E.coli* ATCC 39188および*B.subtilis* ATCC 6633によるbioautographyを行なうと、 $R_f=0.2$ に単

一の阻止帯が得られ、CFIX標品の R_f 値と一致した(Fig.15)。また逆相クロマトグラフィーでも、CFIXは $R_f=0.3$ に検出され、活性代謝物は認められなかった(Fig.16)。

8. 体液中安定性

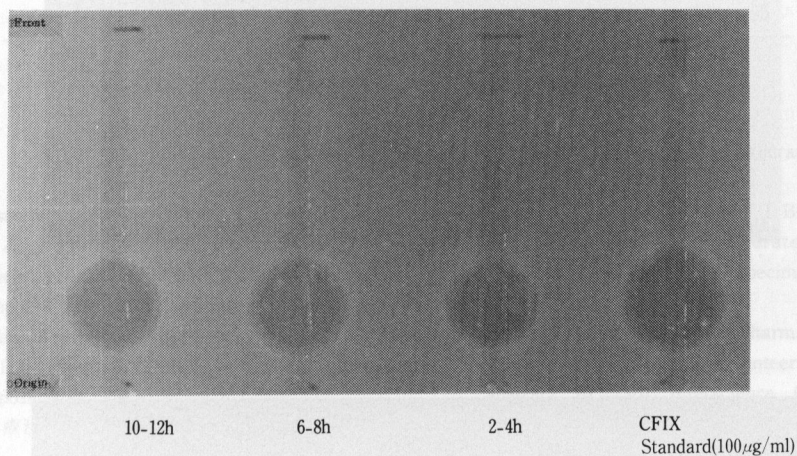
各温度条件におけるヒト血清および尿中のCFIX残存率をTable 5に示す。CFIXは低温では安定であ

Fig. 15 TLC-bioautograms of human urine after oral administration of CFIX (100mg)

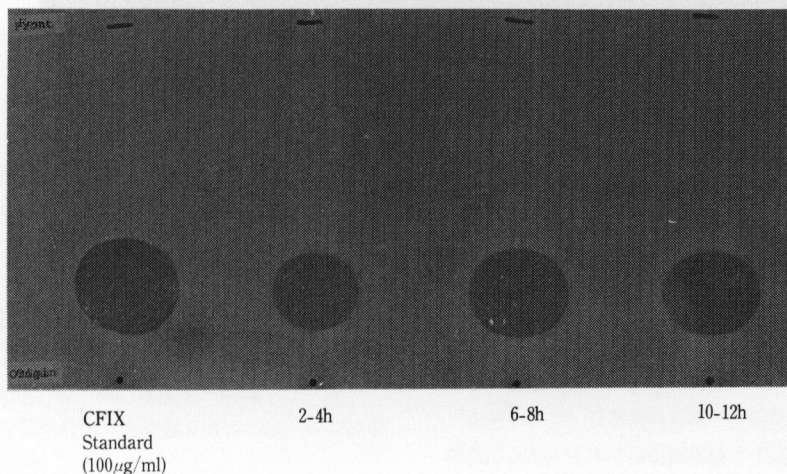
TLC plate : Silica gel G (Art. No.5748 Merck)

Solvent : n-butanol-acetic acid-water(4:1:2)

(A) Test organism : *E.coli* ATCC 39188



(B) Test organism : *B.subtilis* ATCC 6633



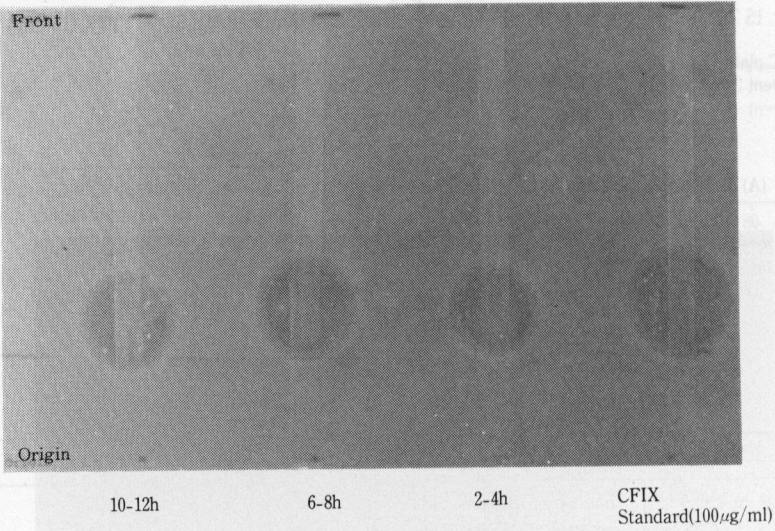
り、血清、尿中ともに-20°Cでは40日間安定に保存できた。5°Cでは5日間で94%以上の残存率を示したが、23°Cでは血清中で1日でも90%以下になる場合もあり、

尿中では5日で90%以下になった。したがって、CFIXの濃度測定に際し、測定まで-20°Cに保存することが必要である。

Fig. 16 TLC-bioautograms of human urine after oral administration of CFIX (100mg)

TLC plate:Silica gel G(Art. No.805 013, Marcherey-Nage treated with 4% silicon oil
Solvent :M/15 phosphate buffer(pH7.0)

(A) Test organism : *E.coli* ATCC 39188



(B) Test organism: *B.subtilis* ATCC 6633

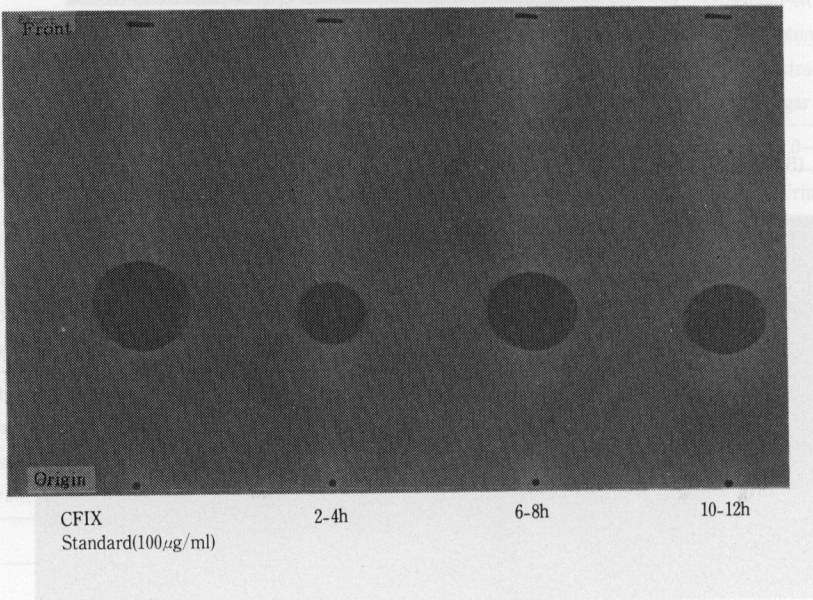


Table 5 Stability of CFIX in human serum and urine
residual %

Specimen	conc.($\mu\text{g/ml}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	residual %						
			1	2	5	12	20	30	40day
Serum (pH7.2)	2	23	93	91	76	—	—	—	—
		5	99	101	100	95	85	66	57
		-20	—	99	103	105	100	100	96
	5	23	88	85	71	—	—	—	—
		5	96	95	94	90	81	64	53
		-20	—	100	97	97	96	98	98
Urine (pH7.1)	20	23	97	95	87	—	—	—	—
		5	96	99	96	92	88	80	73
		-20	—	99	97	98	98	98	95
	100	23	97	94	85	—	—	—	—
		5	98	101	94	87	85	78	70
		-20	—	100	95	100	95	92	95

文 献

- 1) KAMIMURA, T.; H. KOJO, Y. MATSUMOTO, Y. MINE, S. GOTO & S. KUWAHARA: *In vitro* and *in vivo* antibacterial properties of FK027, a new orally active cephem antibiotic. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 25: 89~104, 1984
- 2) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法 p628~633, 1982
- 3) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 4) BENNET, J. M.; J. L. BRODIE, E. J. BENNER & W. M. M. KIRBY: Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl. Microbiol.* 14: 170~177, 1966
- 5) NAKASHIMA, M.; K. UENO: Pharmacokinetics and safety of FK027 in healthy volunteers. Program and abstract of 23rd Interscience Conference on antimicrobial Agents and Chemotherapy, 130, 1983

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CEFIXIME,
A NEW ORALLY ACTIVE CEPHEM ANTIBIOTIC,
IN BIOLOGICAL SPECIMENS

HIROSHI SAKAMOTO, TOSHIHARU HIROSE

TOSHIMITSU OKI and YASUHIRO MINE

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

The microbiological assay methods for measuring concentrations, bioautography method and stability of cefixime (CFIX) in biological specimens are described.

The concentrations of CFIX in the serum, urine and bile were assayed by the cup and disc-plate diffusion methods, using *E. coli* ATCC 39188 as the test organism and Nutrient agar (Difco) as the test medium. *P. rettgeri* ATCC 35565 and *B. subtilis* ATCC 6633 were also used, the former for assaying lower concentrations and the latter for higher concentrations of CFIX.

The minimal detectable concentrations of CFIX by the disc-plate method were 0.06~0.13 $\mu\text{g/ml}$ for *E. coli* ATCC 39188, 0.016~0.03 $\mu\text{g/ml}$ for *P. rettgeri* ATCC 35565 and 2~4 $\mu\text{g/ml}$ for *B. subtilis* ATCC 6633. The sensitivity for CFIX by the cup-plate method was approximately twice that by the disc-plate method. For determination of CFIX concentrations in human serum, serum standard solutions were made with fresh pooled human serum. Lyophilized serum products prepared from human blood were also used, but it was necessary to confirm that the standard curve prepared with the serum agreed with that prepared with the fresh serum. The standard solutions were prepared with M/15 phosphate buffer (pH 7.0) for assay of urine and bile samples, and the samples were diluted 5-fold or more with the same buffer. Serum and urinary levels of CFIX after oral administration to human were also determined by high performance liquid chromatography. CFIX concentrations obtained by HPLC were in good agreement with these obtained by microbiological assay.

Bioautography method of silica gel thin layer chromatography was examined for detecting CFIX and its active metabolites in human urine. The results showed that the active substance in urine was CFIX itself.

CFIX was stable in human serum and urine during 40 days storage at -20°C .