

新しい経口セファロスポリン剤, Cefdinir の体液内濃度測定法

坂本 博・広瀬俊治¹⁾

波多野和男・峯 靖弘

藤沢薬品工業株式会社*：開発研究所, 新薬研究所¹⁾

桑原章吾

東邦大学医学部微生物学教室

新しい経口セファロスポリン剤, cefdinir (CFDN) の体液内濃度の測定法および体液中での安定性について検討した。

微生物学的定量法 (bioassay) において, CFDNに高度感受性を示す菌株から検定菌として *Providencia stuartii* ATCC 43665 を選定し, Antibiotic medium No 1 を培地として寒天平板拡散法で測定した。この時の測定感度はカップ法で0.063 μ g/ml, agar-well 法およびペーパー・ディスク法で0.13 μ g/ml であり, 尿中濃度等 CFDNの高濃度の測定に適応できる。一方, *P.stuartii* ATCC 43665 を変異処理して得た *P.stuartii* ATCC 43664 を検定菌とした時, 血漿中の CFDNはカップ法, agar-well 法で0.016 μ g/ml, ペーパー・ディスク法で0.03 μ g/ml まで検出可能であり, 血漿中, 組織内濃度など CFDNの低濃度域での測定に使用できる。血漿中濃度の測定時, 標準液はプールした新鮮ヒト血漿または血清で作成すべきである。

血漿および尿中の CFDNは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によっても定量でき, 測定感度はそれぞれ0.4および0.5 μ g/ml であった。

ヒトに CFDNを経口投与時の血漿および尿試料を bioassay と HPLC 法によって同時に測定した時, 両方法での測定値はほぼ一致した。

血漿および尿中の CFDNは-20°Cに凍結保存すると1週間, -80°Cでは28日間安定に保たれた。

Key words : Bioassay, HPLC, Cefdinir, Body fluid

新しい経口セフェム剤, cefdinir (CFDN) は *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* を含むグラム陽性菌およびグラム陰性菌に広範囲な抗菌スペクトルを示す。感受性菌の MIC₉₀は \leq 0.025~1.56 μ g/ml に分布し, 従来の経口セフェムおよびペニシリンに比べ強い抗菌活性を有する¹⁾。本報告では, CFDN の体内動態を知るための微生物学的定量法, 高速液体クロマトグラフィーによる定量法および体液中での安定性について検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

CFDNは当研究所で合成された標準品を使用した。

2. 検定菌

当研究所で保存中の菌株の中から, CFDNに感受性の高い *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *E. coli* ATCC 39188, *Proteus mirabilis* ATCC 21100, *Providencia stuartii* ATCC 43665 を使用した。さらに, *P.stuartii*

ATCC 43665 を横田ら²⁾の方法に準じて, ニトロソグアニジンで変異処理して得られた高度感受性株, *P.stuartii* ATCC 43664 を用いた。*B.subtilis* を除き検定菌は Trypticase soy agar (TSA, BBL) で37°C, 一夜斜面培養し, 0.85%NaCl 溶液で OD_{660nm}=1.3の懸濁液 (約 10⁹cfu/ml) を調製した。*B.subtilis* ATCC 6633は日抗基・力価試験法³⁾に準じて孢子液を調製した。

3. 感受性試験

Mueller Hinton agar (MHA, Difco) を用い, 寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した⁴⁾。接種菌量は 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

Antibiotic medium No 1 (AM-1, Difco), Nutrient agar (NA, Difco), D.S.T.agar (DST, Oxoid) およびTSAを通常処方⁵⁾の80%に調製して用いた。*B.subtilis* を検定菌にした時は, sodium citrate agar (クエン酸 Na 1%, ポリペプトン0.5%, 肉エキス0.3%, 寒天末1%)

を用いた。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7 ml分注した。Agar-well法では基層10mlに種層5 mlを重層した。

5. 標準溶液

CFDNの約10mgを正確に秤量し、少量の5% NaHCO₃水溶液で溶解後、M/15リン酸塩緩衝液（pH7.0）を加えて、6.4mg/mlの溶液を作製した。この溶液を実験の目的に応じて、各緩衝液および体液（血清、血漿、尿、胆汁）で50倍に希釈し、これを順次倍数希釈し、標準溶液とした。血清および血漿は数名の健康人から採血しプールしたものを、Consera（日本製薬）およびMoni-Trol I（デイド社）は処方通り調製して使用した。尿は健康人数名から採尿しプールした。胆汁は胆道疾患の手術時に得たものを無菌フィルターで濾過して用いた。

6. 微生物学的定量法（bioassay）

ペーパー・ディスク法（ディスク法）、カップ法およびagar-well法により測定した。ペーパー・ディスクは直径8 mm thin（ADVANTEC, TOYO）、カップは外径8 mm、内径6 mm、高さ10mmのステンレスシリンダーを用いた。Agar-wellは外径6 mmの薄刃をつけたシリンダーで平板に孔を穿孔した。ディスク法では20 μl、カップ法では0.3ml、agar-well法では50 μlの検液を分注または浸み込ませ、1検体につき異なった3枚の平板を使用し、室温で約30分間の予備拡散後、37°C、18~24時間培養した。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）を用いて計測し、3枚の平板での平均値を求めた。

7. 液体クロマトグラフィー（HPLC）

1) 血漿および尿の前処理

ヒト血漿0.2mlに内部標準としてcefuroxime（日本グラクソ）の20 μg/ml水溶液0.2mlを加えて攪拌後、CH₃CN 0.8mlを加え10,000r.p.m. 2分間遠心（Eppendorf centrifuge 5414）し、抽出上清0.9mlを分取し、N₂ガスで風乾し、0.2mlの蒸留水に溶解後、遠心上清をHPLC用サンプルとした。標準液はCFDNの既知濃度の血漿溶液を作製し、同様に処理した。尿は遠心して沈澱物を除去後、M/15リン酸塩緩衝液（pH7.0）で5~50倍に希釈し、同緩衝液を用いて標準液を作製した。

2) HPLC 測定条件

血漿分析ではカラム TSK gel ODS-120T（長さ15cm、内径4.6mm、東洋ソーダ）を使用し、移動相として0.3% KH₂PO₄-H₃PO₄（pH2.9）：CH₃CN=88：12、流速0.8 ml/min、尿分析ではカラム TSK gel ODS-80TM（長さ15cm、内径4.6mm、東洋ソーダ）、移動相30mM クエン

酸（pH2.5）：CH₃CN=88：12、流速0.8ml/minとし、注入量は10~20 μl、溶出液はUV254nmで検出した。定量はピーク面積法により行った。

8. 体液中安定性

健康人からのプール血漿および尿を用いた。血漿または尿9容にCFDN水溶液1容を加え、2 μg/mlの血漿溶液、10および100 μg/mlの尿溶液を調製し、室温（20°C）、4°C、-20°C、-80°Cに静置し、CFDNの残存濃度をbioassayにより測定した。

II. 実験結果

1. 検定菌の選定

グラム陽性菌およびグラム陰性桿菌6菌株のCFDNに対する感受性およびディスク法での検出感度をTable 1に、このときのM/15リン酸塩緩衝液（pH7.0）希釈による標準曲線をFig.1に示す。

ここで検討した6菌株のうち、*P. stuartii* ATCC 43665が検出感度、阻止円の鮮明度の点で優れており、検定菌として選定した。*B. subtilis* ATCC 6633は阻止円も鮮明であり、緩衝液では0.13 μg/mlまで検出可能であったが、血漿中では0.5 μg/mlと低下した。その他の菌株では感受性は高いものの阻止円径の鮮明さ、感度の点で劣った。

P. stuartii ATCC 43665を検定菌としたときの検出感度は0.13 μg/mlであり、本剤の血中濃度を精度よく低濃度まで測定するためにはさらに2~4倍感度を高める必要があった。このため、増殖期の*P. stuartii* ATCC 43665をTris malleic buffer（pH7.6）中でニトロソグアニジ

Table 1. Susceptibility of test organisms to CFDN and its minimal detectable concentration determined by bioassay (disc-plate method)

Organism	MIC (μg/ml)	Minimal detectable concentration (μg/ml)	
		buffer ^{a)}	plasma ^{b)}
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1.56	0.125	0.5
<i>E. coli</i> ATCC 39188	0.05	0.5	0.5
<i>P. mirabilis</i> ATCC 21100	0.025	0.25	0.5
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.05	0.25	0.5
<i>P. stuartii</i> ATCC 43665	0.0125	0.125	0.125
<i>P. stuartii</i> ATCC 43664	0.00156	0.0156	0.0313

^{a)} M/15 phosphate buffer (pH 7.0)

^{b)} Human plasma

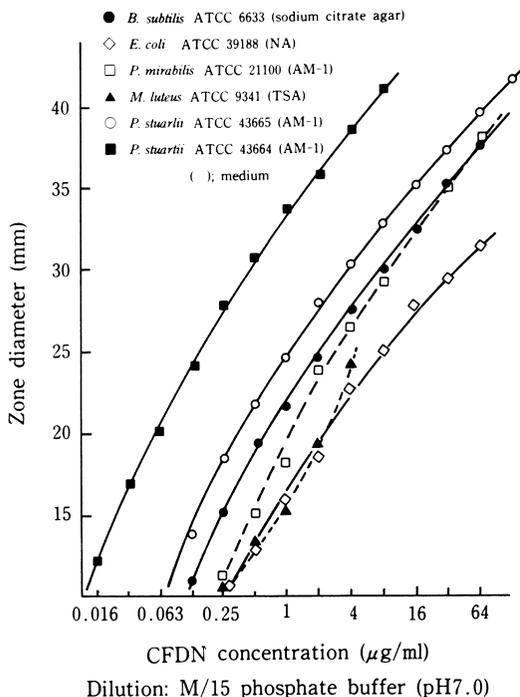


Fig. 1. Comparison of standard curves of CFDN for various test organisms by disc-plate method.

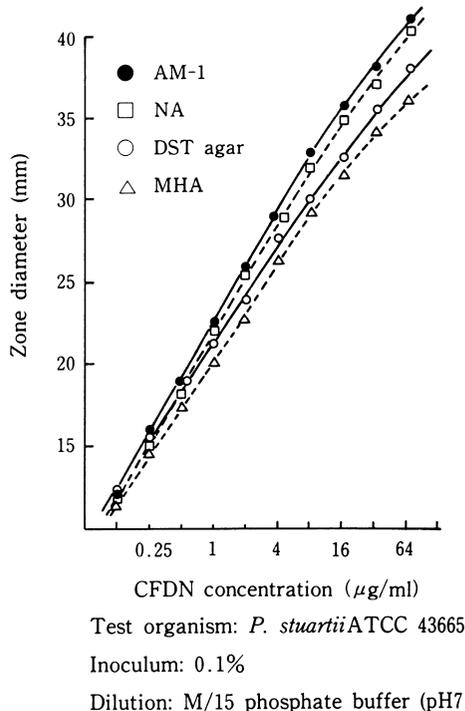


Fig. 2. Standard curves of CFDN for various media by disc-plate method.

ン125μg/mlで30分間 incubation して変異処理を行い、CFDN の MIC で0.00156μg/ml と親株の0.0125μg/ml より 8 倍感受性が上昇した変異株 *P.stuartii* ATCC 43664 を誘導した。*P.stuartii* ATCC 43664 は 8 μg/ml 以下では阻止円像も鮮明であり、検定菌として使用できるものであった。以上により、CFDN の検定菌として血漿中濃度等の低濃度測定時には *P.stuartii* ATCC 43664 を、尿中濃度等の高濃度から低濃度の幅広い濃度域の測定用としては *P.stuartii* ATCC 43665 を選択した。また、*B.subtilis* ATCC 6633 も汎用性の点で優れるため高濃度域では適応できる。

2. 測定条件の検討

1) 検定培地の検討

P.stuartii ATCC 43665 を検定菌として、4 種類の寒天培地でディスク法により CFDN の標準曲線を求めた (Fig.2)。阻止円径は MHA < DST < NA < AM-1 の順に大きくなったが、検出感度はいずれも 0.13μg/ml で差がなかった。阻止円径の鮮明さ、勾配の大きさの点で AM-1 が最も優れた。

2) 接種菌量の影響

P.stuartii ATCC 43665 および *P.stuartii* ATCC 43664 を検定菌としてディスク法により接種菌量による標準曲

線を比較した (Fig.3)。両検定菌ともに接種菌量を増加すると、阻止円径は小さくなった。*P.stuartii* ATCC 43665 の菌懸濁液 OD_{600nm} = 1.3 は 6 × 10⁸ cfu/ml であり、この 0.05% および 0.1% 接種時では 0.13μg/ml、0.5% 接種時は 0.25μg/ml まで検出可能であり、阻止円像は 0.05% 接種時にやや判定が困難であったため、0.1% 接種、最終菌量 6 × 10⁸ cfu/ml が適当であった。*P.stuartii* ATCC 43664 (OD_{600nm} = 1.3, 2 × 10⁸ cfu/ml) では接種菌量により阻止円径は大きく影響を受け、0.2% 接種、最終菌量 4 × 10⁸ cfu/ml での計測が容易であった。この時の検出感度は 0.016μg/ml であった。

3) 測定方法

1), 2) の結果より選定した条件に従って、*P.stuartii* ATCC 43665 および *P.stuartii* ATCC 43664 を用い、カップ法、agar-well 法およびディスク法での M/15 リン酸塩緩衝液 (pH7.0) 希釈による標準曲線を比較した (Fig.4)。両検定菌ともにディスク法 < agar-well 法 < カップ法の順に阻止円径は大きくなった。*P.stuartii* ATCC 43665 では 128μg/ml 以下、*P.stuartii* ATCC 43664 では 8 μg/ml 以下の範囲で適用でき、前者での検出感度はカップ法で 0.063μg/ml、agar-well 法およびディスク法では 0.13μg/ml、後者ではカップ法で 0.008

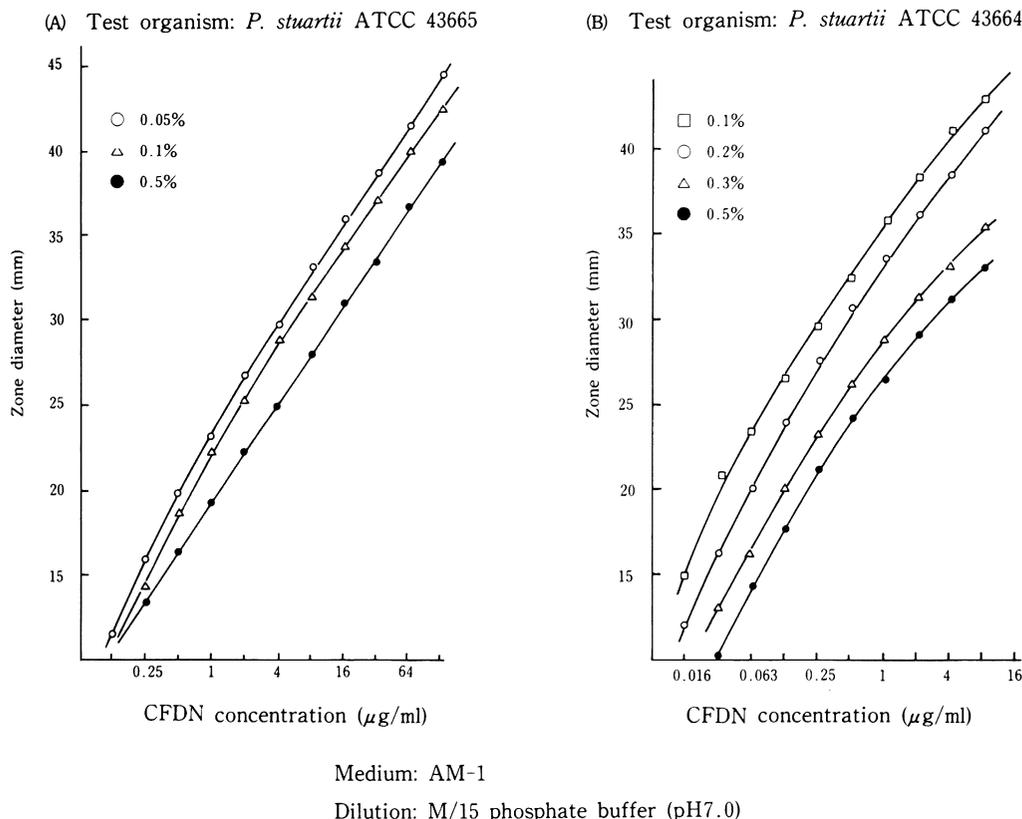


Fig. 3. Influence of inoculum size on standard curve of CFDN by disc-plate method.

$\mu\text{g/ml}$, agar-well 法およびディスク法で $0.016\mu\text{g/ml}$ であった。両検定菌においてカップ法で約2倍感度の上昇が認められたが、実験手技上、簡便なディスク法でも十分な感度が得られた。

3. 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 *P. stuartii* ATCC 43665 を用い、pH 5, 6, 7, 8 の M/15リン酸塩緩衝液希釈による CFDN の標準曲線 (ディスク法) を Fig.5 に示す。pH により阻止円径はほとんど差がなく、pH の影響は認められなかった。

2) 代用血清の検討

ヒト新鮮血清、血漿 (ヘパリン処理)、Consera および Moni-Trol I で希釈した時の標準曲線を Fig.6 および 7 に示す。

P. stuartii ATCC 43665 では、ディスク法によるヒト新鮮血清と血漿希釈では阻止円径に差を認めず、検出感度は $0.13\mu\text{g/ml}$ であった。Moni-Trol I では新鮮血清より大きな阻止円を生じ、Consera では $0.5\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では新鮮血清と一致したが、 $0.25\mu\text{g/ml}$ 以下では大き

な阻止円を生じた。カップ法および agar-well 法での検出感度は $0.13\mu\text{g/ml}$ であった。

P. stuartii ATCC43664 においても新鮮血清と血漿での阻止円は一致し、検出感度はディスク法で $0.03\mu\text{g/ml}$ であった。一方、Moni-Trol I では $0.0625\mu\text{g/ml}$ 以上で新鮮血清より大きな阻止円を生じ、Consera では低濃度で直線性が得られなかった。カップ法および agar-well 法で測定した結果、検出感度は $0.016\mu\text{g/ml}$ でディスク法の $0.03\mu\text{g/ml}$ より2倍高くなった。

以上より、CFDN の血漿中濃度測定に際しては、ヒト新鮮血清または血漿で標準液を作製すべきであり、代用血清としての Consera および Moni-Trol I は適当でなかった。

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 (pH7.0) で5倍に希釈した時の標準曲線を Fig.8 に示す。原液、5倍希釈液および M/15リン酸塩緩衝液での阻止円径にほとんど差がなく、尿、胆汁成分による影響は無視できた。

4. 液体クロマトグラフィー

(A) Test organism: *P. stuartii* ATCC 43665 (inoculum: 0.1%) (B) Test organism: *P. stuartii* ATCC 43664 (inoculum: 0.2%)

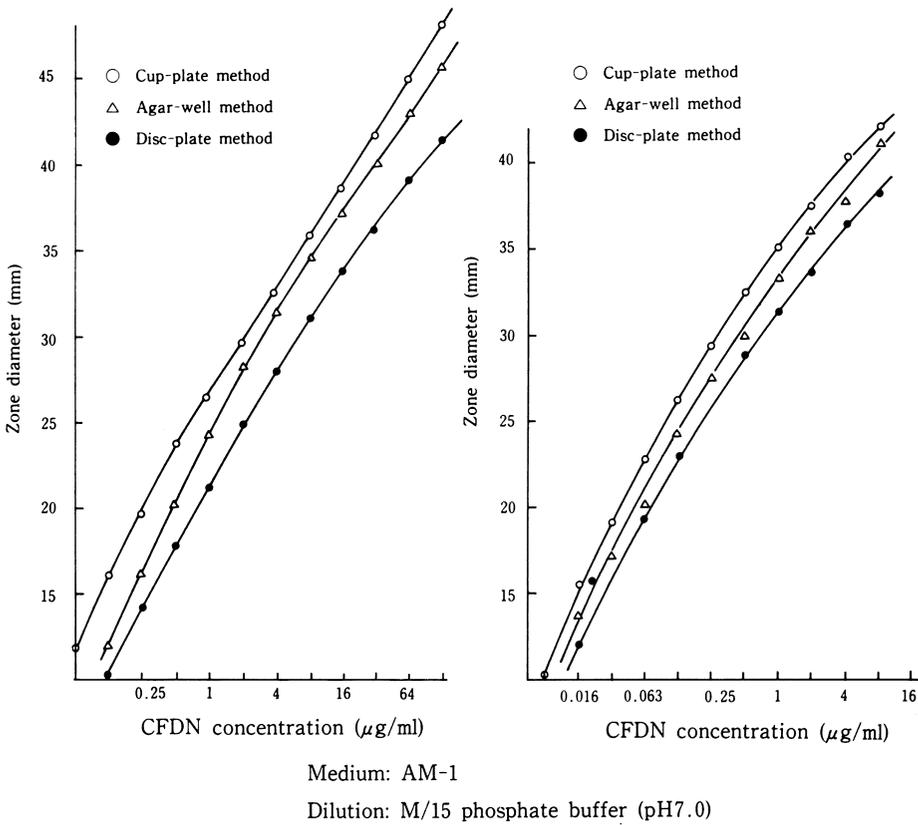


Fig. 4. Standard curves of CFDN by cup-plate, disc-plate and agar-well methods.

ヒト血漿および尿中のCFDNをHPLCで定量した時のクロマトチャートをFig. 9に示す。血漿の除蛋白操作によりCFDNの回収率は95~105%で定量的であった。CFDNでは血漿分析条件で保持時間6.8分、尿の場合は9.2分に溶出され、定量限界は血漿中で0.4μg/ml、尿で0.5μg/mlであった。CFDN第I相試験⁹⁾においてCFDNの50, 100および200mg単回投与および200mg 1日3回15日間連続投与時の血漿中濃度および尿中濃度をbioassay(ディスク法)とHPLC法で定量した。この時の両測定値の相関図をFig. 10に示す。血漿試料(n=116)の場合 $Y = 1.006X - 0.0179$ ($r = 0.929$), 尿(n=233)では $Y = 0.9986X + 0.8167$ ($r = 0.988$) (X: bioassay, Y: HPLC)の回帰直線を示し、両測定値に良好な一致性が認められた。

5. 精度に関する検討

ヒト血漿および尿で作製したCFDNの既知濃度溶液をディスク法およびHPLCで3回繰り返し測定した結果をTable 2に示す。

Bioassayでは、CFDNの血漿中濃度は0.156~5 μg/mlの範囲で、実測値は設定濃度の100~109.6%、尿中濃度は0.2~50μg/mlの範囲で同様に、96.3~116.7%の範囲にあった。HPLC法での実測値は設定濃度の±5%以内であり、変動係数(CV%)も3%以内でbioassayより精度上優れた。

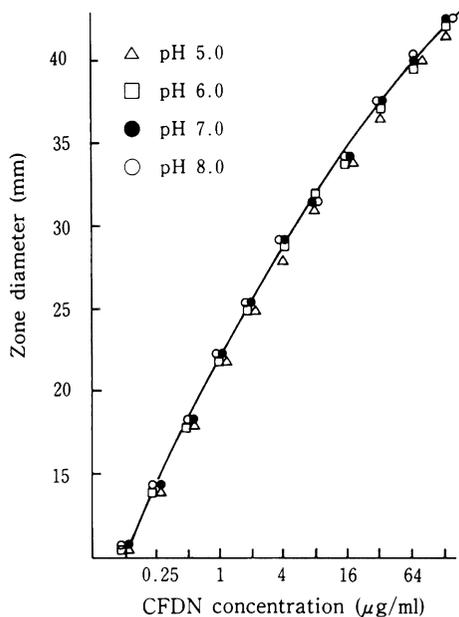
6. 体液中安定性

CFDNのヒト血漿および尿中保存条件下での安定性をTable 3に示す。

血漿中で20°C 1日保存後の残存率は62%と比較的不安定であったが、4°C 2日間、-20°C 14日間保存しても95%以上の残存率を示し、-80°C保存では28日後でも99%と安定に保たれた。尿中では、-20°Cで7日間で92~94%の残存率を示し、-80°Cでは28日間安定であった。

III. 考 察

CFDNの寒天平板拡散法による微生物学的定量法(bioassay)をTable 4に要約した。検定菌として*P.*



Test organism: *P. stuartii* ATCC 43665
(inoculum: 0.1%)

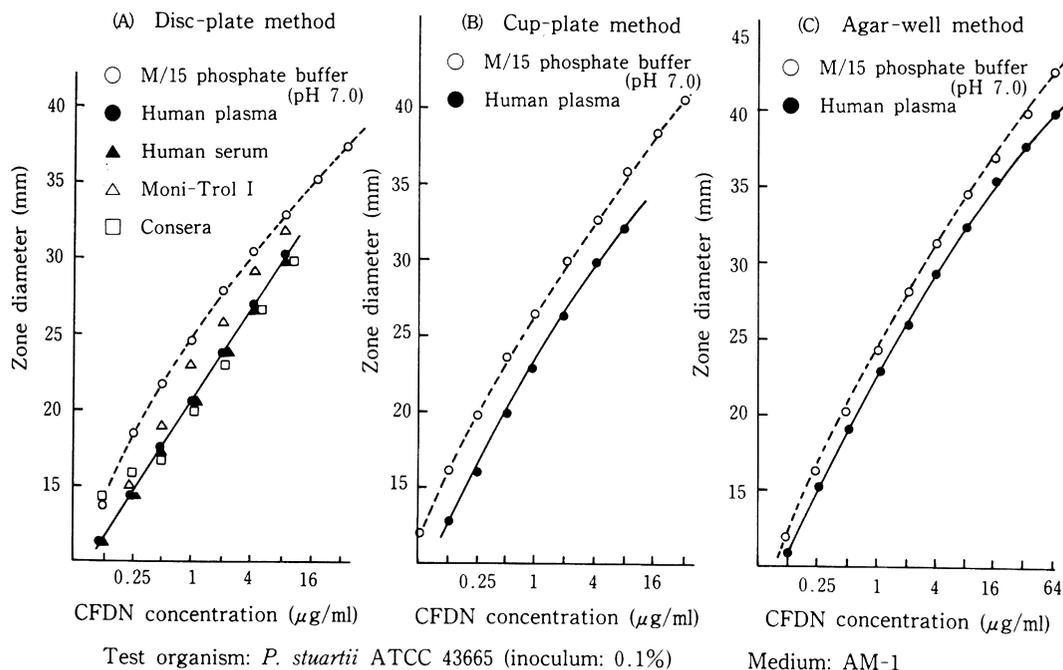
Medium: AM-1

Buffer: M/15 phosphate buffer (pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)

Fig. 5. Influence of buffer pH on standard curve of CFDN by disc-plate method.

stuartii ATCC 43665およびこの菌株をニトロソグアニジン処理して得られたCFDNに高度感受性を示す*P. stuartii* ATCC 43664を用い、培地はAM-1を用いた。カップ法、ディスク法およびagar-well法のいずれの測定方法によっても良好な標準曲線が得られ、測定感度はカップ法で高く、ディスク法およびagar-well法では同程度であった。操作の簡便さ、精度、検出感度および必要検体量から判断して、本剤のbioassayではディスク法で対応できるものと考えられた。上記の検定菌の選択に当たっては、検体中の薬剤濃度に応じて実施した。すなわち、*P. stuartii* ATCC 43664はCFDNの0.016~8.0 μg/mlの範囲で適応できるため、血漿中濃度等の低濃度の検体の測定に用い、*P. stuartii* ATCC 43665は0.125~128 μg/mlの広い濃度範囲の測定が可能であり、尿中濃度等の比較的高濃度の測定に使用される。

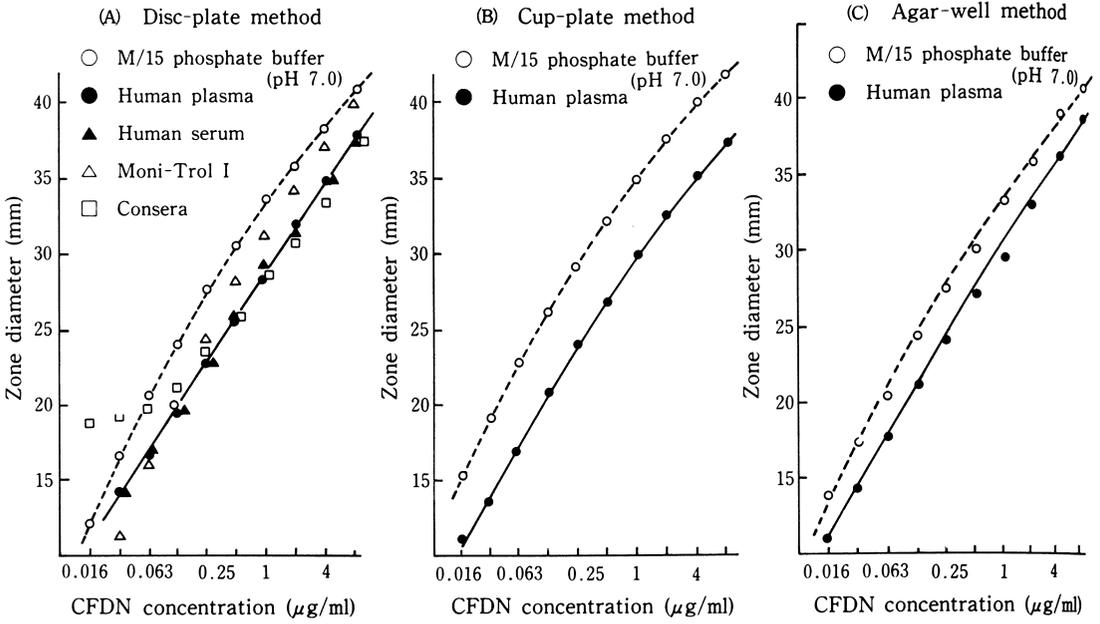
血漿中濃度の測定において、標準液の調製は、Consera Moni-Trol I等の代用血清の使用が便宜であるが、これらの代用血清と新鮮血清での標準曲線は一致しないため、代用血清の使用は避けるべきである。著者らは*E. coli* ATCC 39188を用いるcefiximeのbioassay⁶⁾においても本報告と同様な結果を得ている。尿等の高濃度の試料では通常5~125倍にM/15リン酸塩緩衝液(pH7.0)で希釈して測定するため、同緩衝液を用いて調製した標準液で定量できる。また、原液と緩衝液での阻止円径には



Test organism: *P. stuartii* ATCC 43665 (inoculum: 0.1%)

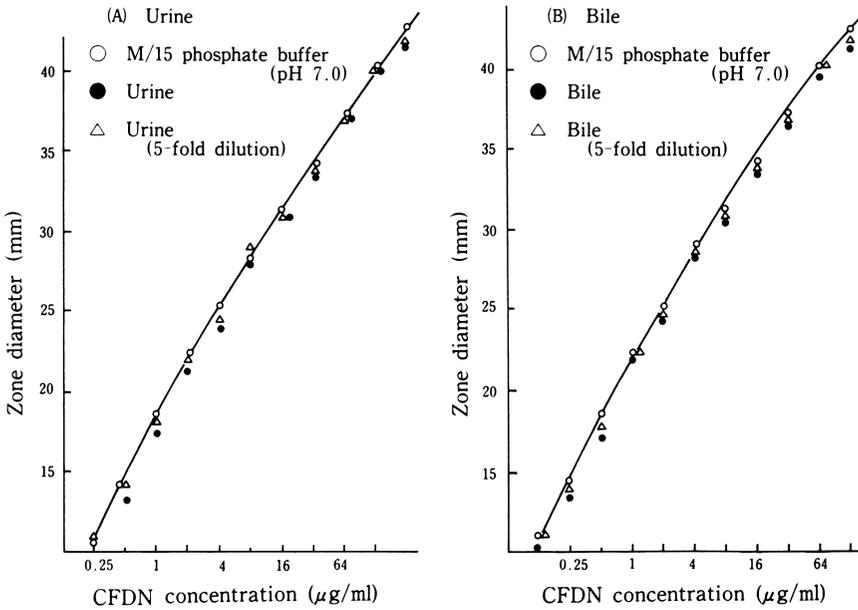
Medium: AM-1

Fig. 6. Influence of human plasma (serum) on standard curve of CFDN.



Test organism: *P. stuartii* ATCC 43664 (inoculum: 0.2%) Medium: AM-1

Fig. 7. Influence of human plasma (serum) on standard curve of CFDN.



Test organism: *P. stuartii* ATCC 43664 (inoculum: 0.2%) Medium: AM-1

Fig. 8. Influence of human urine and bile on standard curve of CFDN by disc-plate method.

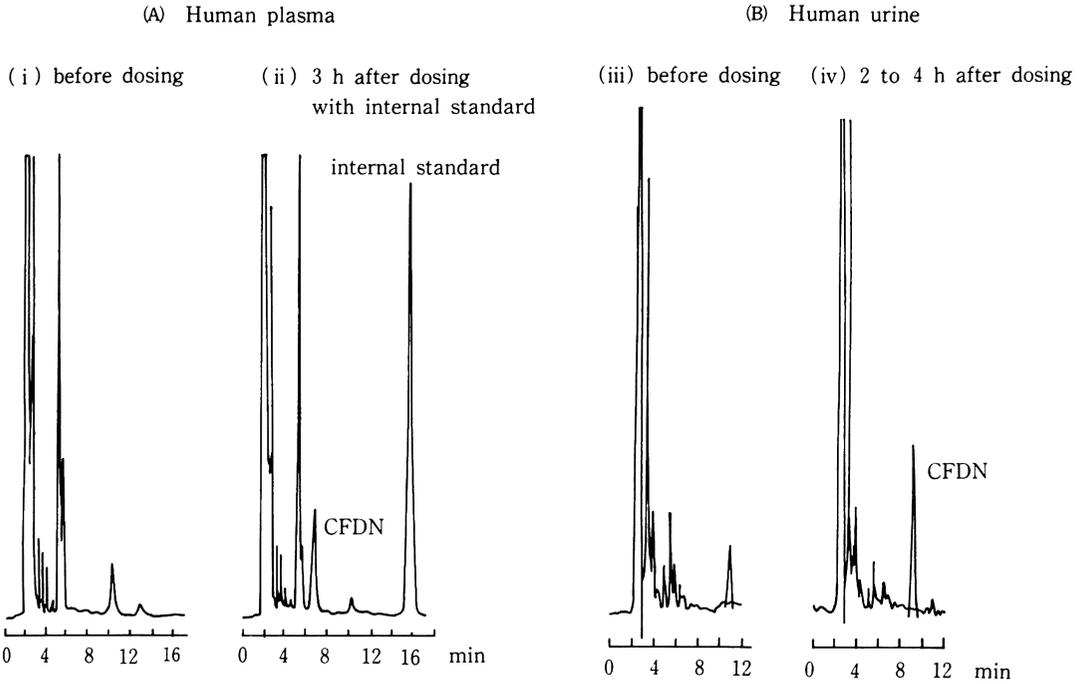


Fig. 9. Chromatograms of human plasma (A) and urine (B) after oral administration of CFDN (200mg).

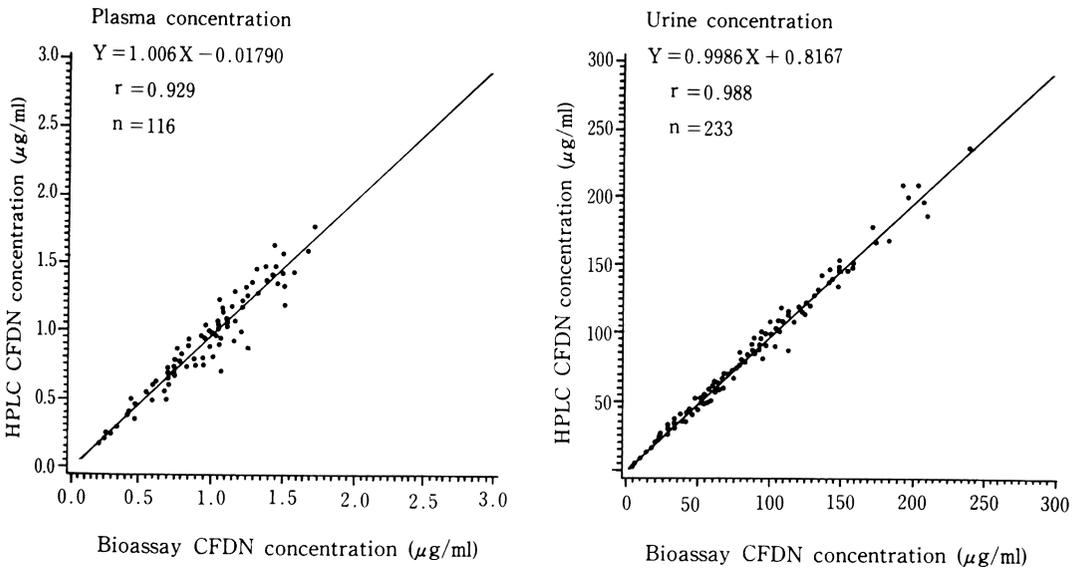


Fig. 10. Correlation between CFDN concentrations obtained from HPLC and bioassay.

Table 2. Reproducibility of CFDN determination by bioassay and HPLC in human plasma and urine

Method	Test organism	Specimen	Actual conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Analysed conc. ($\mu\text{g/ml}$) Mean \pm SD	% of analysed conc.	Coefficient of variation (%)
Bioassay	<i>P. stuartii</i> ATCC 43664	plasma (n=3)	5.0	5.00 \pm 0.23	100.0	4.5
			2.5	2.58 \pm 0.12	103.3	4.5
			1.25	1.37 \pm 0.09	109.6	6.2
			0.625	0.66 \pm 0.02	106.1	3.2
			0.313	0.34 \pm 0.006	107.6	1.7
			0.156	0.16 \pm 0.006	104.7	3.6
			50.0	50.1 \pm 2.08	100.2	4.1
	<i>P. stuartii</i> ATCC 43665	urine (n=3)	20.0	19.3 \pm 1.63	96.3	8.4
			10.0	11.3 \pm 0.71	113.0	6.3
			5.0	5.23 \pm 0.32	104.5	6.1
			2.0	2.33 \pm 0.26	116.7	11.4
			1.0	0.97 \pm 0.11	97.0	11.5
			0.5	0.51 \pm 0.03	102.0	6.8
			0.2	0.19 \pm 0.02	96.7	8.0
HPLC	plasma (n=3)	4.0	3.82 \pm 0.01	95.5	0.3	
		1.0	1.00 \pm 0.03	100.0	3.0	
		10.0	9.84 \pm 0.08	98.4	1.4	
		5.0	4.80 \pm 0.04	96.0	1.3	
		1.0	1.00 \pm 0.01	100.0	1.0	

Table 3. Stability of CFDN in human plasma and urine

Specimen	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Residual %						
			0	1	2	4	7	14	28 days
Plasma (pH 7.2)	2	20	100	62	45	12	—	—	—
		4	100	97	96	93	92	64	47
		-20	100	99	98	97	96	95	90
		-80	100	99	99	99	99	98	99
Urine (pH 7.03)	10	20	100	90					
		4	100	97	92	92			
		-20	100	102	101	98	94	96	89
		-80	100				98	99	104
100	100	20	100	88					
		4	100	93	93	93			
		-20	100	97	95	94	92	86	83
		-80	100				100	99	100

Table 4. Standardization of bioassay of CFDN in biological specimens

Test organism	<i>P. stuartii</i> ATCC 43665	<i>P. stuartii</i> ATCC 43664
Inoculum	0.1% of cell suspension OD=1.3 (6×10^9 cfu/ml)	0.2% of cell suspension OD=1.3 (2×10^9 cfu/ml)
Medium	Antibiotic medium No.1 (Difco)	
Assay range	0.125~128 μ g/ml	0.016~8.0 μ g/ml
Specimen	plasma, urine, tissue, bile	plasma, sputum, tissue
Determination limit (μ g/ml) in buffer and human plasma ()	disc-plate : 0.13 (0.13) cup-plate : 0.063 (0.13) agar-well : 0.13 (0.13)	disc-plate : 0.016 (0.03) cup-plate : 0.008 (0.016) agar-well : 0.016 (0.016)
Standard solution plasma assay : assay for others :	fresh plasma or serum M/15 phosphate buffer (pH 7.0)	
Incubation	37°C, 18~20 h	37°C, 20~24 h

ほとんど差がないため、無希釈液で測定する場合でも同緩衝液による標準液を使用できる。

血漿および尿中のCFDNはHPLCによっても測定され、その時の感度は血漿で 0.4μ g/ml、尿で 0.5μ g/mlであり、bioassayより劣った。ヒト血漿および尿の同一検体についてbioassayとHPLCの両測定法で検討した結果、測定値の相関性は高く、良く一致することが認められた。したがって、本剤のbioassayにおいて、活性代謝物等の測定に影響を及ぼす物質はほとんど存在しないものと考えられた。本剤のヒト血漿および尿中での安定性を各保存条件下で検討した。血漿中の本剤は室温(20°C)では比較的不安定であったため、血中濃度測定時、採血後、低温での処理操作ができる血漿で行うことが必要であり、血漿に分離後の検体は-20°Cでは14日間、-80°Cでは28日間安定に保存できる。尿検体は-80°Cで保存し、28日以内に測定すべきである。

試験期間：1984年11月~1988年8月

文 献

- 1) 峯 靖弘, 上村利明, 坂本 博, 俵 修一, 波多野和男, 渡辺裕二, 桑原章吾: 新しい経口セファロsporin 剤, Cefdinir の *in vitro* 抗菌作用に関する研究. *Chemotherapy* 37 (S-2): 100~121, 1989
- 2) YOKOTA T, KUWAHARA S: Adenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate-Deficient Mutants of *Vibrio Cholerae*. *J Bacteriol.* 120: 106~113, 1974
- 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 P 628~633, 1982
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改正について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 5) 島田 馨, 穴戸 亮, 角尾道夫: Cefdinir の第 I 相臨床試験. *Chemotherapy* 37 (S-2): 208~245, 1989
- 6) 坂本 博, 広瀬俊治, 大木俊光, 峯 靖弘: Cefixime (CFIX) の体液内濃度測定法. *Chemotherapy* 33 (S-6): 143~156, 1985

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD FOR CEFDINIR, A NEW ORAL CEPHALOSPORIN, IN BIOLOGICAL FLUIDS

HIROSHI SAKAMOTO, TOSHIHARU HIROSE*, KAZUO HATANO
and YASUHIRO MINE

New Drug research Laboratories*and Product Development
Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
2-1-6 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University, Tokyo

We established a microbiological assay (bioassay) and HPLC methods for determination of cefdinir (CFDN) in biological fluids.

The concentrations of CFDN were assayed by paper-disc, cup and agar-well methods using *Providencia stuartii* ATCC 43665 and *P.stuartii* ATCC 43664 (a sensitive mutant of *P.stuartii* ATCC 43665), as the assay organism and antibiotic medium No.1 (Difco) as the assay medium. *P.stuartii* ATCC 43665 was used for assaying higher concentrations of CFDN ($>0.13\mu\text{g/ml}$), and *P.stuartii* ATCC 43664 for lower concentrations ($0.016\sim 8\mu\text{g/ml}$). The minimal detectable concentrations of CFDN in the buffer were $0.063\mu\text{g/ml}$ for cup-plate and $0.13\mu\text{g/ml}$ for disc-plate and agar-well methods using *P.stuartii* ATCC 43665, and were $0.008\mu\text{g/ml}$ for the cup-plate method and $0.016\mu\text{g/ml}$ for the disc-plate and agar-well methods using *P.stuartii* ATCC 43664. To determine the plasma levels of CFDN in humans, human plasma or serum should be used to prepare the standard solutions. The lowest detectable concentrations of CFDN in human plasma were $0.016\mu\text{g/ml}$ for the cup-plate and agar-well methods and $0.03\mu\text{g/ml}$ for the disc-plate method using *P.stuartii* ATCC 43664.

The standard solutions were prepared with M/15 phosphate buffer (pH7.0) for assay of urine and bile samples.

Plasma and urine levels of CFDN in humans after oral dosing were determined by HPLC using a reversed-phase column. The detection limits of CFDN in plasma and urine were $0.4\mu\text{g/ml}$ and $0.5\mu\text{g/ml}$, CFDN concentrations obtained by HPLC were in good agreement with those by the bioassay.

CFDN in human plasma and urine was stable at -20°C for 7 days and at -80°C for 28 days.