

Pivampicillin·HCl에 관한 연구 I

微生物學的 定量法

*李瀚杓 *金正圭 *沈英基 **龍群鎬

Microbiological Quantitative Assay of Pivampicillin·HCl

*Han Pyo Lee, *Chung Kyu Kim, *Young Ki Sim, *Kun Ho Yong

Biological determination of Pivampicillin hydrochloride was examined and an available method has been established. Unhydrolyzed Pivampicillin hydrochloride has no antibacterial activity, but it exhibits an antibacterial activity hydrolyzed with liberation of ampicillin by nonspecific enzymes present in blood and tissues from various species *in vitro* and *in vivo*. Using these properties, Pivampicillin hydrochloride can be determined as ampicillin by use of an agar-diffusion method with *Bacillus subtilis* as the assay organism.

緒 論

本 研究는 演者等에 依해서 Pivampicillin·HCl의 微生物學的 定量法을 研究한 것이다. Pivampicillin·HCl¹⁾은 d- α -Aminobenzylpenicillin의 Pivaloyloxymethyl ester의 鹽酸鹽으로서 最近 Denmark의 Leo社가 合成開發한 合成페니실린系의 擴範圍抗生物質이다. W.V. Daehne와 Frederiksen等の 報告²⁾에 依하면 雙極性으로 因하여 經口投與로서는 吸收가 不完全한 Ampicillin의 短點을 向上시킨 새로운 合成 Penicillin系의 抗生劑로 알려져 있다.

*Dai-Han Jungoe Pharmaceutical Co., **National Institute of Health.

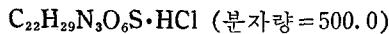
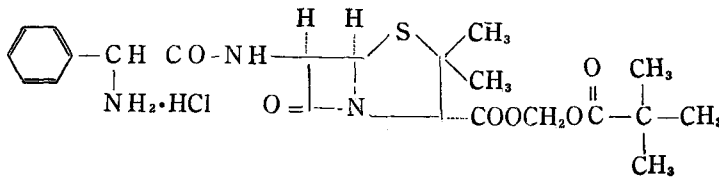
Pivampicillin·HCl은 經口投與로써 同一力價의 Ampicillin 筋肉注射時 以上の 高血中濃渡를 얻을 수 있고, 더우기 空腹投與時보다도 食事와 함께 投與함으로써 더 높은 血中濃渡를 나타낸다^{2,3)}.

生體內에 吸收되면 血清이나 組織中에 存在하는 非特異性酵素에 依하여 Ampicillin으로 迅速히 加水分解되며 全血中의 半減期는 約 5分程度이다^{2,3)}.

Pivampicillin·HCl은 *in vitro*에서는 抗菌力이 없으므로 *in vitro*에서의 微生物學的 定量이 不可能하다³⁾.

이와같은 加水分解 特性을 利用해서 著者等은 Pivampicillin·HCl에 Heparin으로 處理한 全血를 作用시켜 加水分解되어 生成한 遊離 Ampicillin을 標準 Ampicillin과 比較定量하는 方法을 檢討하여 比較的 좋은 結果를 얻었기에 報告코자 한다.

構造式



Hydrochloride salt of pivaloyloxy-methyl D(-)- α -aminobenzyl penicillinate

Fig. 1. The Structure of Pivampicillin·HCl

實驗 方法

1. Reagent & Apparatus

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| (1) Pivampicillin·HCl (KIST 分析品) | (6) Heparin natrium |
| (2) Ampicillin anhydrous standard | (7) Phosphate buffer (pH 7.9±0.1) |
| (3) Peptone | (8) Petri dish, cup. |
| (4) Sodium chloride | (9) Rabbit |
| (5) Agar | |

2. Pivampicillin·HCl의 製造 및 同定

- (1) 製 造 (대한민국특허 제3712호에 준함)

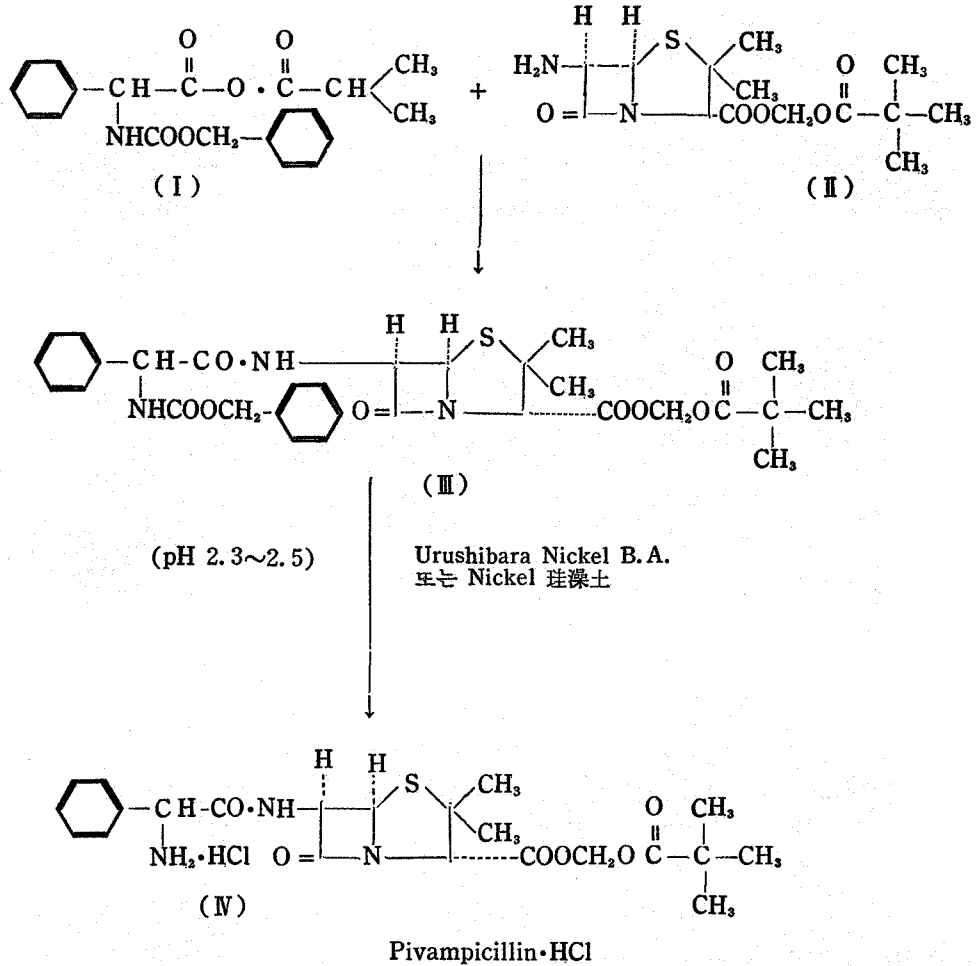


Fig. 2. Synthesis of Pivampicillin·HCl

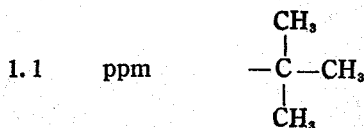
즉 6-APA (6-Aminopenicillanic acid)를 出發로 하여 6-APA의 Pivaloyloxymethyl ester을 製造하고 여기에 β -dicarbonyl 化合物(I)을 縮合시킨 다음 結核환원하여 Pivampicillin·HCl을 製造하였다. 이렇게 하여 製造한 物質을 薄層 Chromatography (T. L. C.)로 精製하여서 試料로 사용했다.


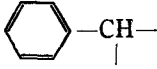
(2) Pivampicillin·HCl의 同定(確認)

가) 元素分析

KIST元素分析에서 $C_{22}H_{29}N_3O_6S \cdot HCl$ 의 分子式을 얻었다.

나) NMR Spectrum 에서



1.3	ppm	
4.2	ppm	C ₃ Proton
5.2	ppm	C ₅ "
5.5	ppm	C ₆ "
5.8	ppm	-O-CH ₂ -O
7.5	ppm	
8.7	ppm	- ⁺ NH ₃

와 같이 Pivampicillin·HCl 構造式에서 볼 수 있는 모든 Proton이 확인 되었다.

다) I. R. Spectrum

Ampicillin과 같이 進行하여서 β -lactam環에 의한 1780 cm^{-1} , Acid amide에 의한 1700 cm^{-1} 에서 吸收帶를 確認했고 3350 cm^{-1} 에서 볼 수 있는 Ampicillin의 -OH group에 의한 吸收帶가 없어서 置換되어 있음을 確認했다. 또한 Ampicillin에서는 볼 수 없는 1200 cm^{-1} 과 1250 cm^{-1} 에서 ter-butyl group의 Skeletal vibration에 의한 吸收帶를 確認했다.

라) T. L. C.

展開溶媒, (BuOH:HAC:H₂O=40:10:50) Silicagel HF plate를 使用해서 Rf=0.65로 單一物質임을 確認했다.

마) Mass Spectrum

ter-butyl group의 Mass number 57

pivalyl group의 " 85

-CO-OCH₂·O·COC(CH₃)₃의 " 159

를 確認했다.

3. 定 量 法

원통법에 準했다.

(1) 培地(중층, 기층 및 시험균의 稀釋培地)

Pepton	10.0g
Beaf ex.	5.0g
NaCl	2.5g
Agar	15.0~20.0g
滅菌蒸溜水	1,000ml

滅菌後의 pH는 7.9 ± 0.1 이 되도록 했다.

(2) 標準液 調劑

Ampicillin anhydrous 標準品 100mg을 精密히 달아 滅菌蒸溜水에 녹이고 全量을 100ml로 했다(標準 原液).

(3) 檢液 調劑

Pivampicillin 143mg (Ampicillin 100mg 該當)을 精密히 달아 滅菌蒸溜水에 녹이고 全量을 100ml로 했다(原液).

(4) 試驗用 菌

Pepton寒天培地에서 培養한 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)를 試驗用菌으로 했다.

(5) 平板 培地 調劑

Petri dish에 Pepton寒天培地 20ml를 넣어서 굳히고, (4)의 포자 현탁액을 2.5%의 比率로 넣은 寒天培地(PH 7.9 \pm 0.1) 4ml를 넣고 均等하게 퍼지도록하여 굳히고, 원통을 Petri dish에 90°간격으로 4개를 넣는다.

(6) 操 作 法

가) 加水分解

標準原液 및 原液 각 5ml에 Heparin으로 處理한 全血(試驗前 家兎에서 採取한 全血로서 1ml당 Heparin 5 unit를 含有토록하여 24時間以內에 使用한다.) 5ml를 加하여 37°C에서 20分間 (20°C, 90分間) 加水分解 시켰다.

나) 操 作

加水分解 시킨 標準原液과 原液을 0.1M磷酸鹽 緩衝液(pH 7.9 \pm 0.1)으로 適當한 稀釋液을 만들고 원통법을 準用했다.

實驗結果 및 考察

1. 本 試驗과 아울러 Heparin으로 處理한 全血의 抗菌力 有無를 同一方法으로 施行하였고, Ampicillin의 Heparin으로 處理한 全血에서의 安定性を 檢討하였다. 즉 Ampicillin 10mg을 Heparin 으로 處理한 全血 10ml中에 10分, 30分, 60分, 90分 등으로 放置한 후 같은 濃度의 Ampicillin 水溶液과 원통법으로 比較하였다. 그 結果는 Table I 에서와 같다.

즉 Heparin으로 處理한 全血 自體는 *in vitro*에서 抗菌力이 전혀없고, Ampicillin은 Heparin으로 處理한 全血中에서 90分間 存在 하였을 때, 그 抗菌力은 全血中에 있지 않았던 본래의 Ampicillin과 抑制環直徑의 有의차가 있어 12.6%의 抗菌力 減소를 인정하였다.

Table I. 원통법에 의한 Heparin으로 處理한 全血 및 이중의 Ampicillin의 抗菌力과 그 安定性

試料	抗 菌 力(抑制環 直徑 : cm)			
Heparin으로 處理한 全血	0 (無)			
Ampicillin(S)과 Heparin으로 處理한 全血中에 1.5時間 방치한 Ampicillin(T)	2.145	1.695	2.12	1.595
	2.015	1.62	2.0	1.575
	2.05	1.605	2.02	1.57
	2.0	1.66	1.97	1.615
	SH(8mcg)	SL(2mcg)	TH(8mcg)	TL(2mcg)
	100%		87.4% (12.6%減)	

2. 加水分解 時間과 遊離 Ampicillin量 과의 關係

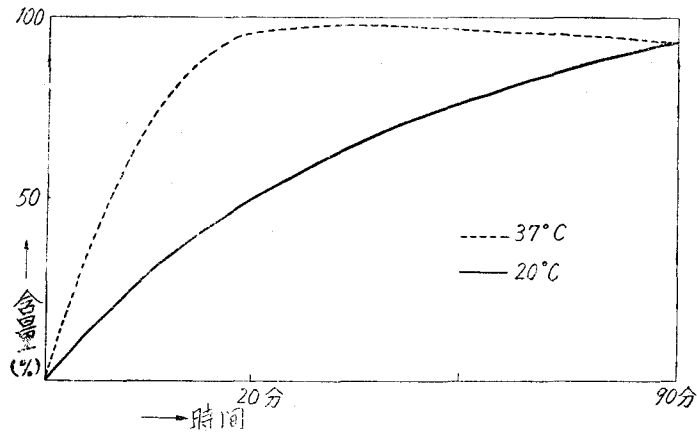


Fig. 3. 加水分解時間과 含量曲線

Fig. 3에서와 같이 一般的으로 溫度上昇에 따라 加水分解速度는 빠르며 37°C의 Heparin으로 處理한 全血 中에서 Pivampicillin·HCl의 半減期는 約 5分이었다. 20分에서는 約 99% 以上이 加水分解되었고, 20°C에서는 半減期가 20分이 넘었으며 99% 以上이 加水分解하는데 要하는 時間은 約 90分이었다.

結 論

以上の 實驗結果 Heparin으로 處理한 全血에 依한 Pivampicillin·HCl의 微生物學的 定量은 本法를 利用하여 精密度 ±5%로 施行할 수 있었다.

끝으로 本研究過程中에 試料를 製造하여 주신 大韓中外製藥의 金京鎬 博士님과 이의 確認同定에 萬全을 期하여 주신 KIST 諸位께 심심한 感謝를 드립니다.

文 獻

- 1) Daehne W. von, et al.: Acyloxymethyl esters of ampicillin J. Med. Chem. 13: 607-612, 1970
- 2) Daehne W. von, W.O. Godtfredsen, K. Roholt, and L. Tybring: Pivampicillin, a New Orally Active Ampicillin Ester Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1970 431~437
- 3) E. Fredriksen, W. O. Godfredsen, B. Nielsen & K. Roholt: Nordisk Medicin 25 XI 1971 bd86 nr47, 1376~1380
- 4) ibid: Langtidsbehandling med Pivampicillinklorid 1381~1383
- 5) 最近の新薬 22集
- 6) 月刊薬事 Vol.12, No.9(1970)
- 7) 診断と治療 46. 4, 75