

## 電離放射線을 利用한 醫療製品 滅菌研究 (II)

—Tetracycline에 미치는 放射線의 影響—

李 康 淳 · 千 基 貞 · 金 洪 洙

(韓國原子力研究所 放射線生物學研究室)

## Radiosterilization of Medical Products (II)

—Effect of Gamma Irradiation(<sup>60</sup>Co) on the Tetracycline HCl—

RHEE, Kang Soon, Ki Jung CHUN, and Ki Soo, KIM

(Radiation Biology Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute)

### ABSTRACT

As a serial experiment of radiosterilization of medical products, we investigated the feasibility of using gamma ray to sterilize antibiotics, tetracycline HCl.

Tetracycline HCl in aqueous solution and dried state irradiated with several dose levels was assayed for physico-chemical properties by checking UV absorption spectra, paper chromatograph, IR spectra and NMR spectra, and antibiotic activities by means of agar plaque technique and tube dilution method.

In physico-chemical properties and biological activities, the tetracycline HCl in dried state remained radioresistant up to exposure of 10 Mrad, however, in aqueous solution, the dose of 300 Krad produced a significant inactivation.

From the results of this study, radiosterilization of tetracycline HCl is more recommendable in the dried state than in aqueous solution.

### 緒 論

1928年 Fleming에 의한 penicillin 發見以來 有用한 抗生物質이 많이 發見되어 現在에는 數 100種에 이르고 있으며 그 利用度는 점차 增加하고 있다.

最近 이러한 抗生物質의 使用頻도가 漸次 높아짐에 따라 抗生物質의 製造過程도 大量 生産의 樣相을 띄고 그 滅菌工程도 産業的 規模를 必要로 하고 있다.

그러나 現在 우리나라에서 生産되는 抗生物質은 適當한 無菌操作에 依하여 生産되고 있으며 이들 抗生劑에 對한 滅菌方法이 아

직 강구되어 있지 않아 不完全한 滅菌製品이 生産되며 또한 市販되고 있다.

그러나 抗生物質은 滅菌方法에 따라 品質의 變化 또는 力價의 低下를 招來할 可能性이 많아 滅菌方法 選擇에 크게 制限을 받고 있으며 따라서 이에 對한 實驗이 先行되어야 한다.

이미 先進外國에서는 産業的 滅菌方法의 하나로 Co<sup>60</sup> 감마線 照射에 依한 滅菌法을 研究開發하여 易熱性 醫療製品 滅菌을 實施하고 있으며 最近에는 醫藥品 滅菌을 爲한 放射線 利用 可能性에 對한 研究가 活潑히 遂行되고 있다.

Controulis *et al.* (1954)은 terramycin, penicillin, streptomycin, aureomycin 및 chloromycetin 등에 대한  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray의 影響을 觀察하였던 바 放射線照射에 따른 potency의 變化가 없었으며 더욱이 3個月 保存後에도 對照群과 같은 potency를 維持하고 있었다고 報告하였다.

또한 Colovos *et al.* (1957)에 依하면 penicillin G, multivitamin 등은 cathod ray  $2 \times 10^6$  rep 照射로서 完全 滅菌되었으며 potency의 低下나 toxicity의 生成을 觀察할 수 없었다고 報告하여, cathod ray에 依한 抗生物質의 滅菌 可能性을 報告한 바 있다.

이와같은 數種 醫藥品の 放射線 滅菌 可能性에 關한 報告를 嚆矢로 그後 vitamin, eye ointment 등에 對한 放射線 滅菌 研究가 있었으나 實用化 하기에는 아직도 많은 問題點이 있는 것으로 報告되고 있다 (Galatzeanu and Antoni, 1967; Hangay *et al.*, 1967).

著者들은  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray를 利用하여 tetracycline의 滅菌 可能性 與否를 檢討할 目的으로 水溶液 狀態와 乾燥狀態로 區分 照射하여 放射線 照射線量에 따른 tetracycline의 物理, 化學的 性狀 變化, 抗菌力의 變化 등을 實驗하여 若干의 結實을 얻었기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 抗生物質

抗生物質 tetracycline HCl을 韓國 Pfizer 藥品株式會社로부터 純粹原料(96%)를 分讓 받아 滅菌 蒸溜水(pH 5.5)를 加한 水溶液 狀態(0.2mg/ml)와 乾燥 粉末狀態로 區分하여 實驗材料로 使用하였다.

### 2. 菌株 및 培養

國立保健院으로부터 分株받은 *Staph. aureus* ATCC 6538-2090 Pfizer菌을 peptone casein agar slant에서 培養(32~35°C, 24時間) 한 後 實驗에 使用하였다.

### 3. 放射線 照射

粉末乾燥 狀態의 tetracycline은 韓國原子力研究所 所在 BNL Shipboard irradiator

(25,000 Ci  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray source)를 利用하여 180 rad/sec의 dose rate로 照射하였으며 水溶液 狀態의 tetracycline은 TRC panoramic irradiator(10,000 Ci  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray source)를 利用하여 12~55rad/sec의 dose rate로 室溫 大氣壓下에서 各各 照射하였다.

### 4. 物理 化學的 性狀

1) pH 測定 및 UV spectrophotometry  
Photovolt pH meter 112에 依한 pH, Beckman DU-2 spectrophotometer에 依한 UV spectrum을 各各 比較 檢討하였다.

### 2) Paper chromatography

試料를 Whatman No.1 filter paper에 spot하여 Clarke(1969)의 展開溶媒(citric acid 4.8gm, 蒸溜水 130ml, n-butanol 870 ml)를 使用하여 室溫에서 18時間 展開한 後 UV 下에서 Rf值를 比較 確認하였다.

### 3) Nuclear Magnetic Resonance(NMR) 測定

Cox 및 Eothner-By(1968) 方法에 따라 試料를 調製한 後 JNM-C-60HL high resolution NMR(JEOL, Japan)을 使用하여 NMR spectrum을 測定하였다.

### 4) IR spectrophotometry

Clarke(1969)의 KBr disc法에 依하여 試料를 만든 後 Hitachi 225 Grating Infrared Spectrophotometer를 使用하여 I.R. spectrum을 測定하였다.

### 5. 生物學的 活性度

Agar plate上에 *Staph. aureus* ATCC 6538-2090 Pfizer菌을 streak한 後 antibiotic disc를 貼착하여 36°C에서 24hrs 培養하여 inhibition zone을 觀察하였다.

또한 國立保健院 發行 tetracycline HCl biological activity assay에 準하여 activity를 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 物理 化學的 性狀

Tetracycline의 照射 狀態에 따른  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray의 影響을 觀察하기 위하여 水溶液 狀態와 乾燥狀態로 區分 照射後 物理 化學的

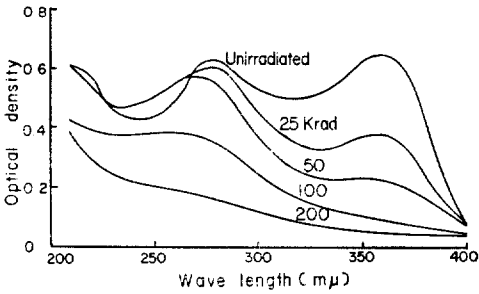


Fig. 1. UV absorption spectrum of tetracycline in aqueous solution

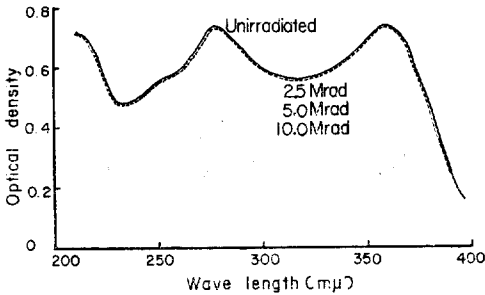


Fig. 2. UV absorption spectrum of tetracycline in dry state

性狀을 比較하였다.

Tetracycline의 UV spectrum은 Figure 1 및 Figure 2에서와 같이 波長 275mμ 및 360mμ에서 peak를 이루고 있었다.

그러나 水溶液 狀態에서 照射한 tetracycline은 照射線量을 增加함에 따라 optical density가 減少하여 100Krad 以上の 線量에서는 peak가 完全히 消失되었다(Fig. 1). 반면 乾燥狀態에서는 水溶液 狀態에서의 照射線量 보다 월등 높은 照射線量인 10Mrad를 照射받은 境遇에도 對照群과 거의 類似한 O.D.를 나타내고 있었다.

Antoni 等(1967)은 pyridoxine을 0.1N-HCl에서 1Mrad까지 乾燥狀態에서 23Mrad까지 照射後 O.D.를 測定해 본 結果 前者에서는 對照群에 비해 顯著的한 O.D.의 減少를 나타내었으나 後者에서는 對照群과 類似한 O.D.를 나타내었다고 報告하고 있었다.

抗生物質의 製劑 基準에 依하면 抗生物質

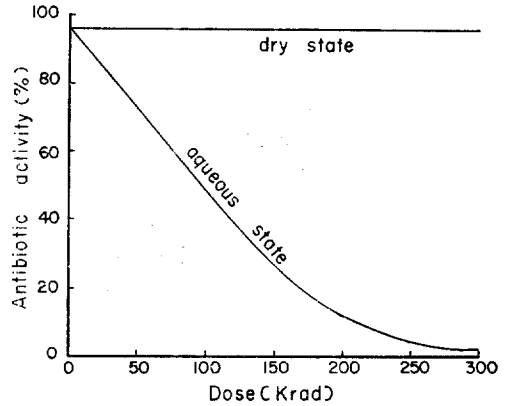


Fig. 3. Tetracycline, aqueous(0.02%) and dry state, was irradiated with various dose levels to 200 Krad and 10 Mrad, respectively.

의 pH가 問題 되므로 放射線 照射에 依한 pH 變化를 觀察해 본 結果는 Figure 3과 같다.

Figure 3에서 보는 바와 같이 水溶液 狀態에서는 照射線量을 增加함에 따라 pH가 顯著히 減少하는 結果를 보이나 乾燥 狀態

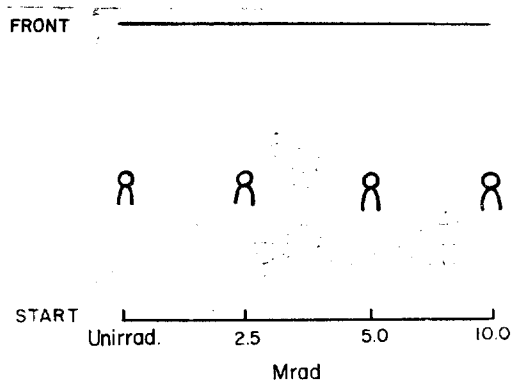


Fig. 4. Paper chromatography of tetracycline irradiated in an aqueous solution. Tetracycline was applied on Whatman No.1 filter paper, developed at room temperature for 48 hours, with solvent, n-butanol 870ml, water 130ml, citric acid 4.8g, mixture.

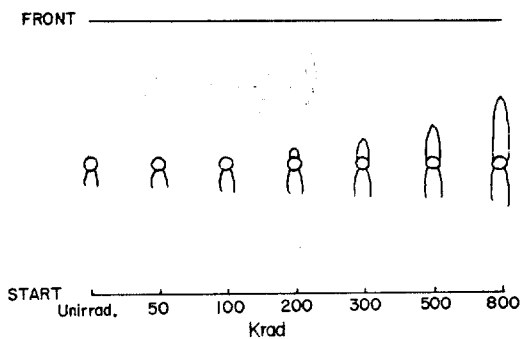


Fig. 5. Paper chromatography of tetracycline irradiated in the dry state. All conditions were same as in Fig. 4.

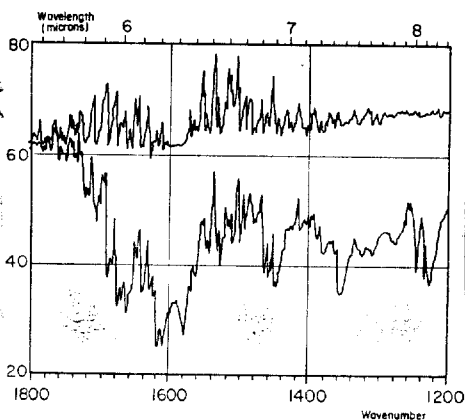


Fig. 6. IR spectrum of tetracycline

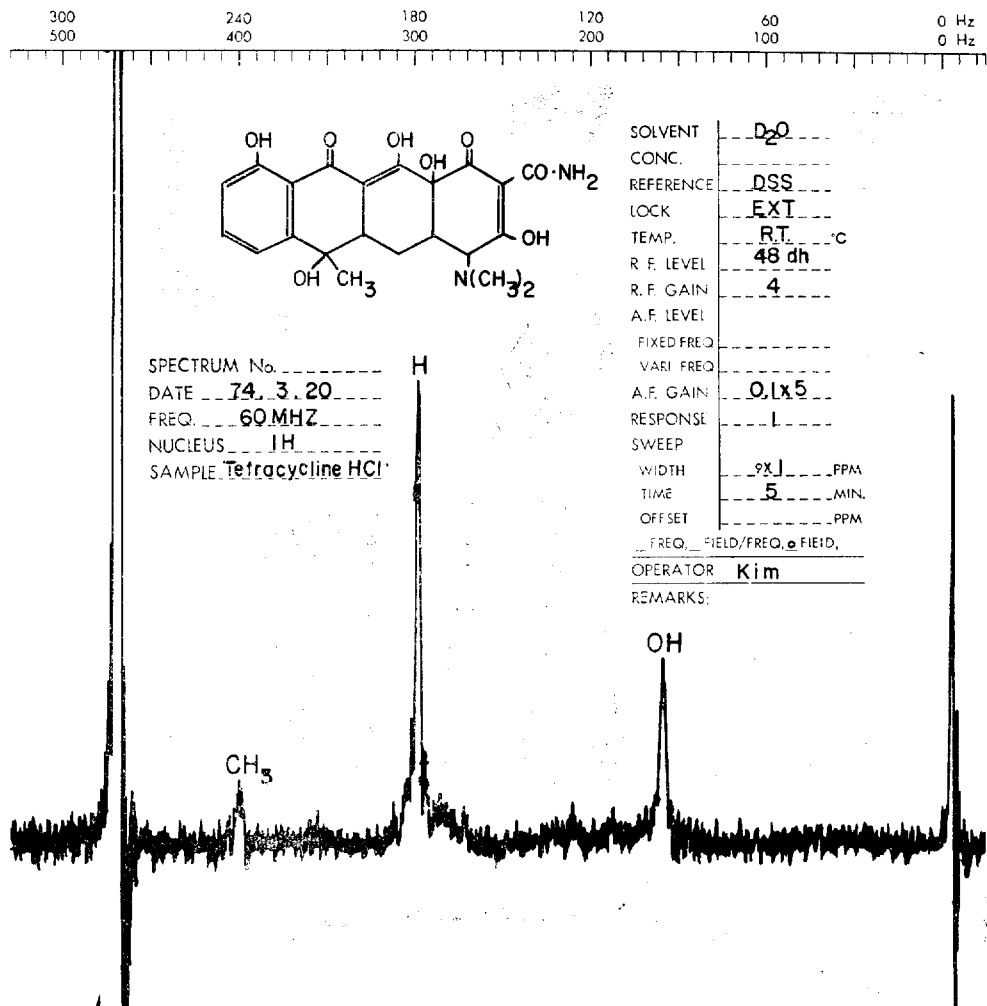


Fig. 7. NMR spectrum of tetracycline

에서는 對照群과 類似한 pH를 보여주고 있다.

특히 乾燥 狀態에서는 10Mrad 照射線量에서도 對照群과 類似한 pH를 나타내고 있었다.

이와같이 pH에서도 乾燥狀態에서는 變化를 주지 않았지만 水溶液狀態에서는 顯著한 變化를 認知할 수 있었다.

1967年 Pandula 等に 依하면 atropine外 3種의 水溶性 注射劑에 放射線을 照射後 pH를 觀察한 結果 3種 모두 照射前의 pH보다 若干 減少하였음을 實驗하여 水溶性 狀態에서 放射線 照射에 依한 pH 變化를 報告한 바 있다.

放射線에 依해 tetracycline의 分解 與否를 確認할 目的으로 paper chromatography를 實施한 結果는 Figure 4 및 Figure 5와 같다.

Figure 4에서 보는 바와 같이 水溶液 狀態에서는 照射線量이 增加함에 따라 對照群에 비해 顯著히 다른 結果를 보이나 Figure 5에서와 같이 乾燥狀態에서는 10Mrad線量에서도 對照群과 類似한 結果를 나타내고 있었다.

1967年 Hangay 等に 依하면 hydrocortisone 限軟膏의 主成分인 chloramphenicol과 hydrocortisone acetate는 放射線 照射後 paper chromatography 上에서의 變化가 없었다고 報告하였으나 本實驗에 있어서와 같이 水溶液 狀態에서의 tailing 現象은 放射線 分解 物質의 生成을 나타내고 있는 것으로 推測된다.

한편 2.5Mrad, 5.0Mrad 및 10Mrad의 放射線을 水溶液 狀態 또는 乾燥狀態에서 各 各 照射한 tetracycline의 IR spectrum 및 NMR spectrum은 Figure 6 및 Figure 7에서 보는 바와 같이 線量에 따른 差異를 觀察할 수 없었으며 더욱이 水溶液 狀態에서도 對照群과 類似한 spectrum을 나타내고 있었으나, 이와같은 여러가지 物理 化學的인 實驗 結果에 依하면 放射線 照射가 tetracycline의 物理 化學的 變化를 誘發하였으며

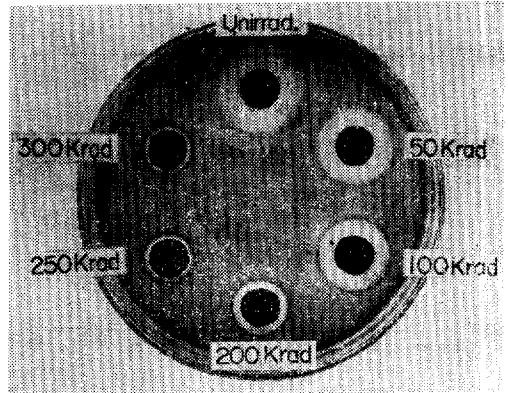


Fig. 8. Antibiotic activity of tetracycline irradiated in an aqueous solution. Assayed was carried out with *Staph. aureus*, ATCC 6538—2095 strain for overnight at 37°C

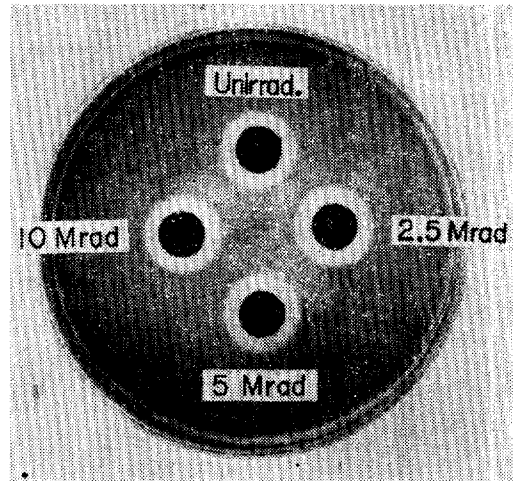


Fig. 9. Antibiotic activity of tetracycline irradiated in the dry state. All conditions were same as in Fig. 8.

放射線의 影響은 水溶液 狀態에서 더욱 顯著하였음을 알 수 있었다.

그러나 이들 物理 化學的 性狀變化는 IR 또는 NMR spectrum에서 檢出되지 않았는데 이 方法으로는 檢出이 不可能한 것으로 推測된다.

## 2. 生物學的 活性度 測定

放射線이 tetracycline 抗菌力에 미치는 影響을 觀察할 目的으로 tetracycline을 水溶液 狀態와 乾燥狀態로 區分하여 放射線 照射後 抗菌力을 測定하였다. 寒天平板培地上에서 inhibition zone을 觀察한 結果는

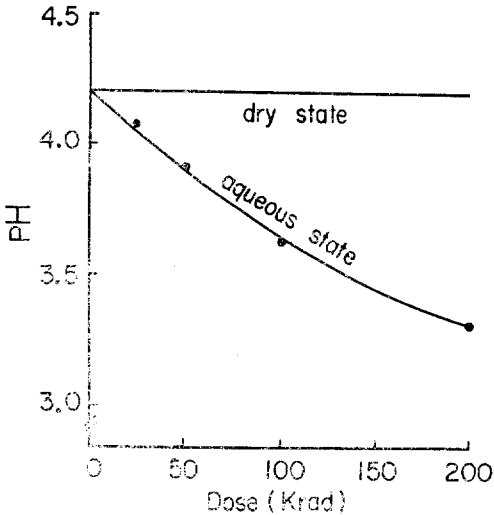


Fig 10. Comparison of antibiotic activity of tetracycline by tube dilution method. *Staph. aureus* ATCC 6538—2038 strain used was the concentration that shown 20% transmittance at 650  $m\mu$ . 9ml of this solution was mixed with 1ml of tetracycline (0.2mg/ml) gamma ray irradiated with various dose levels and incubated for 3—4 hrs at 37°C, and then determined transmittance at 530  $m\mu$  by addition of 0.5ml, 12% formaldehyde. The percent of antibiotic activity was calculated by comparing with standard curve.

### 摘 要

抗生物質 tetracycline HCl의 放射線 滅菌 可能性 與否를 檢討할 目的으로 水溶液 狀態, 乾燥 狀態로 區分하여 放射線 照射線量에 따른 物理化學的 性狀, 抗菌力 測定 實驗 等を 實施한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 水溶液 狀態에서는 300Krad 線量에서 化學的 變化를 招來하였으나, 乾燥 狀態에서는 10Mrad線量에서도 變化가 없었다.

2) 抗菌力 實驗에서 水溶液 狀態는 300Krad 線量에서 抗菌力이 喪失됨에 반해, 乾燥 狀態에서는 10 Mrad에서도 抗菌力을 繼續 維持하고 있었다.

따라서 tetracycline HCl의 放射線 滅菌은 粉末 乾燥狀態에서 實施함이 妥當할 것으로 생각된다.

### 引 用 文 獻

1. Controulis, J., C.A. Lawrence, and L.E. Brounell, 1954. The effect of gamma radiation on some pharmaceutical products. *J. Am. Pharm. Assoc.* **43**, 65—69.
2. Colovos, G.C., and B.W. Churchill, 1957. *J. Am. Pharm. Assoc.* **46**, 580.
3. Galatzeanu, I., et F. Antoni, 1967. Effects des rayons gamma(cobalt-60) sur la vitamine B<sub>6</sub> et l'acide folique. *I.A.E.A. Vienna*, 33—48.
4. Hangay, G., G. Hortobagyi, and G. Muranyi, 1967. Sterilization of hydrocortisone eye-ointment by  $\gamma$ -irradiation. I. Physical and chemical aspects. *I.A.E.A. Vienna*, 55—61.
5. Clarke, E.G.C., 1969. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and post-mortem material.
6. Cox, R.S., and A.A. Bothner-By, 1968. Pro-

Figure 8 및 Figure 9와 같이 水溶液狀態에서는 照射線量을 增加함에 따라 對照群에 비해 抗菌力이 低下하였으나 乾燥狀態에서는 線量에 關係없이 抗菌力을 維持하고 있었다.

특히 水溶液 狀態에서는 300Krad 照射로서 inhibition zone을 거의 形成치 못하고 抗菌力을 喪失하였으나 乾燥狀態에서는 일등히 높은 照射線量인 10 Mrad 照射로서도 對照群과 類似한 抗菌力을 維持하고 있었다.

또한 tube dilution法에 의한 力價 測定 結果는 Figure 10에서 보는 바와 같이 같은 傾向을 나타내었다. 즉 水溶液 狀態에서 照射線量이 增加함에 따라 抗菌力이 漸次的으로 減少되어 300Krad照射로서 抗菌力을 完全히 喪失하였으나 乾燥狀態에서는 10Mrad 照射線量에서도 對照群과 類似한 力價를 나타내고 있었다.

이와같이 antimicrobial potency 測定 結果 水溶液 狀態에서는 300Krad 照射로서 完全히 抗菌力이 喪失되었으며 乾燥狀態에서는 10 Mrad 照射로서도 抗菌力을 喪失치 않고 對照群과 類似한 結果를 나타내고 있었다.

- ton NMR spectra of di and tri substituted pyrazines. *J. Phys. Chem.* 72(5), 1642—1643.
7. N.I.H. (Korea) Regulations for tests and assay of antibiotics.
  8. Pandula, E.L., E. Farkas, and I. Racz, 1967. Effects of radiosterilization on sealed aqueous solution. *I.A.E.A. Vienna*, 83—89.
  9. Holland, J.F., Antoni, I. Galatzeanu, M. Schulman, and G. Kozinets, 1967. Effect of gamma irradiation(<sup>60</sup>Co) on the tetracycline. *I.A.E.A. Vienna*, 69—81.
  10. Haraszti, M., and K. Czeh, 1967. Sterilization of hydrocortisone eye-ointment by  $\gamma$ -irradiation. II. Bacteriological aspects. *I. A.E.A. Vienna*, 63—67.