

## 염산바캄피실린의 역가 검정법에 관한 연구

鄭敬壽 · 金永俊 · 李松愛 · 金炳珏

서울대학교 藥學大學 微生物藥品化學教室

# A Study on the Microbiological Assay of Bacampicillin Hydrochloride

Kyeong Soo Chung, Young Jun Kim, Song Ae Lee, and Byong Kak Kim

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy  
Seoul National University, Seoul 151, Korea

**Abstract:** To establish a competent method of microbiological assay for bacampicillin, one of new semi-synthetic derivatives of  $\beta$ -lactam antibiotics, a comparison was carried out between different conditions for hydrolysis of bacampicillin into ampicillin which was then subjected to cylinder plate method. The results showed that the use of carboxylic ester hydrolase *in vitro* as a pretreatment of it in either pH value 6 or 8 was feasible and that the cylinder plate method with *Sarcina lutea* was adequate for potency estimation.

### 서 론

염산바캄피실린 6-(D- $\alpha$ -aminophenylacetamido) penicillinate(mol. wt. 501.96)은 半合成페니실린으로서 암피실린(mol. wt. 349.42)의 에스테르 형태이다. 이 물질은 암피실린의 위장관 흡수력을 개선한 것으로서 위장관내에서 신속히 흡수된 후 혈중의 에스테라제에 의해 암피실린으로 분해되어 항균작용을 발휘하게 된다(Simon *et al.*, 1978). 이러한 효소 분해과정이 시험관내에서 정량적으로 이루어진다면 이로 인해 생기는 암피실린에 대하여 원통평판법(Ivashkiv, 1973; Jones and Palmer, 1970; Kavanagh, 1972, 1974, 1975; Yakovlev, 1966)을 써서 검정을 함으로써 염산바캄피실린의 역가검정이 가능하다고 사료된다. 저자들은 이러한 방법의 타당성을 알아보기 위해 본 실험을 착수하였다.

### 실험 재료 및 방법

#### 실험 재료

염산바캄피실린 원료(bacampicillin hydrochloride in

bulk): Astra Co. (Batch 13p 25-191-30)

염산바캄피실린 정제(bacampicillin hydrochloride film-coated tablet): 1정중 염산바캄피실린 400mg을 함유하는 펠립코팅 경(Pfizer Co., Brussels, Belgium, Mfd. Dec., 1976).

시험용 균주: *Sarcina lutea* ATCC 9341.

에스테라제 현탁액(esterase suspension): carboxylic ester hydrolase (1mg은 100 unit에 해당)를 3.2M ammonium sulfate(pH=6.0)에 현탁시킨 액(10mg/ml) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany, Lot No. 1357417).

암피실린 표준품: 역가 84.2%의 실험용 표준품(AT KR 8361: 79-8-1).

종충용 및 기충용 한천 배지: Difco Bacto Antibiotic Medium 1 (Seed agar). 용해 후 0.1N KOH로 pH를 조절하여 멸균 후 pH=8.0이 되도록 하였다.

시험균 이식용 한천 배지: 배지 1/중에 Difco Nutrient Broth 16g, 염화나트륨 2.5g, 한천 18g을 함유토록 조제.

시험용 균액: 보관중인 균주(*Sarcina lutea* ATCC 9341)를 시험균 이식용 한천 배지 사면에 3회 계대배

양(26°, 47시간씩)한 후 3ml의 멸균 생리식염수를 써서 균을 부유시켜 배양병내의 시험균 이식용 한천 배지(300ml)상에 고르게 퍼주었다. 37°에서 20시간 배양한 후 멸균 생리식염수로 균을 수확하고 이중 일부를 취해 멸균 생리식염수로 희석하여 650nm에서 투과도 10%가 되는 희석균액을 만들었다(Bausch & Lomb, Spectronic 20사용). 차광포장을 하여 4~5°에서 보관하며 7일 이내에 사용했다.

사용 표준액의 조제 : 암피실린 실험용 표준품(역가 84.2%) 23.70mg을 취하여 (20.0mg 力價) 50ml 용적 플라스크에 넣고 약 25ml의 멸균 정제수를 가해 20분간 진탕 용해시켜 멸균 정제수를 가해 표신을 맞추었다. (400 $\mu$ g/ml 力價). 이 액 2.5ml를 정확히 취하여 250ml 용적 플라스크에 넣고 pH=8.0의 인산염 완충액을 가하여 4 $\mu$ g/ml(力價)의 용액을 만들었다. 이로부터 각각 SH(0.2 $\mu$ g/ml 力價)와 SL(0.05 $\mu$ g/ml 力價)을 조제했다. 이들 표준액은 조제 당일에 사용했다.

검액의 조제

1) 염산바카피실린 원료(회수용 검정용) : 암피실린 100mg에 상응하는 양인 147.3mg을 정확히 취하여 250ml 용적 플라스크에 넣고 멸균 정제수 약 150ml를 가해 진탕 용해시켰다. 여기에 멸균 정제수를 표시까지 가하여 암피실린으로 환산하여 400 $\mu$ g/ml의 용액을 만들었다. 이 액을 인산염 완충액(pH=8.0)으로 희석하여 암피실린으로 4 $\mu$ g/ml의 희석액을 만든 후 이 희석액 10ml를 정확히 취하여 100ml 플라스크에 넣고 에스테라제 현탁액 0.01ml를 가하여 37° 수욕상에서 이따금 흔들어 주며 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 인산염 완충액(pH=8.0)으로 희석하여 UH(암피실린으로 0.5 $\mu$ g/ml)와 UL(암피실린으로 0.05 $\mu$ g/ml)을 조제하였다. 이들 검액은 조제 당일 사용했다.

2) 염산바카실린 필립 코팅 정 : 本品 20정을 정확히 평량한 후(13011.4mg) 유발에 넣고 곱게 갈아 이로부터 암피실린 100mg에 상당하는 양(224.0mg)을 정확히 취하여 250ml 용적 플라스크에 넣고 멸균 정제수를 가해 20분간 진탕하였다. 표신을 맞춘 후 일부를 취해 원심 분리하였다. 상등액으로부터 2.5ml를 정확히 취하여 인산염 완충액을 가해 암피실린으로 4.0 $\mu$ g/ml의 희석액을 만들었다. 이 희석액 10ml씩을 정확히 취하여 각각 100ml 플라스크에 넣고 에스테라제 현탁액을 각각 0.01ml, 0.1ml를 가한 후 37° 수욕상에서 이따금 흔들어 주며 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 인산염

완충액(pH=8.0)으로 희석하여 암피실린으로 0.2 $\mu$ g/ml에 상당하는 \*UH<sub>0.01</sub>과 \*\*UH<sub>0.1</sub>을 조제하고 이로부터 다시 \*UL<sub>0.01</sub>과 \*\*UL<sub>0.1</sub>을 조제했다.

평판의 조제 : 상법에 따라 만들되 각조 5개의 평판을 사용하였으며 균액(투과도 10%) 2ml를 종충용 한천 배지 100ml에 가하였다.

배양 및 결과 판정 : 37°에서 18시간 배양한 후 저지원의 직경을 0.5mm까지 정확히 측정하였다.

실험 결과 및 고찰

측정된 저지원의 직경과 이로부터 산출된 역가는 각각 Table I ~ III에 표시한 바와 같다.

Table I: The diameter(mm) of inhibition zone of ampicillin derived from bacampicillin hydrochloride and standard ampicillin.

Solution Plate	SH	SL	UH	UL
1	26.0	16.5	26.0	16.0
2	26.0	16.5	25.5	16.0
3	27.0	17.0	26.5	17.0
4	26.5	16.5	26.0	16.5
5	27.0	17.0	26.5	17.0
Sum	$\Sigma$ SH=132.5	$\Sigma$ SL=83.5	$\Sigma$ UH=130.5	$\Sigma$ UL=82.5

Potency(Recovery)=956(mg/g)

Table II: The diameter(mm) of inhibition zone of ampicillin derived from the bacampicillin hydrochloride film-coated tablet treated with esterase suspension (0.01ml) and standard ampicillin

Solution Plate	SH	SL	*UH <sub>0.01</sub>	*UL <sub>0.01</sub>
1	25.5	15.5	25.0	15.0
2	25.0	15.0	25.0	15.5
3	25.0	15.5	25.0	15.0
4	24.5	15.5	25.5	15.0
5	24.5	15.0	24.0	14.5
Sum	$\Sigma$ SH=125.5	$\Sigma$ SL=76.5	$\Sigma$ UH <sub>0.01</sub> =124.5	$\Sigma$ UL <sub>0.01</sub> =75.0

Potency=966 (mg/g)

\* 에스테라제 현탁액 0.01ml를 가한 경우.

\*\* 에스테라제 현탁액 0.1ml를 가한 경우.

**Table III:** The diameter(mm) of inhibition zone of ampicillin derived from bacampicillin hydrochloride film-coated tablet treated with esterase suspension (0.1 ml) and standard ampicillin.

Solution Plate	SH	SL	**UH <sub>0.1</sub>	**UL <sub>0.1</sub>
1	24.5	15.0	24.0	14.5
2	25.0	15.5	25.0	15.0
3	25.0	15.0	24.5	14.5
4	25.5	15.5	25.0	15.5
5	25.0	15.0	25.0	15.0
Sum	ΣSH= 125.0	ΣSL= 76.0	ΣUH <sub>0.1</sub> = 123.5	ΣUL <sub>0.1</sub> = 74.5

Potency=950 (mg/g)

Revised potency=966 (mg/g)

실험 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 염산 바캄피실린은 실험관내에서 에스테라제에 의해 정량적으로 암피실린이 되며(회수율 95~96%) 따라서 본 실험방법을 염산바캄피실린의 역가 검정에 적용하는 것은 타당성이 있다고 평가된다. 한편 에스테라제의 양을 달리하여 그 결과를 살펴보았을 때 효소 현탁액 0.01ml 적용시와 0.1ml 적용시에 있어서 회수율의 차이점은 없다고 판단된다. 뿐만 아니라 0.1ml의 효소 현탁액을 적용할 경우 이로 인해 역가 검정 목적물인 염산바캄피실린의 농도가 약 100분의 1 정도 희석됨으로써 계산된 역가에 대해 재차 보정을 해야 하는 번거로움을 가져오게 된다. 따라서 효소 현탁액의 적용량은 가능한 한 소량을 적용하는 것이 합리적인 것이다.

저자들은 실험에 적합한 pH조건을 찾기 위해 예비 실험으로서 pH 6.0과 8.0의 두 조건으로 실험하였던 바 그 결과상의 차이점을 발견할 수 없었으므로 암피

실린의 역가 검정법에 따라 pH=8.0의 완충제를 썼음을 밝혀 둔다.

### 결 론

염산바캄피실린의 역가 검정법으로서 carboxylic ester hydrolase를 시험관내에서 미리 처리하여 암피실린으로 가수분해시킨 후 원통평판법으로 정량하는 방법이 신속 정확한 방법임을 이 연구에서 평가하였다. 그리고 효소 현탁액의 용량은 0.01ml을 사용해서도 가능하였으며 완충액의 pH는 8.0으로 하거나 6.0으로 하여도 별로 차이가 없었다.

### References

- Bureau of Pharmaceutical Affairs(1978): "Standards of Antibiotic Drugs" (Regulation No. 120), 812 pp., Ministry of Health and Social Affairs, Republic of Korea, Seoul, Korea.
- Ivashkiv, E. (1973): "Analytical Profiles of Drug Substances" (Florey, K., ed.) Vol. 2, p. 1, Academic Press, New York.
- Jones, A., and Palmer, G. (1970): *Analyst* 95:463.
- Kavanagh, F., (1972): "Analytical Microbiology," Vol. 2, 631 pp., Academic Press, New York.
- Kavanagh, F.W. (1974): *J. Pharm. Sci.* 63:1459.
- Kavanagh, F.W. (1975): *J. Pharm. Sci.* 64:1224.
- Simon, C., Malerczyk, C., and Klaus, M. (1978): *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 14:228.
- Yakovlev, V.P., and Skala, L.Z. (1966): *Antibiotiki* 11:723 (*C.A.* 65:17535f)

<Received 20 February 1980>