

피페라실린피발로일옥시메칠에스텔의 경구흡수에 관한 연구

강 승 안

유유산업 주식회사
(1988년 4월 15일 접수)

Studies on Oral Absorption of Piperacillin Pivaloyloxymethyl Ester

Sung An Kang

YuYu Industrial Co., Ltd., Anyang 430-040, Korea
(Received April 15, 1988)

Pivaloyloxymethyl ester of piperacillin was synthesized by reacting sodium piperacillin with chloromethyl pivalate, and its chemical structure was determined by infrared and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopic methods. The pharmaceutical properties of the ester were investigated to assess its potential as a novel prodrug of piperacillin. The interface transfer of piperacillin and the ester was studied in a two-phase *in vitro* system composed of aqueous pH buffers and *n*-octanol. The ester was more lipophilic, and less water soluble above pH 4.0 than piperacillin. Significant antibacterial activity was not observed in the ester *in vitro*, but the ester was hydrolyzed into the parent drug in the rat liver homogenate. The serum levels of orally administered ester suspension containing 0.1% Tween 80 were measured in rabbits. It was found that the ester showed higher blood level, comparing with no observation of piperacillin in serum, but the time reaching the maximum serum concentration was 5 hr.

피페라실린(이하 PIP로 약함)은 위장관으로부터 거의 흡수되지 않으므로 근육 및 정맥주사제로서만 임상에 응용되고 있다¹⁻⁵⁾. 이와 같은 흡수성의 문제 뿐만 아니라 맛, 냄새, 용해도, 안정성 및 독성 등의 문제점을 개선시키기 위해서 최근 분자 수식에 의해 transport moiety를 도입함으로써 유효한 prodrug을 개발하려는 연구가 많이 시도되고 있다⁶⁻⁸⁾. 저자는 PIP의 흡수성을 개선시켜 경구투여 시 항균력과 생체내 이용율을 확보할 수 있는 피페라실린 유도체를 개발하고자 피페라실린나트륨에 chloromethyl pivalate를 반응시켜 피페라실린피발로일옥시메칠에스텔(이하 PPE로 약함)을 합성하고 prodrug으로서의 가능성을 검토하였다.

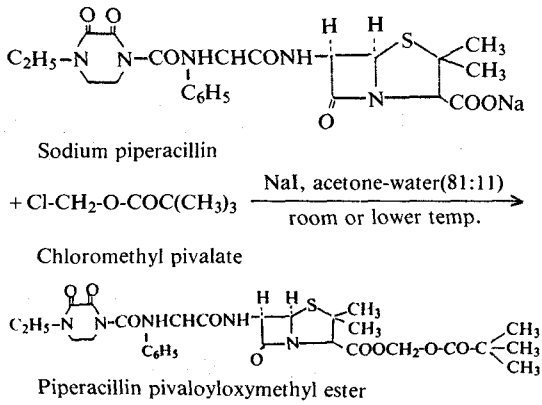
실험방법

시약 및 기기

피페라실린나트륨 및 PIP는 삼성제약(주)으로부터 제공받은 것을 썼고 chloromethyl pivalate 및 기타 시약은 시판 특급 혹은 일급품을 사용하였다. 기기로는 PMR측정기(Hitachi R-600), 적외분광광도계(Imw Heme Laser), 가시부 및 자외부 흡광도측정기(Pye Unicam PU 8600), 고속액체 크로마토그래프장치(Waters model 440) 및 용출시험장치(model No. 72, Itanson Research Co.) 등을 사용하였다.

피페라실린피발로일옥시메칠에스텔의 합성⁹⁻¹²⁾

피페라실린 나트륨 5.40g(0.01M)과 chloromethyl pivalate 1.5g(0.01M)을 아세톤과 물의 혼합용매(81:11)에 녹이고 sodium iodide 2.5g을 넣어 촉매로 하여 실온 또는 저온하에서 24시간 교반하여 Scheme 1과 같이 반응시킨 다음 150ml의 빙수중에 교반하면서 추가하였다. 0°C에서 1시간 이상 방치하고 여과하여 PPE 4.9-5.3g을 얻었



Scheme 1—Synthetic process of piperacillin pivaloyloxymethyl ester

다. 이것을 CHCl₃ 20 ml에 넣어 추출하고 여과한 다음 여액을 감압 농축하고 잔류물에 아세톤 소량을 넣어 녹이고 2배량의 빙수중에 교반하면서 주가 하였다. 얻어진 결정체를 0°C에서 1시간 이상 방치하고 여과하여 얻은 결정체를 아세톤으로 재결정하였다.

mp. 176.2±2°. IR (ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 2980-2800 (ν-CH₃), 1780, 1750-1740 (νC=O), 1450, 1390, 1370 (δ-t-butyl), PMR (CDCl₃) δ (ppm): 0.73 (s, 9H), 1.94 (s, 2H).

실험동물

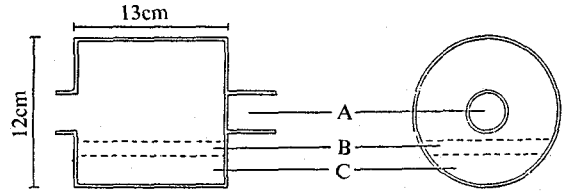
체중 200g 이상의 Sprague-Dawley계 웅성 rat 및 체중 2.0~2.5 kg의 건강한 New Zealand white계 웅성 가토를 1군 3마리로 하여 사용하였다.

용해성 시험

PIP 및 PPE의 용해성은 pH 1.2-8.0의 여러 완충액 (KCl-HCl 완충액, McIlvaine 완충액 및 붕산염완충액)을 사용하여 대한약전 통칙중 용해성 시험방법에 따라 시험하였다.

계면이행 시험¹³⁻¹⁷⁾

In vitro 계면이행 시험장치인 rotating cell (Scheme 2)을 이용하여 n-octanol층과 pH 1.2, 2.3, 3.0, 4.0 및 5.6 완충액과의 계면에서의 약물의 이행 및 분배 현상을 실험하였다. 따로 PPE 일정량을 dimethylsulfoxide 2 ml에 녹이고 이것에 n-octanol로 포화시킨 완충액 48 ml씩을 넣고



Scheme 2—Apparatus for rotating cell used for *in vitro* interface transfer study.

Key: A, rotating shaft; B, n-octanol phase; C, aqueous phase

PME의 농도가 1×10⁻⁴M이 되도록 하여 rotating cell에 넣고 이것에 각 완충액으로 포화시킨 n-octanol 50 ml씩을 넣었다. 이 cell을 36.5±1°C에서 50 rpm으로 3-6시간 회전시켜 약물의 계면이행이 평형에 도달하도록 하였다. 이를 정지한 다음 유기상으로부터 3.0 ml를 정확히 취하여 메탄올로 적절히 희석한 다음 254 nm에서 흡광도를 측정하여 계면이행량을 구하였다.

용출시험

40-50 mesh의 PIP 및 PPE를 각각 PIP로서 100 mg에 해당하는 양을 정확히 달아 회전검체통에 넣고 대한약전 제 1액 (pH 1.2) 또는 제 2액 (pH 6.8) 1,000 ml를 시험액으로 하여 용출시험을 행하였다. 시험액을 37±0.5°C로 유지하면서 100 rpm으로 회전시키면서 일정시간마다 용출액 3.0 ml씩을 취하여 0.45 μm Millipore filter로 여과하고 여액을 시험액으로 적절히 희석한 다음 파장 254 nm에서 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검량선으로부터 용출량을 산출하였다. 용출액의 채취후는 즉시 시험액 3.0 ml를 넣어 용량을 일정하게 유지시켰다.

생체내 가수분해 실험^{18,19)}

PPE의 생체내 가수분해를 확인하기 위하여 체중 200g 이상의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하여 간 및 소장의 homogenate와 혈액내에서의 PPE의 가수분해 실험을 실시하였다.

간 Homogenate에서의 가수분해—실험전 하루 밤 절식시킨 rat를 에텔로 마취시키고 복부를 절개하여 문맥으로 생리식염수를 관류시킨 다음 간을 절취하여 무게를 달고 세척하여 이것을 0.01M 인산염완충액-염화칼륨용액 [0.01M 인산이수소칼륨 용액 (pH 7.6) 100 ml에 염화칼륨 1.15g을 가한

다]에 25 w/v%가 되도록 현탁시킨다. 이것을 빙냉하에서 tissue homogenizer로 균질화하고 4°C에서 10,000g로 20분간 원심분리하여 상정액을 얻어 냉장보관하여 24시간 이내에 사용하였다. 따로 PPE 1.5 mg을 dimethylsulfoxide 0.1 ml에 녹이고 앞의 상정액 5 ml를 넣어 37±0.5°C에 방치한 후 5, 10, 20, 30 및 60분후 0.5 ml씩을 취하여 메탄올 1 ml를 넣어 제단박하고 3분간 vortex mixing한 후 1,400g로 15분간 원심분리하여 상정액을 0.5 μm Millipore filter로 여과하여 여액중의 PPE 함량을 bioassay²⁰⁾하여 PPE의 잔존율을 산출하였다.

소장 Homogenate에서의 가수분해—실험전 하루밤 절식시킨 rat를 에텔로 마취시키고 rat의 복부를 절개하여 십이지장으로부터 약 30 cm의 소장을 절취하여 생리식염수로 내용물을 세척한 다음 무게를 달고 세절하여 앞에서와 같은 방법으로 조작하여 10, 30, 60, 120 및 180분 후의 PPE 잔존율을 산출하였다.

혈액 내에서의 가수분해—rat의 심장으로부터 혈액을 취하여 4°C에서 10,000g로 20분간 원심분리하여 상정액을 얻어 앞에서와 같은 방법으로 가수분해시험을 행하여 10, 30, 60, 120 및 180분 후의 PPE 잔존율을 산출하였다.

혈중농도 측정

체중 2.0~2.5 kg의 건강한 New Zealand white계 웅성 가토를 16시간 절식시켜 1군 3마리를 실험동물로 하였다. PIP는 150 mg/kg을, PPE는 PIP로서 150 mg/kg에 해당하는 양을 0.1% Tween 80 용액 5 ml에 현탁시켜 경구투여하였다. 약물투여후 12시간까지는 절식시키면서 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며 그 이후는 사료를 자유롭게 먹도록 하였다. 약물투여 직전 및 투여후 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 12 및 24시간째에 귀 정맥으로부터 1.5~2 ml씩을 채혈하여 실온에서 15분간 방치한 다음 1,400g로 15분간 원심분리하고 bioassay²⁰⁾하여 serum중 PIP의 농도를 구하였다.

실험결과 및 고찰

용해성

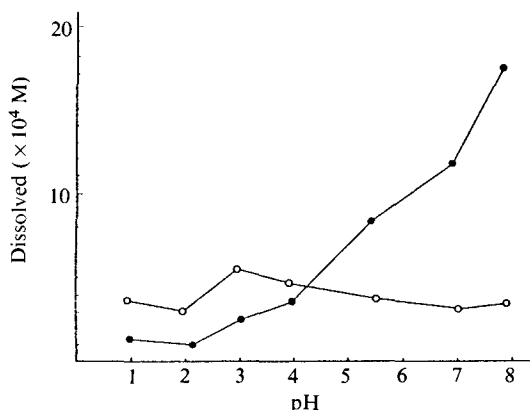


Figure 1—Solubility properties of piperacillin (●) and piperacillin pivaloyloxymethyl ester (○) at 25°C and various pHs.

Table I—Partition Coefficients for the Interface Transfer of Piperacillin and Piperacillin Pivaloyloxymethyl Ester (PPE) in a Two-Phase System at Various Temperatures.

Compound	pH of buffers	Partition coefficients		
		25°C	30°C	36.5°C
PIP	1.2	0.3564	0.3712	0.3661
	2.3	0.3401	0.3520	0.3429
	3.0	0.3253	0.3272	0.3238
PPE	1.2	4.310	4.297	4.381
	2.3	9.801	9.431	9.562
	3.0	17.031	17.201	17.324
	4.0	5.017	5.125	5.616
	5.6	4.142	4.213	4.310

강산성 영역에서는 PPE의 용해성이 PIP보다 다소 높은 경향을 보여 주었으나 pH가 증가할수록 PPE는 거의 변화가 없는 반면 PIP의 용해성은 pH 4.0부터 급격히 증가하였다(Fig. 1).

계면이행

PPE의 유수분배성은 Table I에서와 같이 PIP에 비하여 *n*-octanol층으로 훨씬 더 잘 이행되었다. 이것은 PIP의 carboxyl기가 pivaloyloxy methyl기로 에스테르화되어 소수성이 보다 증가되어 지용성이 커진 때문으로 생각된다. 따라서 *in vitro* transport model을 이용한 계면이행의 실험 결과로부터 PIP의 흡수성을 증대시킨

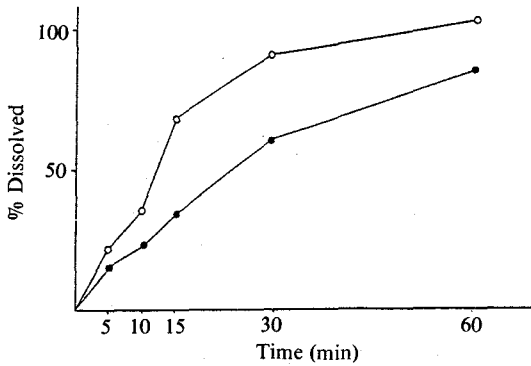


Figure 2.—Dissolution profiles for piperacillin (●) and piperacillin pivaloyloxymethyl ester (○) in the first fluid (pH 1.2) at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

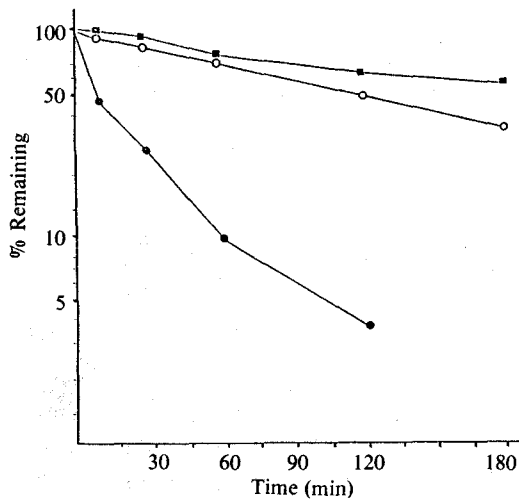


Figure 3—Semilogarithmic plots for the hydrolysis of piperacillin pivaloyloxymethyl ester in liver and intestine homogenates, and blood at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Key: ●, liver homogenate; ○, blood; ■, intestine homogenate

PPE가 prodrug으로서의 가능성이 있다고 생각되었다.

용출 속도

대한약전 제 1액에서의 PIP 및 PPE의 용출시험 결과는 Fig. 2와 같다. 이에서 보면 제 1액에서 PPE가 PIP보다 용출율이 높게 나타났다. 난용성 약물의 용출속도가 흡수의 율속단계임을 고려할 때 PIP의 에스테르화가 생물약제학적으로 보다 유용한 수단이 될 것으로 생각된다.

생체내 가수분해

PPE 자체는 *in vitro*에서 항균력이 없다는 예비 실험의 결과를 가지고 *in vivo*에서 가수분해된 원 약물이 PIP를 생물학적인 방법으로 정량하였다. 간 및 소장 homogenate와 혈액 중에서의 PPE의 가수분해 실험 결과는 Fig. 3과 같다. 이에서 보면 간 homogenate에서는 5분 이내에 약 50% 정도가 가수분해되었으며 20분에는 약 70%, 30분에는 95% 이상이 가수분해되었고 60분 후에는 잔존하는 PPE는 거의 없었다. 혈액내에서의 PPE 가수분해는 1시간 이내에 약 27%가 가수분해되었고 2시간 후에는 약 47%, 3시간 후에는 약 65%가 가수분해됨을 알 수 있었다. 한편 소장 homogenate내에서의 PPE 가수분해는 1시간 후 약 13%, 2시간 후 약 26% 및 3시간 후 약 35%가 가수분해되었다. 따라서 소장 homogenate나 혈액에서의 PPE 가수분해율은 간 homogenate에서의 그것에 비해 현저히 낮았다.

혈중농도

약물투여 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 12 및 24시간 후 채혈하고 이로부터 얻은 serum을 사용하여

Table II — Serum Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of Piperacillin (PIP) after Oral Administration of PIP and its Pivaloyloxymethyl Ester (PPE) in Rabbits.

Compound	Time (hr)								
	0.5	1	2	4	5	6	8	12	24
PIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPE	0.45 ± 0.05	0.64 ± 0.09	2.01 ± 0.10	8.36 ± 0.52	18.90 ± 1.18	15.01 ± 1.18	9.65 ± 0.92	3.21 ± 0.81	0.30 ± 0.02

—: Not observed. Compounds were administered at the dose of 150 mg/kg as PIP. Data represent the mean \pm SE (n=3).

bioassay에 따라 혈중농도를 측정된 결과 Table II에서와 같이 PPE는 높은 혈중농도를 나타내었으나 PIP는 혈중에서 전혀 검출되지 않았다. 이때 PPE 투여군은 약 5시간 후에 18.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 최고 혈중농도를 나타내었다. PPE의 최고 혈중농도 도달시간이 상당히 늦어진 것은 PPE가 가토의 위 장관내에서 흡수의 율속단계인 용출이 지연된 때문이라고 생각된다.

결 론

피페라실린피발로일옥시메칠에스테르(PPE)을 제조하여 피페라실린(PIP)과 비교 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. rotating cell을 이용하여 *n*-octanol층과 여러 원층액으로 된 two phase system에서의 계면 이행 실험결과 20, 30 및 36.5°C에서의 PIP의 분배계수가 0.324 - 0.371인 반면 PPE는 4.142-17.324로 나타나 PPE의 지용성이 PIP의 그것보다 현저히 증가하였다.

2. rat의 간 homogenate에서 PPE는 30분 이내에 95% 이상, 혈액 및 장관 homogenate에서는 3시간 후에 각각 약 65% 및 35%가 가수분해되었다.

3. PPE를 PIP로서 150mg/kg을 가토에 경구 투여한 결과 PPE는 생체내에서 parent drug으로 가수분해되어 항균활성을 나타내었으며 PIP는 위 장관 흡수가 전혀 인정되지 않은 것에 반하여 PPE는 높은 혈중농도를 나타내었다. 따라서 PPE는 위 장관 흡수가 가능한 prodrug으로서 유효한 이용이 기대된다.

문 헌

- 1) M.L. Corrado, S.H. Landesman and C.E. Cherubin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 893 (1980)
- 2) T.O. Kurtz, D.J. Winston, J.A. Hindler, L.S. Young, W.L. Hewittm and W.J. Martin

- ibid.*, **18**, 645 (1980)
- 3) L. Verbist, *ibid.*, **19**, 407 (1981)
- 4) A.L. Demain and N.A. Solomon, *Antibiotics Containing the Beta-Lactam Structure*, Vol. 2, Springer-Verlag, 1983, pp. 119-332
- 5) J.P. Hou and J.W. Poole, *J. Pharm. Sci.*, **60**(4), 503 (1971)
- 6) E.B. Roche, *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*, American pharmaceutical Association, 1977, pp. 68-97
- 7) T. Hguchi and V. Stella, *Pro-drugs as Novel Drug Delivery Systems*, American Chemical Society, 1975, pp. 1-115
- 8) Y.W. Chien, *Novel Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., 1982, pp. 465-598
- 9) W.V. Curran and A.A. Ross, *J. Antibio.*, **36**, 179 (1983)
- 10) M. Johansen, H. Bundgaard and E. Falch, *Int. J. Pharm.*, **13**, 89 (1983)
- 11) A. Buur and H. Bundgaard, *ibid.*, **21**, 349 (1984)
- 12) A. Buur, H. Bundgaard and E. Falch, *ibid.*, **24**, 43 (1985)
- 13) T.L. Hafkenscheid and E. Tomlinson, *ibid.*, **16**, 225, 239 (1983)
- 14) J.S. Robertson and B.W. Madsen, *J. Pharm. Sci.*, **63**(2), 234 (1974)
- 15) A. Tsuji, O. Kubo, E. Miyamoto and T. Yamana, *ibid.*, **66**(12), 1675 (1977)
- 16) A. Tsuji, E. Miyamoto, N. Hashimoto and T. Yamana, *ibid.*, **67**(12), 1705 (1978)
- 17) S.H. Yalkowsky, S.C. Valvani and T.J. Roseman, *ibid.*, **72**(8), 866 (1983)
- 18) H.B. Waynforth, *Experimental and Surgical Technique in the Rat.*, Academic Press, 1980, pp. 136-219
- 19) S.H. Curry and R. Whelpton, *Manual of Laboratory Pharmacokinetics*, John Wiley and Sons, 1983, pp. 82-98
- 20) 日本抗生物質医薬品 基準解説, 薬業時報社, 1986, pp.515-519