

6-벤조치아졸 페니실린 유도체의 베타락타마제 효소억제력과 베타락탐항생제 병용시 활성비교

윤상배 · 임채욱*

중앙대학교 약학대학 의약품화학 교실
(Received June 14, 2008; Revised July 3, 2008)

β -Lactamase Inhibitory Activity and Comparative Activity of 6-Benzothiazole Penicillin Derivatives in Combination with β -Lactam Antibiotics

Sang Bae Yoon and Chaeuk Im*

Division of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chung-ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — *In vitro* β -lactamase inhibitory activity of 6-benzothiazole penicillins (1, 2, 3 and 4) was compared with clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. The inhibitory activity of exomethylene compounds (3 and 4) was stronger than those of non-exomethylene compounds (1 and 2). The sulfide 3 showed stronger inhibitory activity than sulbactam, clavulanic acid and similar to tazobactam against β -lactamase Type I enzymes. The inhibitory activity of 4 was stronger than those of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam against Type III and IV enzymes. The *in vitro* antimicrobial activity of ampicillin or cefoperazone combined with 3 or 4 was stronger than those of ampicillin or cefoperazone alone against many β -lactamase producing strains to show that compounds 3 and 4 have some synergistic effect. The synergistic activity of 3 and 4 was comparable to sulbactam in some β -lactamase producing strains, but it was inferior to tazobactam.

Keywords □ antimicrobial activity, β -lactamase inhibitors, 6-exomethylenepenam

β -Lactam계 항생제에 대한 세균의 일반적인 내성기전은 β -lactam 항생제를 불활성화시키는 β -lactamase 효소를 내성균이 분비하여 항생제의 약효를 제거하는 것이다. β -Lactamase 효소에는 AmpC 등의 chromosome 매개성 β -lactamase와 TEM-1, SHV-1 등의 plasmid 매개성 β -lactamase가 있다. β -Lactam 항생제의 사용에 의한 내성균주의 선별적인 증식과 함께 plasmid 매개성 β -lactamase는 내성균의 급격한 전파를 초래하였다.^{1,3)} 이런 내성균을 치료할 수 있는 방법으로 β -lactamase 효소를 억제하는 β -lactamase 억제제를 개발하고, β -lactam 항생제와 병용 투여하여 β -lactam 항생제를 β -lactamase 효소로부터 보호하는 것이 활발히 연구되었다.^{4,7)}

Clavulanic acid를 시작으로 sulbactam, tazobactam이 β -lactamase 억제제로 개발되었고, 이들을 amoxicillin, ampicillin, piperacillin 등 기존 항생제와 병용 투여하여 각각 augmentin,

unasyn, tazocillin의 이름으로 β -lactamase를 분비하는 내성균의 치료에 사용하고 있다. 그러나, 이들 β -lactamase 억제제에 내성이 있는 균주들이 이미 보고되고 있어서 새로운 β -lactamase 억제제의 개발이 필요하다. β -Lactamase 억제제에 대한 내성기전은 β -lactamase의 과잉 생산, β -lactamase 억제제의 균주 유입 억제 및 β -lactamase 억제제에 대한 감수성 감소등이 알려졌다.⁸⁻¹¹⁾

본 실험에서는 기존의 β -lactamase 억제제보다 우수한 억제효과가 있는 신규화합물을 개발하기 위하여 합성된 6-benzothiazole penicillin 유도체 4종에 대한 약효검색을 목적으로 *in vitro* β -lactamase 효소 억제력을 측정한 후, 효소 억제력이 우수한 2종의 화합물을 선택하여 β -lactamase를 생산하는 내성균주를 대상으로 현재 임상에서 사용되고 있는 β -lactamase 억제제와 *in vitro* 항균력을 비교 실험하였다.

실험 방법

시약 및 균주

실험에 사용한 β -lactamase 효소는 5가지(Type I(from *Bacillus*

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5603 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) chaeukim@cau.ac.kr

Table I - *In vitro* β -lactamase inhibitory activity of synthesized compounds (IC_{50} , μ M)

Inhibitor	Enzymes				
	Type I	Type II	Type III	Type IV	TEM-2
Sulbactam	17.70	29.10	10.80	26	1.00
Tazobactam	0.12	0.22	1.82	3.80	0.02
Clavulanic acid	>100	>100	>100	15	0.15
1	>100	8.30	0.69	>100	>100
2	>100	>100	3.10	>100	7.10
3	0.12	>100	>100	6.30	3.60
4	>100	>100	0.03	0.32	6.80

cereus), Type II(from *Bacillus cereus*), Type III(from *Enterobacter cloacae*), Type IV(from *Enterobacter cloacae*) 및 TEM-2(from *Escherichia coli* 205))이고, Sigma 회사에서 구입하여 사용하였다. β -Lactamase 효소억제 및 MIC 측정에 사용한 6-exomethylene penamsulfone화합물은 본 실험실에서 합성한 화합물이고, 대조약물로 clavulanic acid(Smithkline Beecham), sulbactam(Pfizer) 및 tazobactam(한미약품)을 이용하였다. β -Lactamase를 생산하는 시험용 균주 13종은 한미약품에서 제공받아서 사용하였고, 배지로 Mueller Hinton broth(Difco)를 사용하였다.

In vitro β -lactamase 효소 억제활성 측정^{12,13)}

UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 합성한 화합물 4종의 β -lactamase 효소의 억제활성을 측정하였다(Table I). 합성된 화합물들은 5가지의 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M)로 조제하였고, 효소 활성을 50% 억제하는데 필요한 화합물의 농도를 IC_{50} 수치로 계산하였다.

β -Lactamase Type I에 대한 억제제의 IC_{50}

Cuvette에 phosphate 완충용액(pH 7.0, 2.875 ml), β -lactamase 효소 Type I(15 μ l, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50 μ l를 넣은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 60 μ l의 penicillin G(10 mM)를 가하고 233 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고 IC_{50} 값을 계산하였다.

β -Lactamase Type II에 대한 억제제의 IC_{50}

β -Lactamase Type II 효소를 사용하여 β -lactamase Type I과 동일한 방법으로 IC_{50} 값을 계산하였다.

β -Lactamase Type III에 대한 억제제의 IC_{50}

Cuvette에 phosphate 완충용액(pH 7.0, 2.875 ml), β -lactamase Type III(15, 0.2 unit/assay) 및 합성 화합물 용액 50 μ l 넣은 후, 30°C에서 10분간 방치한다. 여기에 효소에 대한 기질로 60 μ l의

cephaloridine(5 mM)을 가하고 260 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 각 화합물 농도에 대한 억제율(%)을 구하고 IC_{50} 값을 계산하였다.

β -Lactamase Type IV에 대한 억제제의 IC_{50}

β -Lactamase Type IV 효소를 사용하여 β -lactamase Type III와 동일한 방법으로 IC_{50} 값을 계산하였다.

TEM-2 효소에 대한 억제제의 IC_{50}

β -Lactamase TEM 효소를 이용하여 β -lactamase Type III와 동일한 방법으로 IC_{50} 값을 계산하였다.

항균력실험(MIC)¹⁴⁾

시판하는 β -lactamase 억제제와 유사하거나 우수한 효소억제력을 보여주는 새로운 penam 유도체 2종(3, 4)의 화합물에 대하여 β -lactamase를 생산하는 13종의 내성균주를 대상으로 현재 임상에서 사용되고 있는 β -lactamase 억제제인 sulbactam, tazobactam과 항생제인 ampicillin, cefoperazone을 사용하여 *in vitro*에서 상대적인 항균력 활성을 비교 실험하였다. 본 실험에서는 억제제와 항생제의 혼합비율을 고정하고 2배 희석법으로 희석하여 실험하였다. 항균시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS)의 "Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria"의 규정에 따라 액체배지 희석법으로 MIC(Minimal Inhibition Concentration)를 측정하였다. β -Lactamase 억제제와 β -lactam 항생제의 혼합 용량비를 최종농도가 1.00 mg/ml가 되게 하였고, 합성된 화합물도 β -lactam 항생제를 혼합하여 1.00 mg/ml 정도로 맞추었다. 균주는 10^8 cfu/ml가 되도록 제조한 후, 10^5 까지 희석하여 100 μ l씩 접종하였다. 세균의 접종은 Mueller Hinton broth로 표준 2배 희석법으로 실시하였다. 완성된 well plate는 35~37°C에서 16~24시간 배양한 후, 육안으로 탁도를 살펴서 생존여부를 조사하여 균의 성장이 억제된 최소한의 농도를 MIC로 하였다.

실험결과 및 고찰

효소억제효과(IC_{50})

화합물 1은 β -lactamase Type II에 대한 IC_{50} 가 8.30 μ M이어서 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 각각 3배, 12배 우수한 활성을 보여주었으나, tazobactam보다는 약한 효소억제력을 나타냈다. Type III 효소에 대해서는 IC_{50} 가 0.69 μ M이고 sulbactam, clavulanic acid 및 tazobactam 보다 효소억제력이 각각 15배, 145배, 3배 우수한 활성을 보여주었다. 그러나, 다른 β -lactamase 효소에 대해서는 억제력을 보여주지 않았다.

화합물 2는 β -lactamase Type III 효소에 대한 IC_{50} 가 3.10 μM 이어서 sulbactam과 clavulanic acid보다 Type III 효소에 대한 효소억제력이 각각 3배와 32배 우수한 활성을 보여주었고, TEM-2 효소에 대해서는 IC_{50} 가 7.10 μM 의 효소억제력을 나타내었지만, 임상에서 사용하는 효소억제제보다 낮은 활성을 보였다. 그리고, 다른 β -lactamase 효소에 대해서는 억제력을 보여주지 않았다.

화합물 3은 β -lactamase Type I 효소에 대한 IC_{50} 가 0.12 μM 이어서 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 각각 147배와 833배 우수한 활성을 보여주었고, tazobactam과 유사한 효소억제력을 보여주었다. Type IV 효소에 대해서 화합물 3은 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 각각 4배와 2배 우수한 활성을 보여주었으나, tazobactam보다는 2배 낮은 효소억제력을 보여주었다. 그러나, TEM-2 효소에 대해서는 IC_{50} 가 3.60 μM 이어서 임상에서 사용하는 효소억제제보다 낮은 활성을 보였고, 다른 β -lactamase 효소에 대해서는 억제력을 보여주지 않았다.

화합물 4는 β -lactamase Type III에 대한 IC_{50} 가 0.03 μM 이어서 sulbactam, clavulanic acid 및 tazobactam보다 각각 360배, 3333배 및 60배 강력한 효소억제력을 보여주었고, Type IV 효소에 대한 IC_{50} 가 0.32 μM 이어서 sulbactam, clavulanic acid 및 tazobactam보다 각각 81배, 46배 및 12배 강력한 효소억제력이 있어서 임상에서 사용하는 의약품보다 높은 약효를 보였다. 그러나, TEM-2 효소에는 IC_{50} 가 6.80 μM 이어서 기존의 효소억제제보다 약한 효소억제력을 보여주었고, 다른 β -lactamase 효소에 대해서는 억제력을 보여주지 않았다(Table I).

각각의 β -lactamase에 대한 합성화합물의 효소억제력을 비교해 보면, Type I 효소에 대하여 화합물 3은 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 우수하였고, tazobactam과 효소억제력이 유사하였으나, 화합물 3 이외의 IC_{50} 는 100 μM 이상으로 효소억제력이 낮았다. Type II 효소에 대해서는 화합물 1이 sulbactam과 clavulanic acid보다 효소억제력이 우수하였으나, tazobactam보다는 약하였다. 다른 합성화합물의 Type II 효소에 대한 IC_{50} 는 모두 100 μM 이상으로 효소억제력이 낮았다. 그러나, Type III 효소에 대해서는 화합물 1과 4가 sulbactam과 clavulanic acid보다 우수할 뿐만 아니라, 임상에서 사용하는 가장 강력한 억제제인 tazobactam보다도 강력한 효소억제력을 보였고, 화합물 2도 sulbactam과 clavulanic acid보다 우수한 효소억제력을 나타내었다. Type IV 효소에 대해 화합물 4는 임상에서 사용하는 의약품보다 높은 약효를 보였고, 화합물 3도 sulbactam과 clavulanic acid보다 우수한 효소억제력을 나타내었다. 그러나, TEM-2 효소에 대해서는 화합물 3의 IC_{50} 가 3.60 μM 의 효소억제력을 나타내었지만, 임상에서 사용하는 효소억제제보다 낮은 활성을 보였다.

In vitro 항균력실험

β -Lactamase를 생산하는 13종의 내성균주를 대상으로 합성화합물 가운데 β -lactamase 효소억제력이 우수한 2종의 화합물(3과 4)이 항생제(penicillin계의 ampicillin과 cephalosporin계의 cefoperazone)와 병용시 보여주는 항균력을 현재 임상에서 사용하는 β -lactamase 효소억제제인 sulbactam 및 tazobactam과 비교하여 Table II와 III에 나타내었다.

합성화합물 3의 경우, 13종의 내성균주 가운데 3종의 균주에서 ampicillin 단독사용보다 ampicillin/화합물 3의 병용사용이 우수한 항균력을 보여주었다. 그리고, ampicillin/화합물 3과

Table II - Antimicrobial activity of ampicillin alone and in combination with sulbactam, tazobactam or synthesized compounds (3 and 4)

β -Lactamase Producing strains	Antibiotics Minimal inhibitory concentration (MIC $\mu g/ml$)				
	AMP	AMP+ SUL	AMP+ TAZ	AMP+ 3	AMP+ 4
<i>C. freundii</i> NIH10018-68	256	32	16	256	128
<i>E. cloacae</i> 11	128	32	64	128	128
<i>E. aerogenes</i> 37	512	128	64	512	512
<i>S. marcescens</i> 1	512	512	128	512	512
<i>S. marcescens</i> 2	512	256	256	512	512
<i>P. aeruginosa</i> F0013	512	512	256	256	512
<i>P. aeruginosa</i> 5164	512	512	64	256	128
<i>P. aeruginosa</i> 6390	512	128	64	512	256
<i>A. calcoaceticus</i> S21	512	256	128	512	512
<i>E. coli</i> ML4901/Rms 213	512	256	128	256	512
<i>E. coli</i> ML1401/RNG 14	512	256	128	512	256
<i>K. aerogenes</i> 1976E	512	512	128	512	512
<i>K. aerogenes</i> 1082E	512	256	256	512	512

AMP=Ampicillin, SUL=Sulbactam, TAZ=Tazobactam

Table III - Antimicrobial activity of cefoperazone alone and in combination with sulbactam, tazobactam, or synthesized compounds (3 and 4)

β -lactamase Producing strains	Antibiotics Minimal inhibitory concentration (MIC $\mu g/ml$)				
	CEFO	CEFO+ SUL	CEFO+ TAZ	CEFO+ 3	CEFO+ 4
<i>C. freundii</i> NIH10018-68	32	8	4	32	16
<i>E. cloacae</i> 11	256	64	32	128	64
<i>E. aerogenes</i> 37	128	64	64	128	128
<i>S. marcescens</i> 1	512	512	128	512	512
<i>S. marcescens</i> 2	256	128	64	256	64
<i>P. aeruginosa</i> F0013	128	64	32	64	128
<i>P. aeruginosa</i> 5164	512	256	256	512	512
<i>P. aeruginosa</i> 6390	64	64	32	64	64
<i>A. calcoaceticus</i> S21	512	64	32	512	256
<i>E. coli</i> ML4901/Rms 213	128	64	32	128	64
<i>E. coli</i> ML1401/RNG 14	128	64	32	64	64
<i>K. aerogenes</i> 1976E	512	512	64	512	512
<i>K. aerogenes</i> 1082E	128	64	32	64	64

CEFO=Cefoperazone, SUL=Sulbactam, TAZ=Tazobactam

ampicillin/sulbactam의 병용사용을 비교하면, 화합물 3은 내성균 주중에서 3종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 2종의 균주에서는 sulbactam보다 우수한 병용효과를 보여주었다. 그러나, ampicillin/화합물 3과 ampicillin/tazobactam의 병용사용을 비교하면, 화합물 3은 내성균주 가운데 1종의 균주에서만 tazobactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 다른 내성균주에 대한 병용효과를 tazobactam보다 우수하게 보여주지 않았다(Table II). Cefoperazone과 화합물 3의 관계를 살펴보면, 4종의 균주에서 cefoperazone 단독사용보다 cefoperazone/화합물 3의 병용사용이 우수한 항균력을 보여주었다. 그리고, cefoperazone/화합물 3과 cefoperazone/sulbactam의 병용사용을 비교하면, 화합물 3은 내성균주 중에서 6종의 균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었으나 sulbactam보다 우수한 병용효과를 보여준 내성균주는 없었다. 그리고, 실험한 모든 내성균주에서 화합물 3은 tazobactam 보다 약한 병용효과를 보여주었다(Table III).

합성화합물 4의 경우, 13종의 내성균주 가운데 4종의 균주에서 ampicillin 단독사용보다 ampicillin/화합물 4의 병용사용이 우수한 항균력을 보여주었다. 그리고, ampicillin/화합물 4와 ampicillin/sulbactam의 병용사용을 비교하면, 화합물 4는 4종의 내성균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 1종의 균주에서만 sulbactam보다 우수한 병용효과를 보여주었다. 그러나, ampicillin/화합물 4와 ampicillin/tazobactam의 병용사용을 비교하면, 화합물 4는 모든 내성균주에 대한 병용효과를

tazobactam보다 약하게 보여주었다(Table II). Cefoperazone과 화합물 4의 관계를 살펴보면, 7종의 내성균주에서 cefoperazone 단독사용보다 cefoperazone/화합물 4의 병용사용이 우수한 항균력을 보여주었다. 그리고, cefoperazone/화합물 4와 cefoperazone/sulbactam의 병용사용을 비교하면, 화합물 4는 7종의 내성균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과를 보여주었고, 1종의 균주에서 sulbactam보다 우수한 병용효과를 보여주었다. 그러나, cefoperazone/화합물 4와 cefoperazone/tazobactam의 병용사용을 비교하면, 1종의 균주에서 tazobactam과 유사한 병용효과를 보여주었으나 tazobactam보다 우수한 병용효과를 보여준 내성균주는 없었다(Table III).

결론

합성화합물 4종에 대한 β -lactamase 효소억제 활성실험에서 6-exomethylene의 구조(3과 4)가 β -lactamase 효소억제력을 증가시키고, 화합물(4)과 화합물(3)의 효소억제력은 각각의 β -lactamase 효소에 대하여 약간 다르게 나타났다. Sulfide 구조의 화합물 3은 β -lactamase Type I과 Type III 효소에 대하여 현재 임상에서 사용하는 clavulanic acid, sulbactam보다 우수하고, tazobactam과 유사한 효소억제력을 보여주었고, sulfone 구조의 화합물 4는 β -lactamase Type III와 Type IV 효소에 대해서 현재 임상에서 사용하는 모든 β -lactamase 억제제 보다 우수한 효소억제력을 보여주었다.

Ampicillin이나 cefoperazone을 단독으로 사용한 경우보다 합성화합물과 병용한 경우, 많은 내성균주에서 MIC가 낮게 나타나서 합성화합물의 병용효과를 보여주었다. Ampicillin을 합성화합물과 병용한 경우, 10종의 내성균주에서 sulbactam과 유사하거나 우수한 병용효과가 있었으나, 대부분의 내성균주에서 tazobactam보다 낮은 병용효과가 나타났다. Cefoperazone을 합성화합물과 병용한 경우, 13종의 내성균주에서 sulbactam과 유사한 병용효과가 있었으나, 대부분의 내성균주에서 tazobactam보다 병용효과가 낮게 나타났다. 합성한 화합물이 일부 β -lactamase(Type I, Type III, Type IV 효소)에 대하여 임상에서 사용하는 β -lactamase 억제제 보다 β -lactamase 효소 억제력은 우수하였으나, 내성균으로 흡수되는 세포막 투과성이 낮거나, 항생제와 합성 억제제의 물성차이로 β -lactamase 억제제가 항생제를 보호하지 못하여 항생제와 병용사용 효과는 tazobactam보다 낮게 나타났다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 2008년도 중앙대학교 연구지원처 학술연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

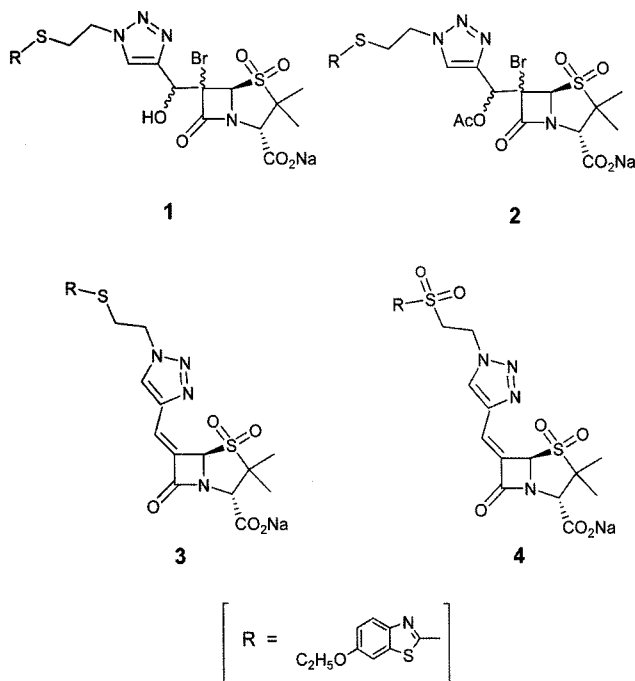


Fig. 1 – Structure of synthesized compounds.

참고문헌

- 1) Sandanayaka, V. P. and Prashad, A. S. : Resistance to β -lactam antibiotics: Structure and mechanism based design of β -lactamase inhibitors. *Current Med. Chem.* **9**, 1145 (2002).
- 2) Jacoby, G. A. and Archer, G. L. : New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Eng. J. Med.* **324**, 601 (1991).
- 3) Moland, E. S., Black, J. A., Ourada, J., Reisbig, M. D., Hanson, N. D. and Thomson, K. S. : Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3837 (2002).
- 4) Bennet, I., Broom, N. J. P., Bruton, G. S., Alvert, C., Clarke, B. P., Coleman, K., Edmondson, R., Edwards, P., Jones, D., Osborne, N. F. and Walker, G. : 6-(Substituted methylene)penems, potent broad spectrum inhibitors of bacterial β -lactamase. *J. Antibiotics* **44**, 331 (1990).
- 5) Mansour, T. S., Venkatesan, A. M., Bradford, P., Petersen, P. J. and Projan, S. J. : Tricyclic 6-alkylidene-penem β -lactamase inhibitors and β -lactam antibiotic combination for treatment of resistant infections. *U.S. Pat 2007027130 A1 20070201* (2007).
- 6) Venkatesan, A. M., Agarwal, A., Abe, T., Ushiroguchi, H., Yamamura, I., Ado, M., Tsuyoshi, T., Dos, S. O., Gu, Y., Sum, F. W., Lin, Y. I., Petersen, P. J., Yang, Y., Kumagai, T., Weiss, W. J., Shlaes, D. M., Knox, J. R. and Mansour, T. S. : Structure-activity relationship of 6-methylidene penems bearing 6,5 bicyclic heterocycles as broad-spectrum β -lactamase inhibitors : Evidence for 1,4-thiazepine intermediates with C7 R stereochemistry by computational methods. *J. Med. Chem.* **49**, 4623 (2006).
- 7) Plantan, I., Selic, L., Mesar, T., Stefanic, A. P., Oblak, M., Prezelj, A., Hesse, L., Andrejasic, M., Vilar, M., Turk, D., Kocijan, A., Prevec, T., Vilfan, G., Kocjan, D., Copar, A., Urleb, U. and Solmajer, T. : 4-Substituted trinems as broad spectrum β -lactamase inhibitors : Structure-based design, synthesis, and biological activity. *J. Med. Chem.* **50**, 4113 (2007).
- 8) Aronoff, S. C., Jacobs, M. R., Johenning, S. and Yamabe, S. : Comparative activities of the β -lactamase inhibitors YTR830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**, 580 (1984).
- 9) Fassand, J. R. and Prior, B. R. : Comparative *In vitro* activities of piperacillin-tazobactam and ticarcillin-clavulanate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1268 (1989).
- 10) Maddux, S. M. : Effects of β -lactamases mediated antimicrobial resistance: The role of β -lactamases inhibitors. *Pharmacother.* **11**, 40 (1991).
- 11) Smith, J. T., Hamilton-Miller, J. M. T. and Knox, R. : Bacterial resistance to penicillins and cephalosporins. *J. Pharm. Pharmacol.* **21**, 337 (1969).
- 12) Waley, S. G. : A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**, 789 (1974).
- 13) Ross, G. W., Chanter, K. V., Harris, A. M., Kirby, S. M., Marshall, M. J. and O'Callaghan, C. H. : Comparison of assay techniques for β -lactamase activity. *Anal. Biochem.* **54**, 9 (1973).
- 14) American national standards institute : *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically*. 2nd. NCCLS Document M7-A2. **10**, 1 (1990).