

Chloramphenicol과 解熱劑와의 Ester化合物에 관한 藥劑學的 研究 (I)

金正優·金鍾甲

中央大學校 藥學大學

(Received January 11, 1982)

Jung Woo Kim and Jong Kap Kim

College of Pharmacy, Chung Ang University, Secul 151, Korea

Pharmaceutical Studies on the Esterification of Chloramphenicol with Antipyretics (I)

Abstract—Chloramphenicol (CAF) was esterified with aspirin, naproxen and acetaminophen in order to develop new prodrugs which have double effect-antibiotic activity and antipyretic effect. Chloramphenicol acetylsalicylate (CAF-ASP), chloramphenicol naproxenate (CAF-NAX), and chloramphenicol acetaminophen succinate (CAF-SUC-ACET) were synthesized by using dicyclohexylcarbodiimide (D.C.C.) because of two hydroxyl group of chloramphenicol. Three synthetic prodrugs did not show bitterness and antibiotic activity in vitro, and were hydrolyzed in liver homogenate, but weren't in acid.

1947年 放線菌의 一種인 *Streptomyces venezuelae*에서 分離하여 臨床的으로 널리 使用되고 있는 chloramphenicol에 prodrug의 概念을 導入하여 보다 進歩된 prodrug를 開發하고자 본 研究에 着手하였다. 現在 開發된 chloramphenicol의 prodrug를 用途別로 살펴보면 苦味를 改善시킨 誘導體로는 long-chain fatty acid ester¹⁾ (palmitate, stearate, cinnamate 等), haloalkyl ester, phenyl ester²⁾, phosphite ester³⁾ 등의 ester化合物이 있고, 注射時 溶解性を 改善시킨 誘導體로는 chloramphenicol sodium succinate⁴⁾, chloramphenicol morpholine acetate⁵⁾가 있다. 또 遲效성을 目的으로 改善시킨 誘導體로는 皮下注射로 投與하는 monobis-(trimethylsilyl) ester⁶⁾가 있으며, 注射時 痛症을 減少시킨 誘導體로는 1-hemisuccinate sodium salt, 1,3-hemisuccinate disodium salt 또는 piperazine salt^{7,8)} 등이 있다.

그리고 amino acid인 arginine을 salt로 한 chloramphenicol monosuccinate arginine salt가 있으며 vitamine인 panthothenic acid를 ester로 한 chloramphenicol panthothenate salt 등이 prodrug으로 開發되어 있다.

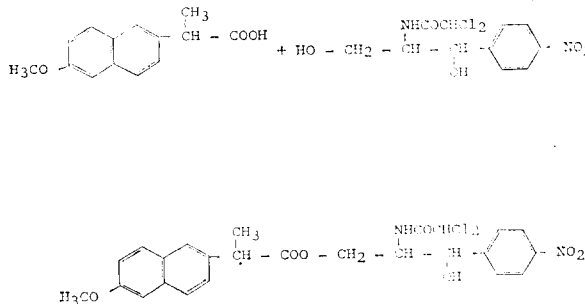
強한 苦味를 갖는 chloramphenicol에 다른 藥效를 갖고 있는 物質을 ester로 結合시키면 各各의 藥效를 나타내거나 相乘作用 또는 相加作用을 期待할 수 있다고 생각된다.

이러한 觀點에서 著者は chloramphenicol과 並用하여 使用할 수 있는 解熱·鎮痛·消炎劑인 aspirin, acetaminophen 및 naproxen을 ester linkage로 連結시켜 새로운 prodrug를 製造하여 實驗한 結果 知見을 얻었다.

實驗方法

試藥 및 原料—Dicyclohexylcarbodiimide은 日本 和光純藥의 것을, 4-(N,N-dimethylamino)pyridine은 Aldrich사의 제품을, chloramphenicol은 주식회사 종근당의 제품을 사용했고, aspirin은 Rhone Poulence의 것을, naproxen은 Syntex사의 제품을 사용했다. 또한 succinic anhydride은 Merck사의 것을, acetaminophen은 亞洲藥品의 것을 사용했다.

合成方法⁹⁻¹²⁾—1) Chloramphenicol Acetylsalicylic Acid Ester (I)의 合成 : chloramphenicol 0.1 mole을 100ml four-necked flask에 넣고 ethyl acetate 70ml를 加하고 0~5°C로 冷却시킨다음



로 再結晶하여 化合物 (I)을 얻는다(yield: 10%).

2) Chloramphenicol Naproxen Ester (II)의 合成 : 化合物 1)의 合成方法에 準하여 化合物 2)를 合成한다(yield: 20%).

3) Chloramphenicol Acetaminophen Succinate Ester (III)의 合成 : Acetaminophen succinic acid monoester를 만든 後 化合物 (I)의 合成方法에 準하여 化合物 (III)을 合成한다(yield: 30%).

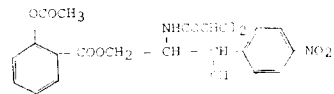
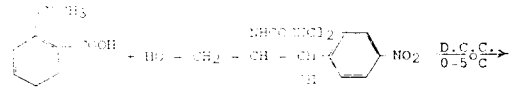
確認實驗¹³⁻¹⁷⁾—合成된 化合物은 元素分析, TLC, mp測定, λ_{max} 測定 實驗을 하였으며 그 結果는 Table I 과 같고 chloride 定性反應은 $AgNO_3$ 溶液을 加할 때 白色沈澱이 形成되었다.

化合物은 IUPAC方法에 따라 다음과 같이 命名하였다.

化合物(I): chloramphenicol acetylsalicylate (chloramphenicol-aspirin: CAF-ASP)

化合物(II): chloramphenicol d-2-(6-methoxy)-2-naphthyl propionate (chloramphenicol naproxenate: CAF-NAX)

化合物(III): chloramphenicol p-acetamidophenoxy carbonyl propionate (chloramphenicol-aceta-



dicyclohexylcarbodiimide(D. C. C) 0.1mole을 加하여 24時間 反應시킨다. 反應이 完了된 後 D.C.C.를 除去하고 10% $NaHCO_3$ 溶液과 1% HCl溶液으로 洗滌한다. 洗滌한 ethyl acetate層을 取하여 無水 Na_2SO_4 를 加하여 脫水시키고 減壓 濃縮한 後 methyl alcohol과 蒸溜水

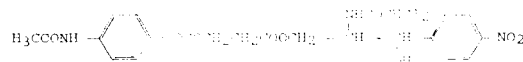
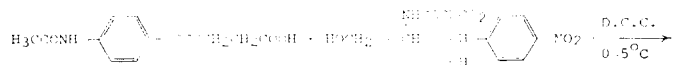
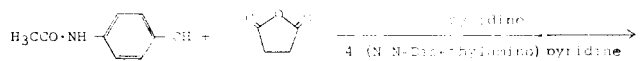


Table I—Properties of three prodrugs of chloramphenicol.

Products	mp (°C)	U.V. in EtOH	TLC (Rf)			Molecular weight Empirical	Elemental analysis (C, H, N) (%)
			Solvent I	Solvent II	Solvent III		
Chloramphenicol acetylsalicylic acid ester (I)	186~188	λ_{max} 270nm	0.91	0.66	0.87	485.27 $C_{20}H_{18}O_8Cl_2N_2$	C : 50.1 (49.5%) H : 3.5 (3.7%) N : 5.4 (5.8%)
Chloramphenicol Naproxen ester (II)	164~166	λ_{max} 273nm	0.95	0.89	0.94	535.38 $C_{25}H_{24}O_7Cl_2N_2$	C : 57.1 (56.3%) H : 5.0 (4.5%) N : 5.13 (5.3%)
Chloramphenicol acetaminophen succinate ester (III)	154~156	λ_{max} 245nm	0.68	0.14	0.53	556.36 $C_{23}H_{23}Cl_2N_3$	C : 51.0 (49.6%) H : 4.7 (4.1%) N : 7.87 (7.9%)

(): Theoretical %

Solvent I ; Ethyl acetate

Solvent II ; Ethyl ether

Solvent III ; Ethyl acetate: ethyl ether (1 : 1)

minophen succinate: CAF-SUC-ACET)

官能實驗(味覺實驗)¹⁸⁾—約 10mg의 檢體를 蒸溜水 100ml에 넣고 37°C에서 1時間 攪拌시킨 後 濾過하여 얻은 濾液으로 味覺實驗을 行하였다.

溶出實驗^{19,20)}—Sartorius dissolution simulator를 利用하여 溶出速度를 測定하였다.

分析方法—CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET中 chloramphenicol은 bioassay로 定量하였 으며 aspirin, naproxen, acetaminophen은 吸光度法으로 定量하였다.

加水分解²¹⁻²⁴⁾—1) 酸에 依한 加水分解 : Sartorius dissolution simulator를 使用하였으며 實驗條 件은 人工胃液(KPIII)과 pH 4.0 buffer (Clark-Lubs buffer) 100ml에 檢體(CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET, CAF-PAL) 50mg을 加하고 37±0.5°C에서 0.5, 1, 2, 3, 4 時間마다 檢液을 取 하여 0.45 μ membrane filter로 濾過한 後 濾液 2.0ml를 取하고 pH 7.0 buffer sol'n (Clark-Lubs buffer) 1.0ml를 加해 pH 6.0~7.0으로 調節하여 最終檢液으로 하여 bioassay方法으로 力價를 測 定하여 加水分解 有無를 確認하였다.

2) 酵素에 依한 加水分解 : pH 7.5 phosphate buffer와 pH 9.2 buffer sol'n (Clark-Lubs buffer) 50ml에 50mg의 檢體를 各各 넣고 pancreatin 飽和 水溶液 50ml를 加하여 實驗하였으며 實驗方法 은 酸에 依한 加水分解에 準하였고 最終檢液은 濾液 1.0ml에 pH 9.2 buffer (Clark-Lubs buffer) 1.0ml, 15% trichloroacetic acid 2.0ml, IN NaOH sol'n 1.5ml를 加하여 使用하였다.

3) 肝 Homogenate에 依한 加水分解²⁵⁻²⁷⁾ : 肝細胞 成分의 分割에 各檢體(CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET)의 檢液(CAF로서 320 μ g/ml)을 부피로 同量 加하여 混合한 液을 37°C에서 1 時間 培養시킨 後, 3000rpm으로 遠心分離하고 上層液을 取하여 檢體의 檢液을 phosphate buffer 로 2배로 稀釋한 液을 對照로 하여 *Micrococcus luteus* ATCC 9341에 對한 抗菌力을 agar diffusion cylinder method로 하여 對照 標準液과의 抑制環의 크기를 比較하여 肝細胞 成分의 分割에 依한 加水分解 與否를 檢討하였다.

4) 血液內에서의 加水分解 : 개에서 採取한 血液에 各檢體(CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-

ACET; CAF로서 320 μ g/ml)을 부피로 同量 加하여 混合한 液을 37°C에서 1時間 培養시킨 後 3000rpm으로 遠心分離하고 上層液을 取하여 檢液을 phosphate buffer로 2培로 稀釋한 液을 對照로 하여 *Micrococcus luteus* ATCC 9341에 對한 抗菌力을 agar diffusion cylinder method로 對照標準液과의 抑制環의 크기를 比較하여 血液內에서의 加水分解 與否를 檢討하였다.

實驗結果 및 考察

合成—Esterification에 對한 反應은 carboxylic acid와 alcohol의 反應이 一般的으로 利用되고 있다. chloramphenicol에서는 hydroxyl group이 2個 있는데 하나는 primary alcohol이고 다른 하나는 secondary alcohol이기 때문에 steric hindrance에 依한 反應性 差異가 있다고 生覺되어 可能한 限 緩和한 條件下에서 chloramphenicol과 p-toluenesulfonyl chloride와 pivaloyl chloride를 使用하여 mixed anhydride를 만든 naproxen과 aspirin을 反應시켜 esterification할 때는 選擇性이 없이 反應하였으나, dicyclohexylcarbodiimide(D.C.C.)를 利用하여 ethyl acetate下에서 反應시킬 때는 chloramphenicol의 primary alcohol인 hydroxyl group에 對해서 選擇적으로 反應하기 때문에 D.C.C.를 利用하여 chloramphenicol과 aspirin 또는 naproxen의 ester化合物을 合成하였고 chloramphenicol acetaminophen succinate ester의 合成은 chloramphenicol monosuccinate와 acetaminophen의 esterification, 그리고 acetaminophen monosuccinate와 chloramphenicol을 esterification하여 合成하였으나 이 때 前者의 反應은 acetaminophen의 hydroxyl group의 낮은 反應性때문에 反應이 잘 이루어지지 않았으며 이 때에는 mixed anhydride와 D.C.C.를 使用하였고 acetaminophen과 succinic anhydride를 反應시켰을 때도 역시 acetaminophen의 낮은 反應性 때문에 낮은 收率로 얻어졌으나 pyridine과 dimethyl amino pyridine을 觸媒로 使用하므로써 높은 收率을 얻을 수 있었다.

Table II—Intensities of bitter taste of CAF and its prodrugs.

Samples	Taste
Chloramphenicol(CAF)	+++++
CAF-Palmitate(CAF-PAL)	—
CAF-ASP(I)	—
CAF-NAX(II)	—
CAF-SUC-ACET(III)	—

*+: bitter —: bitterless

官能實驗(味覺實驗)—Table II에 表示한 바와 같이 生成物 (I), (II), (III)의 境遇 生成物 (I)은 aromatic ring을 包含하는 carbon數가 9個, (II)는 14個, 그리고 (III)은 12個인 group이 結合되어 있는데 모두 chloramphenicol palmitate(CAF-PAL)와 마찬가지로 苦味를 나타내지 않았다.

溶出速度—3個의 檢體인 CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET의 溶出速度를 phosph-

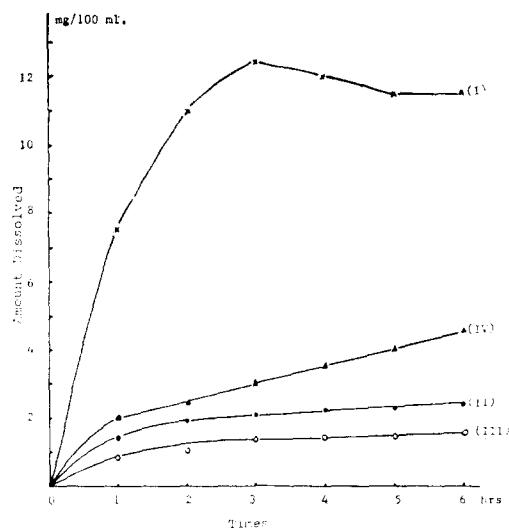


Fig. 1—Dissolution rate of CAF-ASP(I), CAF-NAX(II), CAF-SUC-ACET(III) and CAF-PAL [(IV), non-polymorph A] in pH 7.5 phosphate buffer at 37 \pm 0.5°C. I. CAF-ASP, II. CAF-NAX, III. CAF-SUC-ACET, IV. CAF-PAL

ate buffer (pH 7.5), $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 測定한 結果, 溶出速度는 Fig. I에서와 같이 CAF-ASP > CAF-NAX > CAF-SUC-ACET의 順으로 나타났으며 約 6時間 經過後 溶解度를 보면 CAF-ASP가 11.5mg/100ml, CAF-NAX가 2.2mg/100ml, CAF-SUC-ACET가 1.5mg/100ml의 溶解度를 보였다. 또한 比較實驗한 CAF-PAL의 溶出速度는 CAF-ASP보다 작고 CAF-NAX보다는 컸으며 6時間後의 溶解度는 4.5mg/100ml이 었다.

加水分解—1) 酸 및 酵素에 依한 加水分解: 먼저 胃腸管에서 加水分解 與否를 檢討하기 爲하여 acid hydrolysis와 人工胃液에서의 加水分解를 檢討하였으나 CAF-SUC-ACET에서는 酸 加水分解가 일어나 遊離 chloramphenicol이 되어 抗菌力을 나타내나 그 以外の CAF-ASP, CAF-NAX에서는 加水分解가 일어나지 않았으며 또 long chain fatty acid의 ester인 chloramphenicol palmitate가 消化管内의 lipase인 pancreatic lipase에 依해서 enzyme hydrolysis가 일어나는 것과 같은 機轉에 依한 加水分解 與否도 檢討하였으나 亦是 pancreatic lipase에 依한 加水分解는 일어나지 않았다.

물에 溶解하는 藥物에는 作用하지 않는 pancreatic lipase는 palmitic acid ester로 되어있기 때문에 hydroxyl activity가 크므로해서 palmitic acid ester를 迅速히 加水分解시키며 short chain fatty acid ester는 一般的으로 물에 잘 溶解하는 反面 long chain ester ($C_{10} \sim C_{18}$)는 micelle을 形成하는 傾向이 있으므로 short chain fatty acid ester보다 훨씬 容易하게 加水分解가 일어난다.

이와같은 理由로 이들 prodrug는 microsome에서 發見되는 또 다른 lipase인 enzyme에 依해 加水分解가 일어난다고 豫測할 수 있다.

이와 같은 結果를 圖表로 나타내면 Table III, IV와 같다.

Table III—Acid hydrolysis of four prodrugs of chloramphenicol.

Condition	Sample	times	30min.	1hr.	2hr.	3hr.	4hr.
pH 4 buffer sol'n	CAF-ASP	—	—	—	—	—	—
	CAF-NAX	—	—	—	—	—	—
	CAF-SUC-ACET	—	—	—	19.2	16.8	15.1
	CAF-PAL	—	—	—	—	—	—
artificial gastric juice	CAF-ASP	—	—	—	—	—	—
	CAF-NAX	—	—	—	—	—	—
	CAF-SUC-ACET	—	—	—	17.6	16.8	16.8
	CAF-PAL	—	—	—	—	—	—

unit; $\mu\text{g/ml}$ —; non-hydrolysis

Table IV—Enzyme hydrolysis of four prodrugs of chloramphenicol in pH 7.5 phosphate and pH 9.2 Clark-Lubs buffer.

Sample	pH 7.5	pH 9.2
CAF-ASP	—	—
CAF-NAX	—	—
CAF-SUC-ACET	—	—

*—; non-hydrolysis

2) 肝 Homogenate에 依한 加水分解: prodrug 自體는 *Micrococcus luteus* ATCC 9341에 對해서는 抗菌力을 나타내지 않으나 遊離狀態의 chloramphenicol이 存在할 境遇에는 抗菌力을 나타낸다. 이에 prodrug를 肝 homogenate와 作用시킨 後 *Micrococcus luteus* ATCC 9341에 依한 實驗한 結果 抑制環을 나타내고 prodrug 그

Table V—Inhibition zone of three prodrugs of chloramphenicol against *Micrococcus luteus* in liver homogenate and blood.

Prodrug	Items	Liver homogenate	Blood
CAF-ASP	STD	11.9*	12.1*
	BL	—	—
	SA	11.5	—
CAF-NAX	STD	12.4	12.8
	BL	—	—
	SA	11.3	—
CAF-SUC-ACET	STD	12.1	12.1
	BL	—	—
	SA	11.5	13.2

STD: relative standard solution (chloramphenicol 10mcg/ml)

BL : 2 times diluted buffer of sample solution

SA : mixtures of liver homogenates or blood and sample solution

* : mean of 4 times

自體는 抗菌力을 나타내지 않았다. 이로 미루어 보아 이들 物質은 肝의 esterase에 의해 加水分解가 일어남을 알 수 있었으며 이 때 나타난 抗菌力抑制環은 Table V와 같다.

3) 血液內에서의 加水分解: 血液內에서의 加水分解를 檢討하여 보면 CAF-ASP, CAF-NAX와 같이 chloramphenicol에 直接 esterification시킨 것은 加水分解가 일어나지 않는 反面 CAF-SUC-ACET와 같이 chloramphenicol에 bridge로 aliphatic acid인 succinic acid를 linkage시켜 esterification시킨 것에서는 抗菌力을 나타내었다.

이것은 靜脈注射로 使用되는 chloramphenicol succinate sodium salt처럼 血液內에서의 遊離 chloramphenicol로 加水分解되어 抗菌力을 나타내듯이 CAF-SUC-ACET은 胃液에서 一部 加水分解가 일어나고 그 大部分은 吸收되어 肝으로 移行되고, 이곳에서 肝內의 esterase에 의해 chloramphenicol과 acetaminophen succinate로 一經 加水分解된 後 다시 血液으로 移行되어 血液에서 acetaminophen succinate가 acetaminophen과 succinic acid로 加水分解됨을 推定할 수 있다. 血液에서의 加水分解에 의한 抗菌力抑制環을 나타낸 것도 前述한 Table V와 같다.

結 論

苦味의 chloramphenicol을 改善한 prodrug를 開發하기 爲해 一般的으로 long chain fatty acid를 가지고 esterification시키는 것 代身에 解熱·鎮痛·消炎作用을 나타내는 aspirin, naproxen 및 acetaminophen을 가지고 esterification시켜 抗菌作用 以外에 解熱·鎮痛 및 消炎作用까지 期待할 수 있는 prodrug를 合成하여 實驗한 結果는 다음과 같았다.

1. 合成한 prodrug는 그 自體의 抗菌力을 나타내지 않았으며 物質의 物性中 改善의 主目的인 苦味는 ester化에 의해 無味로 改善되었다.

2. 合成한 prodrug의 溶出速度는 CAF-ASP > CAF-NAX > CAF-SUC-ACET의 順이었다.

3. 動物實驗結果 이들 prodrug는 生體에 投與되면 acid 및 alkali hydrolysis 또는 消化管內

enzyme에 의한加水分解없이 一旦 消化管을 통해 吸水되어 肝 homogenate (microsome)에서 加水分解가 일어나는 것으로 밝혀졌고 그 結果 遊離 chloramphenicol이 *Micrococcus luteus*에 對한 antimicrobial activity를 나타내었다.

文 獻

1. A.Z. Glazko, W.H. Edgerton, W.A. Dill and W.R. Lenz, *Antibiot. Chemoter.* 2, 234 (1952).
2. Sumitomo Chemical Co. Ltd, West German Pat. 2,244,179 (1973).
3. E.P. Taylor: *J. Pharmacol.* 5, 254 (1953).
4. A.J. Glaxko, W.H. Edgerton, W.A. Dill, W.R. Lenz, *Antibiot. Chemoter* 2, 234 (1952).
5. 中澤昭三: 抗生物質의 基礎知識 (1972) 南山堂 東京.
6. R.L. Houtman, U.S. Pat. 3,442,926 (May 6, 1969).
7. A.J. Glaxko, H.E. Garmes, A. Kazenko, L.M. Wolf and T.F. Reutner, *Antibiot. Ann.*, p. 792 (1957~1958).
8. S. Roxx, J.R. Puig, E.A. Earemba, *Antibiot. Ann.* p. 803 (1957~1958).
9. N.L. Allinger, M.P. Cava, D.C. De Jongh, C.R. Johnson, N.A. Label, and C.L. Stevens. *Organic Chemistry* (1971).
10. G. Hallas, *J. Chem. Soc.*, 5770 (1965).
11. A. Stempel and F.W. Landgraf, *J. Drug Chem.*, 27, 4675 (1962).
12. O.O. Crazi, and R.A. Corral, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 2162 (1962).
13. D.L. Pavia, G.M. Lampman, and G.S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy* (1979).
14. John R. Dyer, *Application of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds* (1978).
15. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, and T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* (3rd ed: 1974).
16. D.J. Creswell, O.A. Runquit, and M.M. Campbell, *Spectral Analysis of Organic Compounds* (1972).
17. 日本分析化學會編, 分析化學便覽改訂二版 (1971) 丸善株式會社.
18. G. Vita, I. De Carneri, G. Bucher, and G. Coppi, *Antibiot. Chemoter.* 12, 22 (1962).
19. L.J. Lesson and J.T. Carstensen, *Dissolution Technology* (1974).
20. J.T. Carstensen, *Pharmaceutics of Solids and Solid Dosage Forms* (1977).
21. Andersgward and P. Finholt, *Acta Pharm. Suecica.*, 11, 239 (1974).
22. A.J. Glazko, W.A. Dill, A. Kazenko, L.M. Wolf, and H.E. Carnes, *Antibiot. Chemoter.* 8, 516 (1958).
23. S. Banerjee, K. Chakraharti, and A.K. Haldar, *J. Pharm. Sci.* 62, 1841 (1973).
24. Japan Pat., 48-13105 (1973).
25. 岩本多喜男, くすりと臨床一處方. 投藥の理論と實際 (1970) 廣川書店 東京.
26. 津田恭介, 野上壽, 醫藥品と生化學(2), (1972), 地人書店, 東京.
27. 大禁義仁, 織田敏次, 藥の吸收, 排泄—基礎と臨床—(1970) 廣川書店, 東京.