

7 β -Diphenyl Triazolyl Thioacetamidocephalosporin 의 합성과 항균작용

김영수 · 고옥현 · 강형룡
조선대학교 약학대학
(Received January 12, 1990)

Synthesis and Antimicrobial Activity of 7 β -Diphenyl Triazolyl Thioacetamido Cephalosporin

Young Soo Kim, Ok Hyun Ko and Hyung Ryong Kang
Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University

Abstract — 7 β -[4-Phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thioacetamidocephalosporanic acid was synthesized by condensation of 7-Aminocephalosporanic acid (7-ACA) with [4-Phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl] thioacetylchloride. This compound was tested for antimicrobial activity *in vitro* against nine species of microorganisms. It showed remarkable antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, and *Staphylococcus aureus*.

1945년 Brotzu¹⁾에 의하여 Cephalosporin C가 발견되었고 Morin²⁾ 등에 의하여 Cephalosporin C의 결가지 amide 결합을 가수분해하여 7-ACA가 얻어진 후 이들의 C-7 위치의 결가지를 변화시키거나 C-3 위치의 acetoxy기를 여러 가지 기로 바꾸어 구조와 항균력의 상관관계를 연구함으로써 지금까지 광범위 항균력을 가진 항생물질들이 개발되어 왔다. Cephalosporin계 항생물질의 작용기전은 세포의 세포벽 구성성분인 peptidoglycan의 cross link에 작용하는 효소인 transpeptidase와 결합함으로써 이의 작용을 억제하여 세포벽 합성을 저해³⁾하는 것으로 알려져 있다. 본 저자들은 새로운 항균제를 개발할 일환으로 triazole ring을 갖고 있는 물질이 항염증작용⁴⁻⁹⁾이 있다는 보고에 따라 약리활성이 기대되는 4-[Phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl] thioacetic acid를 합성하고, 이것을 Vilsmeier Reagent^{10,11)}로 acylchloride를 합성하였다. 한편, 7-ACA의 Carboxylic acid를 HMDS로 Silylation하여 acylchlor

ide와 반응시켜 7 β -[4-phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl] thioacetamidocephalosporanic acid를 합성하여 Gram 양성균 5종 (*Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA-209 P), Gram 음성균 3종 (*Echerichia coli* ESS, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13130, *Salmonella typhimurium* SL 1102), 진균 1종 (*Candida albicans* ATCC 10231)에 대하여 항균력 시험을 하였다.

실 험

시약

3,4,5-Trimethoxybenzoic acid, Hydrazine Hydrate, Phenylisothiocyanate, Ethylbromacetate, Hexamethylenedisilazane (HMDS) 과 Dimethylaniline (DMA)는 각각 Aldrich Co.

시약을, Dimethylformamide(DMF)는 Tedia Co. 제품을 증류하여 사용하였으며, Ethanol, Acetone은 Fluka Co. 제품을 7-ACA는 시중 제약 회사에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 Sulfuric acid, Sodium Hydroxide, Hydrochloric acid, Dichloromethane 및 Phosphorus Oxychloride는 각각 純正化學, 化學純藥 林純藥工(株) 등의 특급 혹은 일급시약을 사용하였다.

기기

Thin Layer Chromatography(TLC)는 Kieselgel 60 F₂₅₄를, 용점측정은 Gallen-Kamp melting point apparatus를, FT-Infrared Spectra는 Bruker IFS 66를, Nuclear Magnetic Resonance(NMR)는 Bruker FT-80형을 사용하여 Tetramethylsilane(TMS)를 내부 표준물질로 사용하여 Dimethylsulfoxide-d₆(DMSO-d₆)를 용매로 사용하였다. Element Analysis(Comp.4, 6)은 Carlo-Erba Auto CHNS-O, EA1108-Element Analyzer를 사용하였다.

Ethyl 3,4,5-Trimethoxybenzoate(1)-3,4,5-Trimethoxybenzoic acid 63.44g(0.3 mole), H₂SO₄ 6 ml, 무수 EtOH 300 ml을 수욕상에서 20시간 환류시켰다. 반응물을 감압농축하여 용매를 제거하고 냉각하여 생성된 결정을 여과하였다. 빙수로 세척하여 건조하고 EtOH로 재결정하여 백색의 결정 55.98g(78%)를 얻었다. mp. 58~59°C (lit.¹² 60°C)

FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1709(C=O).

NMR(DMSO-d₆) δ : 1.39(t, 3H, -CH₂CH₃), 3.92(s, 3H, 4-OCH₃), 3.90(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 4.37(q, 2H, -CH₂CH₃), 7.30(s, 2H, C₆H₂)

3,4,5-Trimethoxybenzoic acid Hydrazide(2)-Comp.1, 56.56g(0.25 mole), Hydrazine hydrate 20g(0.4 mole), 무수 EtOH 100 ml을 10시간 환류시키고 과량의 EtOH를 감압농축하여 제거하고 냉각하여 생성되는 결정을 여과하였다. EtOH를 재결정하여 백색의 결정 29.8g(89.5%)을 얻었다. mp. 155~156°C (lit.¹² 157°C)

FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1660(C=O), 3198(-NH), 3333(NH₂)

NMR(DMSO-d₆) δ : 3.71(s, 3H, 4-OCH₃), 3.82(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 7.17(s, 2H, ArH), 9.69(s,

1H, -CONH-)

1-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)-4-phenyl-3-thiosemicarbazide(3)-Comp.2 22.6g(0.1 mole), Phenylisothiocyanate 13.5g(0.1 mole) 및 무수 EtOH 25 ml을 5시간 환류시키고 과량의 EtOH를 감압농축하여 제거하여 생성된 결정을 건조하고 EtOH로 재결정하여 백색결정 29.24g(81%)를 얻었다.

mp. 189°C (lit.¹² 188°C)

FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹, 995(C=S), 1628(C=C), 1663(C=O), 3167, 3279, 3321(-NH-).

NMR(DMSO-d₆) δ : 3.73(s, 3H, 4-OCH₃), 3.85(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 7.23~7.55(m, 7H, C₆H₂ and ArH), 9.79(BrS, 1H, -CONH-), 10.40~10.60(s, 2H, -NH-CS-NH-)

4-phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol(4)-Comp.3 36.14g(0.1 mole), 2N-NaOH 200 ml을 수욕상에 3시간 환류시켰다. 반응물을 냉각하고 진한 HCl로 pH 2가 되도록 산성화시켜 결정을 얻었다. EtOH로 재결정하여 백색결정 18.6g(63%)을 얻었다. mp. 210~212°C (lit.¹² 210~211°C)

FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 1593(C=C, C=N)

NMR(DMSO-d₆) δ : 3.54(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 3.65(s, 3H, 4-OCH₃), 6.59(s, 2H, C₆H₂), 7.39~7.5(m, 5H, ArH)

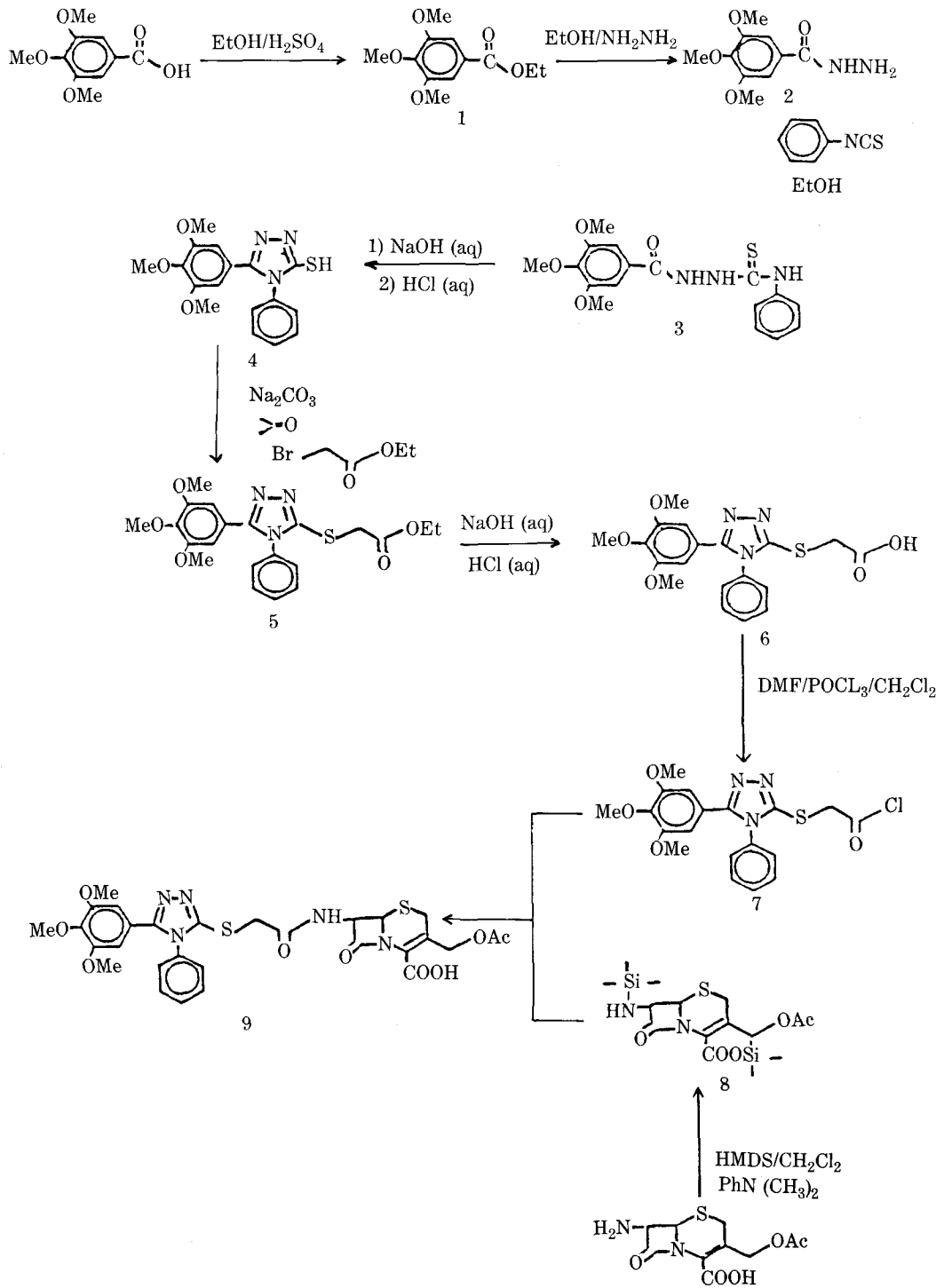
Anal. Calc. C: 59.45, H: 4.99, N: 12.23, S: 12.33

Found. C: 58.87, H: 4.66, N: 12.06, S: 9.70

Ethyl-[4-phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl] thioacetate(5)-Comp.4 4.43g(0.015 mole), Ethylbromoacetate 2.5g(0.015 mole), 무수 K₂CO₃ 3g 및 무수 Acetone 60 ml을 8시간 환류시켰다. 반응물을 냉각하여 생성된 KBr을 여과하여 제거하였다. 용매를 감압농축하여 제거하고 생성된 결정을 EtOH로 재결정하여 백색결정 4.8g(75%)을 얻었다. mp. 135~136°C (lit.¹² 137°C)

FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$, 1732(C=O), 1598(C=C, C=N).

NMR(DMSO-d₆) δ : 1.20(s, 3H, -CH₃), 3.45(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 3.64(s, 3H, 4-OCH₃), 3.64(s, 2H, -S-CH₂-), 3.69(q, 2H, -CH₂CH₃), 6.64



Scheme I.—Route of synthesis.

(s, 2H, C₆H₂), 7.38-7.65(m, 5H, ArH).

[4-phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl] thioacetic acid(6)—Comp.5 0.5g(1.16 mmole), 2N-NaOH 5ml을 4시간 환류시켰다. 뜨거운 용액을 HCl로 pH2로 산성화하여 생성된 결정을 여과하고 EtOH로 재결정하여 백색결정 0.46g(98%)을 얻었다. mp. 201~203°C (lit.¹³⁾ 202~204°C)

FT-IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ 1724(C=O)

NMR(DMSO-d₆) δ : 3.55(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 3.65(s, 3H, 4-OCH₃), 4.03(s, 2H, S-CH₂-), 6.64(s, 2H, C₆H₂), 7.50~7.65(m, 5H, ArH)

Anal. Calcd. C: 56.84, H: 4.77, N: 10.46, S: 7.98

Found. C: 56.57, H: 4.74, N: 10.51, S: 8.54

7 β -[4-phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl] thioacetamidophalosporanic acid(9)—DMF 60 mg(0.82 mmole), CH₂Cl₂ 5ml의 혼합용액을 -10~0°C로 냉각하고 교반하면서 syringer로 POCl₃ 0.13g(0.82 mmole)를 가하였다. 이 용액에 Comp.6 0.3g(0.74 mmole)를 가하고 실온에서 8시간 교반하였다(7용액).

7-ACA 55 mg(0.75 mmole)을 CH₂Cl₂ 10ml로 현탁시키고 HMDS 120 mg(0.75 mmole)을 syringer로 가하여 외부와의 공기를 차단하고 8시간 수욕상에서 환류시켜 얻은 용액을 0~5°C로 냉각 후 DMA 0.045 mg(0.75 mmole)을 가하였다. DMA·HCl 미량을 가하여 pH6으로 중화시켰다(8용액).

7용액을 syringer를 사용하여 8용액에 가하고 12시간 교반하였다. 이 용액을 감압하여 용매를 제거한 후 냉각하면서 잔사에 빙수 약 50ml을 가하여 10분간 교반한 후 냉각하여 생성된 결정을 여과하였다. 물로 세척하여 주황색을 결정 0.22g(44.2%)을 얻었다. mp. > 200°C

FT-IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ 1760(β -Lactam.), 1670(-CONH-)

NMR(DMSO-d₆) δ : 2.03(s, 3H, -COCH₃), 3.43(s, 2H, gem, H), 3.59(s, 6H, 3 and 5-OCH₃), 3.72(s, 3H, 4-OCH₃), 4.15(s, 2H, S-CH₂), 4.82(s, 2H, -CH₂OAC), 4.97(s, 1H, C₆H), 5.20(d, 1H, C₇

H), 6.76(s, 2H, C₆H₂), 7.44-7.74(m, 5H, ArH), 8.55(s, 1H, -CONH-)

항균력 실험

시험균주—*Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ESS, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13130, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA-209p, *Salmonella typhimurium* SL 1102.

Escherichia coli ESS 균주는 Cepharmycin C에 고도의 감수성을 갖는 변이주로서 M.I.T의 Demain 교수로부터 분양받았으며, *Salmonella typhimurium* SL 1102 균주는 S. typhimurium TV 119를 모균주로 한 penicillin 감수성의 변이주이며 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 균주는 penicillin에 다소한 내성을 갖는 균주이다. E. coli ESS를 제외한 8개의 균주는 KIST 유전공학센터에서 분양받았다.

배지—Brain heart infusion 30g, Peptone 5g, MgSO₄·7H₂O 1g/ml

위의 조성으로 이루어진 배지를 사용하였음, 고체 평판배지 제조시는 Bacto agar 20g을 액체배지 1l에 첨가하였다.

항균활성 측정법

시험균의 전배양—*Candida albicans*를 제외한 8개균의 액체배지에서 37°C, 24시간 진탕배양하였으며, 진균인 C. albicans는 30°C, 48시간 진탕배양하여 사용하였다.

검정 plate의 제조—각각의 항균제를 DMF 0.3% (v/v) 함유한 phosphate buffer(1% w/w. pH 6) 1ml에 녹힌 후 2단계 희석법으로 10차례 희석하여 한천배지 14ml과 섞었을 때 최종 배지내의 항균제의 농도가 각각 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하였다.

배지를 상온에서 굳힌 후 사용하였다. 대조용 배지는 항균제가 들어있지 않는 0.3% DMF 함유 phosphate buffer 1ml을 한천배지 14ml과 섞어서 사용하였다.

항균력 판정—각각의 시험균주들을 검정 plate에 접종한 것을 37±2°C에서 18시간 배양 후 2배씩 단계적으로 희석하여 접종한 plate를 일렬로 나열

Table I—MICs ($\mu\text{g/ml}$) of synthetic compound and commercial antibiotics against representative microorganisms

Strains	Compound	No.9 ^a	Cephra-dine	Cefa-zoline
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580		>40	2.5	5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		10	0.31	0.16
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		>40	>40	>40
<i>Escherichia coli</i> ESS		>40	10	0.625
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341		10	0.31	0.625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130		>40	>40	>40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		20	40	0.16
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA-209p		20	10	0.31
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102		>40	40	5

^a No.9: 7β-[(4-phenyl-5-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio] acetamido cephalosporanic acid

하여 육안으로 관찰하여 성장이 억제된 항균제의 최소 발육저지 농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 정하였다.

Table I에서 보는 바와 같이 합성한 화합물은 대조물질로 사용한 Cephalosporin 계의 화합물인 Cephradine, Cephazoline 과 비교하여 일반적으로 항균력이 다소 약하였으나 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* 및 *Staphylococcus aureus* 균주들에 대하여 최소 발육저지농도(MIC)가 각각 10, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 보아 gram-positive 세균들에 대해서는 항균력이 대체적으로 양호함을 알 수 있었다. Gram-negative 세균인 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* 및 *Salmonella typhimurium* 균주들은 합성한 화합물에 강한 저항성(MIC: 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상)을 보여주었는데, 이러한 결과는 Cephalosporin 계의 항생제가 gram-positive 세균에 비하여 gram-negative 세균에 대한 항균력이 떨어지는 양상과 일치하였다. 한편 Cephalosporin 계의 항생제가 진균류에 대하여 감

수성을 보이지 않는 것처럼 합성한 화합물도 진균인 *Candida albicans* 에 대해서는 감수성을 보여주지 않았다.

감사의 말씀

항균력 시험에 협조해주신 유진철 교수님께 감사를 드립니다.

문헌

- 1) G. Brotzu: *Lavori dell'istituto D'Igiene di Cagliari* (1948).
- 2) R.B. Morin, B.G. Jackson and E.H. Flynn: *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3400 (1962).
- 3) D.J. Tipper and J.C. Strominger: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3169 (1968).
- 4) G. Pellizzari and C. Massa: *J. Chem. Soc.*, **80**, 488 (1901).
- 5) C. Ainsworth, N.R. Easton, M. Livezey, D.E. Morrison and W.R. Gibson: *J. Med. Chem.*, **5**, 383 (1962).
- 6) T. George, D.V. Mehta, R. Tahilramani, J. David and P.K. Talwalkar: *ibid.*, **14**, 335 (1971).
- 7) S.S. Parmer, A.K. Gupta, T.K. Gupta and H.H. Singh: *ibid.*, **15**, 999 (1972).
- 8) S. S. Pumer, V.K. Rastogi and A. Chaudhari: *Can. J. Pharm. Sci.*, **9**, 109 (1974).
- 9) Jaiswal, R.K. Parmar, S.S. Sigh, S.P. Barthwal, J.P.: *J. Heterocycl. Chem.*, **16**, 561-565 (1979).
- 10) Takao Takaya, Hisashi Takasugi, Takashi Masugi, Toshiyuki Chiba, Hiromu Kochi, Tadayoshi Takano and Hiroshi Nakano: *Chem. Soc. Japan*. No. 5, 785-804 (1981).
- 11) J.S. Park, K.Y. Kim and E.K. Ryu: *Yakhak Hoeji*, **32**(4), 222-229 (1988).
- 12) a) R.K. Jaiswell, S.S. Parmer, S.P. Singh and J.P. Barthwal: *J. Heterocycl. Chem.*, **16**, 561 (1979).
b) J.R. Maxwell, D.A. Wasdahl, A.C. Wolfson and V.I. Stenberg: *J. Med. Chem.*, **27**, 1565 (1984).
- 13) J.R. Maxwell, D.A. Wasdohl, A.C. Wolfson and V.I. Stenberg: *J. Med. Chem.*, **27**, 1565 (1984).