Journal of the Pharmaceutical Society of Korea
8, 1—5 (1964)

Ester 型 Chloramphenicol 의 生體內 代謝에 對하여

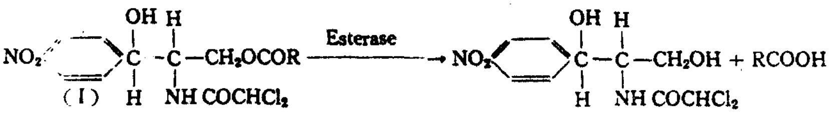
韓 秉 勳*

(Received January 20, 1964)

Byung Hoon Han: Metabolic fate of chloramphenicol-ester

Present experiment *in vivo* shows that some conversions of active groups in chloramphenicol residue of ester, that is hydrolytic cleavage of dichloracetamide and glucuronide formation, seem to take place prior to hydrolysis. This result suggest that the enzymatic hydrolysis rate *in-vitro*, is not available as an index for the evaluation of the chloramphenicol ester potency.

Chloramphenicol ester 類(CM-ester)는 生體內에서 esterase 等의 酵素作用으로 chloramphenicol 가 遊離되어야 그 抗菌活性을 發顯하게 됨으로 (I)의 抗菌效率을 評價하기 爲하여서는 ester 의 加水分解率[1-3]을 測定하는 것이 하나의 方法으로 되어 있다.



(I)

그러나 CM-ester 類의 生體內 代謝產物로서 尿中에 排泄될 可能性이 있는 16種에 (Table I) 걸친 代謝產物中 No. 3. 5. 7. 9. 11. 13. 15와 같은 物質은 ester 結合의 加水分解에 先行하여 dichloracetamide 結合의 分解, glucuronide의 形成 또는 nitro 基의 還元等으로 그 活性[4-7]을 消失하고 따라서 esterase에 依하여 加水分解되어도 如前히 Table I의 No. 4. 6. 8. 10. 12. 14, 16과 같은 不活性인 物質이 遊離될 것임으로 加水分解率의 測定만으로 CM-ester 類의 抗菌效率을 評價하는 것은 合理的인 方法이라고는 할 수 없을 것이다. 生體內에 前記한 代謝產物이 實際로 生成된다면 I類의 抗菌效率 評價를 爲하여는 加水分解率뿐만이 아니라 以上 論及한 事實을 考慮해야만 合理的이라고 할 수 있을 것이다. 이런 見地에서 著者는 chloramphenicol-succinate를 靜脈注射한 家兎의 尿中에서 ester 結合의 加水分解에 先行하는 dichloracetamide 結合의 分解體 및 glucuronide 等의 代謝產物을 實證코저 하였으며 豫期한 結果을 얻었기에 報告코저 한다. 本研究를 施行함에 있어 指導하여 주신 韓龜東 博士께 衷心으로 感謝하는 바이다.

*Graduate School, Seoul National University, Seoul, Korea

TABLE I.

Formula No.	Formula	Formula No.	Formula
1.	NO_2-ϕ-CH(OH)-CH(NH-CO-$CHCl_2$)-CH_2-O-R_1	2.	NO_2-ϕ-CH(OH)-CH($NHCOCHCl_2$) CH_2OH
3.	NO_2-ϕ-CH(OH)-CH(NH_2)- CH_2OR_1	4.	NO_2-ϕ-CH(OH)CH(NH_2)CH_2OH
5.	NO_2-ϕ-CH(OR_2)-CH(NH_2)CH_2OR_1	6.	NO_2-ϕ-CH(OR_2)CH(NH_2)CH_2OH
7.	NO_2-ϕ-CH(OR_2)-CH($NHCOCH Cl_2$)-CH_2-OR_1	8.	NO_2-ϕ-CH(OR_2)-CH($NHCOCHCl_2$)-CH_2OH
9.	NH_2-ϕ-CH(OH)-CH($NHCOCHCl_2$)-CH_2-OR_1	10.	NH_2-ϕ-CH(OH)-CH($NHCOCHCl_2$)-CH_2OH
11.	NH_2-ϕ-CH(OR_2)-CH($NHCOCHCl_2$)-CH_2-O-R_1	12.	NH_2-ϕ-CH(OR_2)-CH($NHCOCHCl_2$)-CH_2OH
13.	NH_2-ϕ-CH(OR_2)-CH(NH_2)CH_2OR_1	14.	NH_2-ϕ-CH(OR_2)-CH(NH_2)-CH_2OH
15.	NH_2-ϕ-CH(OH)CH(NH_2)CH_2OR_1	16.	NH_2-ϕ-CH(OH)-CH(NH_2)CH_2OH

R_1 : -CO-CH_2·CH_2·COOH　　　R_2 : Glucuronic acid residue

ϕ :

實　　驗

1. 檢體尿의 採取.——體重 1.5 kg 의 家兎耳靜脈으로 CM-succ (0.44 gm/kg)의 20 % 水溶液을 12 時間 間隙으로 6 回 注射하고 第 1 回 注射 4 時間後부터 3 日間 約 200 cc 의 尿를 採取하여 卽時 遠沈하고 其 上澄液을 檢體로 하였다.

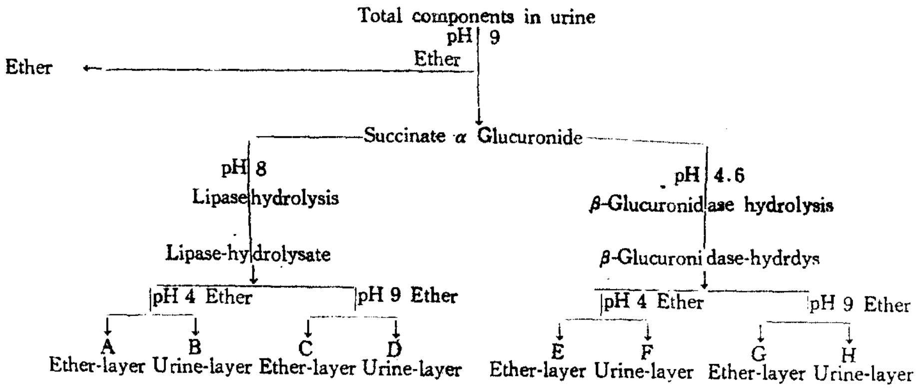
2. 尿中 Alkali 鹽 不形成物質의 除去.—檢體尿에 $\frac{N}{10}$ NaOH 를 加하여 pH 9 로 調節하고 4 時間동안 0°C 에서 Ether 로 連續抽出하여 Table I 의 No. 2, 4, 10, 16 (Alkali 鹽 不形成의 物質)만을 除去하였다.

3. Lipase hydrolysate 의 Fractionation.——實驗 (2)에서 얻은 尿를 2 等分하고 그 一部

分을 pH 8로 調節하고 다시 小量의 $NaHCO_3$를 加한 다음, 소의 膵藏에서 常法으로 抽出한 lipase의 glycerine 溶液 10 cc를 加하고 37°C에서 12時間 incubate하여 ester 結合만을 加水分解시켰다. 이를 2等分하여 其 一部는 pH 4로 調節하고 나머지 一部는 pH 9로 調節한 다음에 各各을 實驗 (2)에서와 같이 ether로 抽出하여 4個分劃으로 하고 各 ether 分劃은 ether을 蒸發시킨 殘渣를 10 cc의 ethanol에 溶解하였다. 別途로 家兎에 phenolphthalein을 內服시킨 다음의 尿에 lipase를 作用시켜 $\frac{N}{10}$ NaOH 1滴을 加했을 때 赤色이 나타나지 않는 것으로 보아서 β-glucuronidase 活性은 없음을 確認하였다.

4. β-Glucuronidase-hydrolysate의 Fractionation.——實驗 (2)에서 얻은 尿를 2等分한 나머지 一部分은 pH 4.6으로 調節하고 소의 肝에서 抽出한[8] β-glucuronidase 溶液 10 cc를 加하고 37°C에서 12時間 incubate하여 glucuronide 結合만을 加水分解하고 (β-glucuronidase의 酵素活性은 實驗 (3)의 方法에 依하여 確認하였다.) 酵素分解産物을 實驗 (3)과 同一한 法으로 分劃하여 4個分劃으로 하였다. 以上 分劃을 表示하면 Table II와 같다.

TABLE II.—fractionation



5. 各分劃에 對한 總 Chloramphenicol 代謝産物의 定量—0.5 %—Chloramphenicol를 standard로 하고 各分劃物 1 cc式 取해서 Puga[9] 法으로 總 chloramphenicol 代謝産物의 含量을 分析하여 尿 1 cc中의 含量을 算出하여 Table III에 表示했다.

TABLE III.

Fraction No.	A	B	C	D	E	F	G	H
CM-Content: r/cc	1493	2923	1493	2959	3540	960	1770	2730

6. 各 分劃에 對한 Glucuronic acid의 定量.—各分劃 1 cc에 濃 HCl 3 cc 0.2 % Naptholresorcinol 溶液 5 cc 加하고 100°C에 2時間 放置後 0°C로 冷却하고 5 cc의 amyl alcohol

TABLE IV.

Fraction No.	A	B	C	D	E	F	G	H
Glucuronic acid content	0.245	2.027	0.168	2.068	0.044	2.222	0.027	2.205

로 2回 抽出하여 合하고 ethanol 을 加하여 11 ml 로 한 다음 620 mμ 에서 比色하였다[10]. 檢體尿 1 cc 中의 glucuronic acid content 를 其 吸光度로 表示하면 Table IV 와 같다.

7. Chloramphenicol 의 Dichloracetamide 結合 分解體定量.——0.5% Chloramphenicol 에 4 N-HCl 를 加하여 直火에서 30分間 煮沸하고 $NaHCO_3$ 를 加하여 中和한 것을 standard 로 하여 Table II 의 Fraction E 및 G 各 1 cc 式을 取하여 各各을 pH 8 로 調節하고 氷冷한 $\frac{M}{80}KJO_4$ 10 cc 式 加하고 冷藏庫中에 2時間 放置한 다음 酸化體 *p*-nitrobenzaldehyde 를 Puga 法[9]에 準하여 定量하였다. 卽 chloramphenicol 分子 側鎖에서 酸 amide 結合을 이루고 있는 bis-hydroxyamine 은 periodate-oxidation 에 의하여 5時間 以內에는 酸化되지 않으나 鹽酸으로 酸 amide 結合을 分解한 다음 KJO_4를 作用시키면 卽時로 理論酸化量의 約 73% 가 進行됨으로 따라서 chloramphenicol 代謝產物에 對하여 鹽酸加水分解만을 省略하고 直接 KJO_4 로서 冷時 短時間 酸化시킴으로써 amide 結合이 水解된 chloramphericol 의 代謝產物을 定量할 수 있었다. 그 結果는 Table V 와 같다.

TABLE V.

Fraction No.	E	G
CM-Content γ/ml	306	84

結論 및 考察

1. 尿中 Alkarie 鹽 形成可能한 chloramphenicol 代謝產物의 含量은 約 4500 γ/cc 이다.

2. Lipase-hydrolysate 中 ether 分劃과 尿分劃間의 chloramphenicol 代謝產物의 含量分布比가 ether 抽出의 液性에 關係없이 一定하고 또한 glucuronic acid 의 含量이 ether 分劃보다 尿分劃에 顯著히 많다는 事實은 chloramphenicol-glucuronide 型의 代謝產物이 液性에 關係없이 거의 ether 에 移行하지 아니함을 意味한다.

3. Table I 의 物質들에 對하여 nitro 基의 還元과 dichloracetamide 結合의 分解를 無視하면 CM 型 (Table I 의 No. 2. 4. 10. 16), CM-Succ 型 (Table I 의 No. 1. 3. 9. 15), Glu-CM-Succ 型 (Table I 의 No. 5. 7. 11. 13), Glu-CM 型 (Table I 의 No. 6. 8. 12. 14)으로 分類할 수 있다. 實驗 (2)에서 CM 型의 物質은 完全히 除去된 것임으로 實驗 (3)의 lipase hydrolysate 中에는 CM 型과 CM-Glu 型만이 存在하고 實驗 (4)의 β-glncuronidase hydrolysate 中에는 CM 型과 CM-Succ 型만이 存在한다. fraction A.B.C.D. 는 모두 lipase hydrolysate 를 分劃한 것임으로 ether 分劃인 fraction A 또는 C 中에는 CM-Succ 型에 起因한 CM 型만이 存在하고 尿分劃인 fraction B 또는 D 中에는 CM-Glu 및 Gu-CM-Succ 型에 起因하는 CM-Glu 만이 存在한다. fraction. E.F.G.H 는 β-glucuronidose-hydrolysate 를 分劃한 것임으로 모든 chloramphenicol 性 物質이 다 移行되어 왔고 따라서 F 中에는 어떤 化合物도 檢出될 수 없고 fraction G 에는 CM-Glu 型에 起因하는 CM 型만이 存在하고 fraction H 에는 CM-Succ 型 및 Glu-CM-Succ 型에 起因하는 CM-Succ 型만이 存在한다.

4. fraction B 와 G 間의 chloramphenicol 性物質의 含量差 1150 γ 는 尿中에 Glu-CM-Succ 型의 chloramphenicol 性物質이 1150 γ/ml 의 濃度로 排泄되고 있음을 意味한다. 그러나 Table I 의 No. 5. 7. 11. 13 中의 어느 것인지는 同定되지 못하였다.

5. Puga 의 方法을 變形하여 fraction E 와 G 에 對하여 amide 結合의 分解體를 定量한 結果 그 測定値 306 γ 와 84 γ 와의 差 222 γ 는 ester 結合의 分解를 先行한 amide 結合의 分解體가 尿中에 222 γ/cc 의 濃度로 排泄되고 있음을 意味한다. 그러나 Table I 의 No. 3. 5. 13.

15 中의 어느 것인지는 同定되지 못하였다.

以上을 綜合하여 볼 때 Chloramphenicol-succinate 의 代謝產物로서 尿中에 排泄되는 成分으로서 Ester 結合의 加水分解에 先行한 Dichloracetamide 結合의 分解體 및 Glucuronide 를 形成한 代謝產物을 間接的으로 證明하였고 Ester 結合이 加水分解된 같은 種類의 代謝產物도 排泄되고 있다고 생각할 수 있다.

REFERENCES

1. M. Serembe, *Minerva Med.*, 517-521, 1960.
2. 西田, *J. Antibiotics* (Japan) Ser. B., **14**, 101-114 (1961).
3. Checcacci., *Minerva Med.*, 4043-4046 1958.
4. G.N. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 314 (1952).
5. G. Carrara *et al.*, *Chem. Abst.*, **46**, 3978 (1952).
6. 鈴木稔, *J. Antibiotics* (Japan), review on CM., Ser. B. 331 (1961).
7. M.C. Rebstock *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2458 (1949).
8. W.H. Fishmann, *J.B.C.*, **202**, 757 (1953).
9. R. Puga, *Chem. Abst.*, **46**, 5260 (1952).
10. 赤堀四郎, 酵素研究法 **3**, 658.