

## Chloramphenicol과 解熱劑와의 Ester 化合物에 關한 藥劑學的 研究 (II)

金正優·金鍾甲

中央大學校 藥學大學

### Pharmaceutical Studies on Esterification of Chloramphenicol with Antipyretics (II)

Jung Woo Kim and Jong Kap Kim

Antibiotic activity and antipyretic effect of three synthetic prodrugs, chloramphenicol acetylsalicylate (CAF-ASP), chloramphenicol naproxenate (CAF-NAX) and chloramphenicol acetaminophen succinate (CAF-SUC-ACET), were studied in vitro and in vivo.

In the experimental results, the CAF-NAX showed the most rapid absorption and the highest blood levels, and the CAF-SUC-ACET and CAF-ASP also were more rapid absorption and higher blood levels than controls, chloramphenicol and chloramphenicol palmitate.

The synthetic prodrugs also showed the antipyretic effect by modified Roszkowski method using endotoxin.

現在 臨床的으로 널리 使用되고 있는 廣範圍 抗生物質인 chloramphenicol에 prodrug의 概念을 導入하여 chloramphenicol과 竝用하여 使用할 수 있는 解熱, 鎮痛, 消炎作用을 나타내는 aspirin, acetaminophen, naproxen과 ester linkage로 結合시킨 prodrugs를 合成하여 이의 確認 및 이들 化合物의 物理的 特性試驗과 酸, 鹽基, 酵素 및 血液에서의 加水分解試驗 結果를 이미 發表한 바 있다.<sup>1)</sup>

이에 이 prodrugs의 生體內 投與時 生體內 利用率을 chloramphenicol과 比較하기 爲하여 抗菌力試驗, 家兎의 腸을 利用한 體外吸收試驗(cannulated everted sac technique method), 개를 使用하여 chloramphenicol과 이의 prodrugs를 經口投與한 後 血中濃度 및 Roszkowski 方法에 依한 解熱作用을 試驗한 結果 知見을 얻었다.

## 實 驗 方 法

**試 料**— chloramphenicol acetylsalicylate (CAF-ASP), chloramphenicol naproxenate (CAF-NAX), chloramphenicol acetaminophen succinate(CAF-SUC-ACET); 既合成한 prodrugs<sup>1)</sup>

**消化管内 吸收實驗<sup>2~8)</sup>**—Cannulated everted sac technique方法으로 건강한 家兔(2.5~3.7 kg)에 phenobarbital sodium 3g을 腹腔內 注射한 後, 完全 麻醉시키고 腹部를 切開하여 小腸의 上端部分 約 10cm 切取해서 即時 미리  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 맞춘 Ringer溶液으로 조심스럽게 洗滌한 뒤 유리봉을 使用하여 뒤집는다.

한쪽 끝을 실로 매고 다른 한쪽 끝을 polyethylene tube에 連結하여 檢液을 採取할 수 있도록 裝置하였다.

Mucosal fluid는 Ringer溶液의 90ml에 檢體(CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET)를 넣어 미리  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 맞춰놓는다. 15分 間隔으로 0.5ml의 serosal fluid를 取하여 檢液으로 한다.

檢液을 각각의 最大吸收波長에서 吸光度를 測定한다.

**抗菌力實驗<sup>9~14)</sup>**— CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET 및 CAF를 約 1(mg씩 取하여 각각 ethanol 10ml에 溶解하고 phosphate buffer (pH=6.0)를 加해 5(mcg/ml가 되도록 稀釋한다.

Plate는 滅菌된 petri dish(直徑 9(mm)에 Mueller-Hintcn media(cxcid, pH=7.4)를 20 ml 분주하고 굳힌 후, 5菌株의 균주균액( $8 \times 10^7$  cell/ml)를  $48^\circ\text{C}$ 로 식힌 Mueller-Hintcn media 10ml에 각각 0.1ml를 넣어 미리 굳혀 준비된 plate에 4ml씩 고르게 편 후 굳히고 각 plate 4개씩 cylinder (stainless steel, 높이  $10 \pm 0.1\text{mm}$ , 외경  $8 \pm 0.1\text{mm}$ , 내경  $6 \pm 0.1\text{mm}$ )를 cup dropper를 利用하여 투입한다.

각 cylinder에 試驗液 약 0.3ml씩을 채우고  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 18시간 培養後 抑制環의 크기로 抗菌力을 判定하였다.

使用菌株는 Gram(-)로 Pseudomonas pyccyanea, Escherichia coli를 사용했으며 Gram (+)로 Staphylococcus aureus Sarcina lutea, Bacillus subtilis를 사용하였다.

**解熱效果測定實驗<sup>15~21)</sup>**—Roszkowski方法<sup>19)</sup>을 改善하여 Lipopolysaccharide B (LPS. B. Difco. E. coli, endotoxin)을 家兔에 靜脈注射하여 人爲的으로 體溫을 上昇시켜 藥物을 投與하지 않은 群(對照群)으로 하여 溫度 上昇幅과 pattern의 差異로 解熱效果를 證明한다.

實驗裝置는 Ellab Co. Electrical thermometer model TE-3을 使用하였으며 實驗動物은 New Zealand white계의 rabbit(3~3.5kg) 3마리를 對照群으로 하여 LPS. B를 7.5mg/kg의 濃度로 靜脈注射하여 나온 溫度上昇曲線을 對照로 하고 實驗群은 rabbit 3마리씩으로 하고 다음과 같이 實驗하였다.

먼저 實驗動物은 實驗當日 朝食을 굶긴채 固定臺에 고정시켜 直腸體溫計를 挿入하고 15分마다 2時間동안 測定하여 體溫의 變化가 적은 것을 使用하였으며, 예비실험결과 藥物과 LPS. B를 同時에 투여하는 것보다 시간차를 두어 투여하는 것이 理解하기 쉬우므로 後者의 方法을 擇하였다.

CAF-NAX와 naproxen의 경우는 CAF-NAX 實驗群과 naproxen 實驗群에 각각 13.8mg/kg (CAF로서 8.3mg/kg에 해당량)과 이에 對應하는 量 5.94mg/kg의 濃度로 經口投與하고 1시간 후에 LPS. B를 7.5mg/kg의 濃度로 靜脈注射한다.

CAF-ASP와 aspirin의 경우는 CAF-ASP 實驗群과 aspirin 實驗群에 각각 12.5mg/kg (CAF로서 8.3mg/kg에 해당량)과 이에 對應하는 量 4.65mg/kg의 濃度로 經口投與하고 30分 후 LPS. B를 7.5mg/kg의 濃度로 靜脈注射한다.

CAF-SUC-ACET와 acetaminophen의 경우는 CAF-SUC-ACET 實驗群과 acetaminophen 實驗群에 각각 13.5mg/kg (CAF로서 8.3mg/kg에 해당량)과 이에 對應하는 量 9.72mg/kg의 濃度로 經口投與하고 30分 後에 LPS. B를 7.5mg/kg의 濃度로 靜脈注射한다.

血中濃度測定<sup>22~36)</sup>—개에 각 prodrug(CAF-ASP, CAF-NAF, CAF-SUC-ACET)를 投與하여 時間變化에 따른 CAF의 濃度를 spectrophotometer에 依해 測定하였다.

檢體操作은 blood와 heparin용액(200unit/ml)을 (1:1)로 稀釋한다.

投與量은 CAF-ASP에서는 12.5ml/kg (CAF로서 8.3mg/kg에 해당하는 양) CAF-NAX에서는 13.8mg/kg (CAF로서 8.3mg/kg에 해당하는 양) CAF-SUC-ACET에서는 13.35mg/kg (CAF로서 8.3mg/kg에 해당하는 양)으로 하였다.

稀釋된 檢體 1ml를 cap tube에 取하고 3.8% sodium citrate용액 0.1ml를 加한 다음, 1% saponin용액 0.2ml를 加해서 진탕하고 완전히 溶血시킨다(A).

마로 投與前 血液을 取해서 上記操作을 行한다(B).

上記 (A)와 (B)에 pH 7의 Clark-Lubs buffer용액 2ml 및 isoamyl acetate 3ml씩을 加한 다음 10分 동안 진탕시켜 抽出한다.

遠心分離 後 上層을 2ml 取하고, 이 액에 3% INAH용액 및 6% NaOH용액을 각각 1ml씩 加한다.

이 때 標準溶液(CAF 10r/ml의 isoamyl acetate용액) 2ml 取해 以下 檢液과 같이 30°C 상온조절에서 30분간 진탕반응시킨다.

反應 後 上層을 除去한 後 呈色된 下層을 取해서 430nm에서 吸光度를 測定한다.

물을 blank로 하여 投與前 血液(B)의 吸光度值를 補正 한다.

## 結果 및 考察

消化管内 吸收實驗—家兔의 摘出腸管을 使用하여 Wiseman方法의 改良型인 挿管反轉 腸管法을 使用하여 消化管内의 吸收實驗을 한 結果, 透過速度는 Table I과 같은 CAF-SUC-

ACET>CAF-ASP>CAF-NAX순의 速度였다.

抗菌力實驗—合成한 prodrug 그 自體가 antimicrobial activity가 있는지 與否를 確認하기 위해 chloramphenicol에 esterification시킨 CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET와 CAF에 Gram(-)균인 *Pseudomonas pyocyanea*(녹농균), *Escherichia coli*(대장균), Gram(+ )균인 *Staphylococcus aureus*(황색포도상구균), *Sarcina lutea*(포도상구균), *Bacillus subtilis*(고초균) 등 모두 5균주에 對하여 抗菌力 實驗을 한 結果는 Table II와 같이 chloramphenicol만이 抗菌力을 나타내었고, 예상했던 것과 같이 이의 prodrug는 抗菌力을 나타내지 않았다.

解熱效果 測定—本 實驗에서는 分析上의 問題點을 考慮하고 보다 나은 解熱效果 測定方法으로 Roszkowski方法<sup>19)</sup>을 改良하여 *E. coli* endotoxin을 rabbit에 靜脈注射하므로써 體溫을 약 1°C 정도 上昇시킨 후 檢體藥物을 投與하여 體溫의 上昇과 下降의 pattern으로 解熱作用의 效果와 作用時間과의 關係를 糾明하였으며, 本 方法의 長點으로는 實驗動物이 rat보다 큰 rabbit이기 때문에 解熱效果 測定이 容易하여 短時間에 測定이 可能하며 再現性이 좋고 實驗이 簡便한 點이다.

Table I—Absorption rate of prodrugs of CAF through intestinal tract by using Barr's method

prodrugs	time(min)	15	30	45	60
CAF-ASP		27.5	66.5	123.6	164.0
CAF-NAX		24.4	62.6	83.3	—
CAF-SUC-ACET		54.6	92.9	174.0	—

Key : unit, r/ml

Table II—Antimicrobial activity CAF-derivatives against strains in vitro

strains	CAF	CAF-ASP	CAF-NAX	CAF-SUC-ACET
<i>Pseudomonas pyocyanea</i> (NCTC 10490)	*-	-	-	-
Gram (-) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 27166)	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Gram (+) <i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i> (ATCC 9341)	+	-	-	-

Key : \*+, inhibition zone is more than 14mm;  
-, non-inhibition zone.

CAF-ASP는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 약물투여 후 1시간에 解熱效果가 나타나 2시간 15분에 最高의 解熱效果를 나타냈고 aspirin은 45분에 解熱效果가 나타나 2시간에 最高의 解熱效果를 나타냈다.

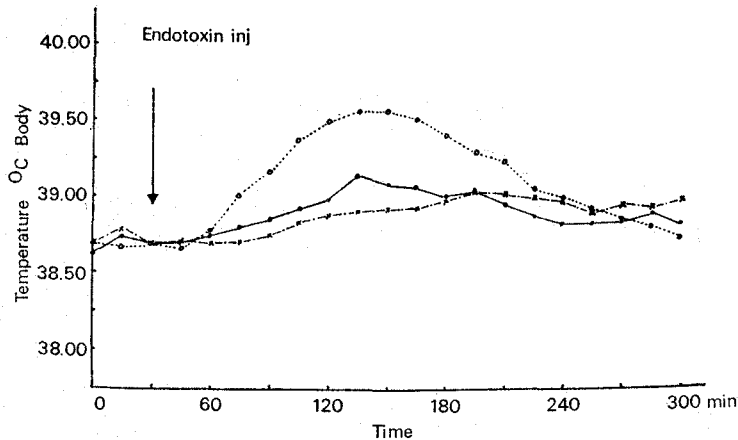


Figure 1—The antipyretic activity of CAF-ASP and aspirin in rabbits.  
Key : ○, Control ; ●, CAF-ASP ; ×, Aspirin.

CAF-NAX는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 약물투여 후 1시간 30분에 解熱效果가 나타나 2시간 15분에 最高의 解熱效果를 나타냈고 naproxen은 1시간 15분에 解熱效果가 나타나 2시간 30분에 最高 效果를 나타냈다.

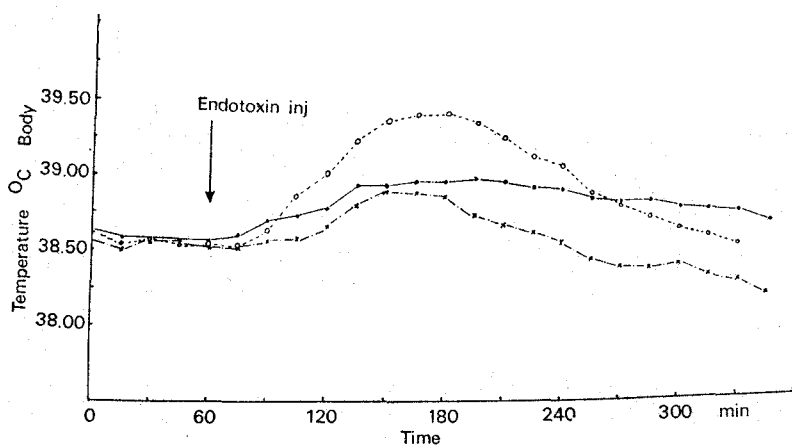


Figure 2—The antipyretic activity of CAF-NAX and naproxen in rabbits.  
Key : ○, Control ; ●, CAF-NAX ; ×, naproxen

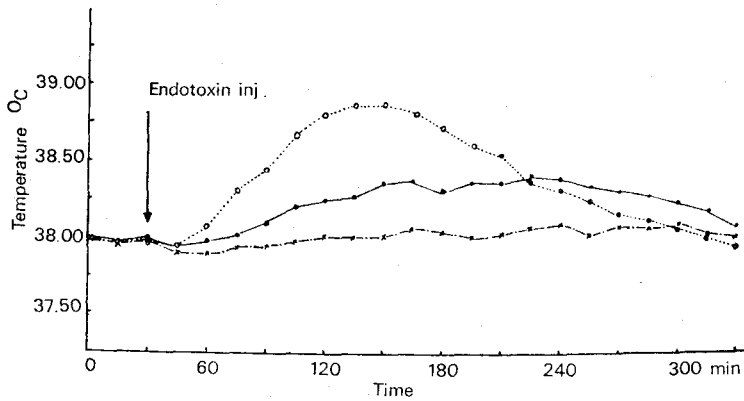


Figure 3—The antipyretic activity of CAF-SUC-ACET in rabbits.  
Key : ○, Control ; ●, CAF-SUC-ACET ; ×, Acetaminophen.

CAF-SUC-ACET는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 약물투여 후 45분에 解熱效果가 나타나 2시간 30분에 最高解熱效果가 나타났고 acetaminophen은 45분에 解熱效果가 나타나 2시간에 最高 解熱效果를 나타냈다.

血中濃度 測定—본 實驗에서는 먼저 aspirin, naproxen 또는 acetaminophen과 chloramphenicol의 相互分析 妨害與否를 檢討하고 chemical method와 bioassay method와의 分析差를 檢討한 후 實驗에 容易하고 再現性이 좋은 Kakemi方法<sup>24)</sup>을 使用하였다. 이 때 개에 투여한 이들 prodrug에 대하여 時間別 血中濃度를 吸光度法으로 測定하여 보면, 이들 prodrug의 吸收 pattern은 CAF, CAF-PAL와 同一하게 1~2시간에 最高 血中濃度에 달했으며 이를 解

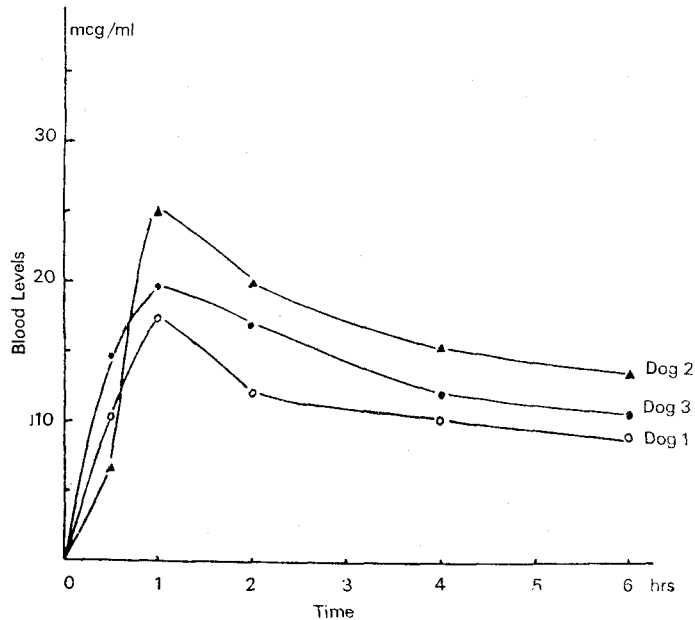


Figure 4—Blood levels of CAF-ASP (12.5mg/kg) in dogs.

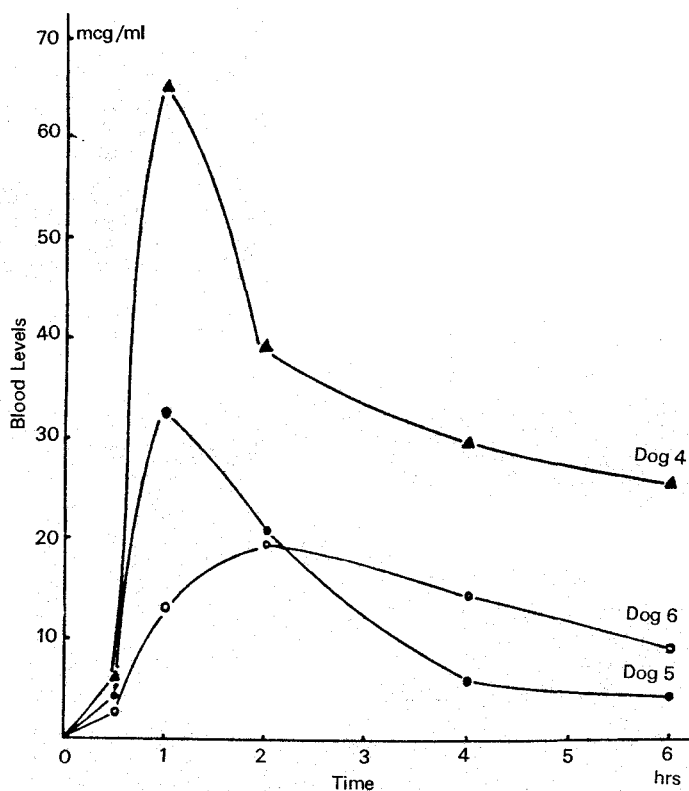


Figure 5—Blood levels of CAF-NAX (13.8mg/kg) in dogs.

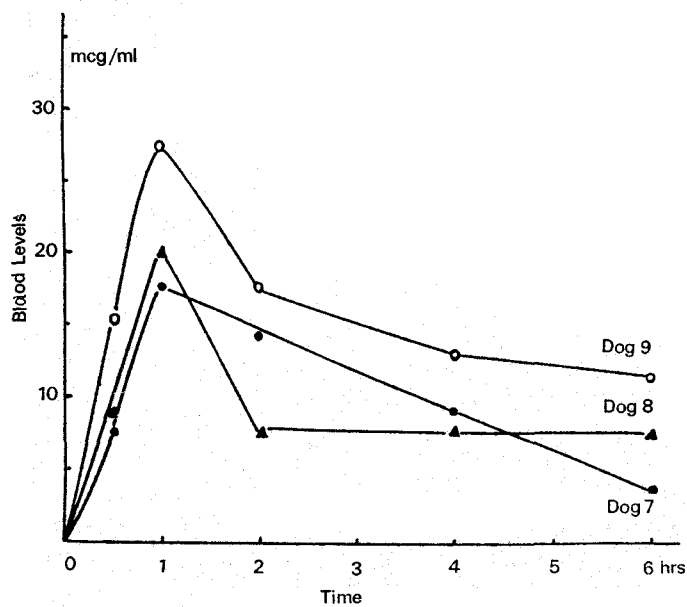


Figure 6—Blood levels of CAF-SUC-ACET (13.35mg/kg) in dogs.

熱效果 測定實驗과 比較하면 가장 강력한 解熱效果가 나타나는 時間과의 關係 pattern이 類似 하므로써 이들 物質이 加水分解함을 間接的으로 알 수 있다.

이 結果는 Fig. 4, 5, 6, 7, 8과 같다.

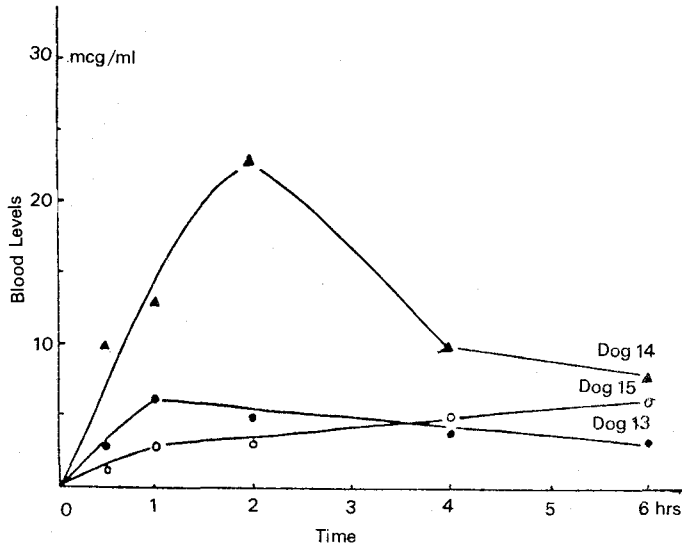


Figure 7—Blood levels of CAF-PAL (14.48mg/kg) in dogs.

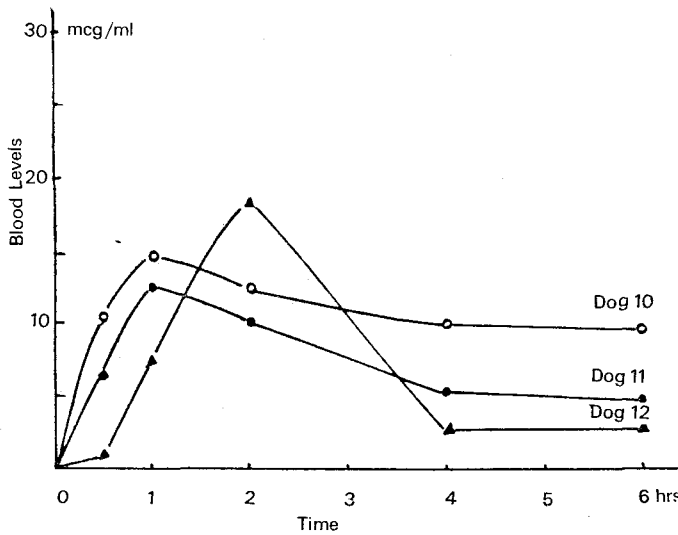


Figure 8—Blood levels of CAF (8.33mg/kg) in dogs.



## 結 論

1. 合成한 prodrugs(CAF-ASP, CAF-NAX, CAF-SUC-ACET)와 市販되고 있는 chloramphenicol palmitate, chloramphenicol의 吸收速度와 血中濃度를 比較할 때 chloramphenicol naproxenate(CAF-NAX)와 chloramphenicol acetaminophen succinate (CAF-SUC-ACET)는 對照로 投與한 chloramphenicol palmitate나 chloramphenicol에 比하여 比較的 빠른 吸收速度와 높은 血中濃度를 나타내었다.

2. 動物實驗結果 遊離 chloramphenicol이 Micrococcus luteus에 對한 antimicrobial activity를 나타내고 또한 遊離된 aspirin, naproxen 및 acetaminophen의 解熱效果를 나타내는 2重效果를 期待할 수 있었다.

## 文 獻

- 1) J.W. Kim and J. K. Kim, *Yakhak Hoeji*, **27**, 207 (1983)
- 2) James Blanchard, *Am. J. Pharm.*, **147**, 135~146 (1975)
- 3) *Ibid*, **150**, 132~151 (1978)
- 4) 材田敏郎, 有田隆一, 生物藥劑學, 南江堂(1975)
- 5) Wiseman, *Method Med. Res.*, **9**, 287 (1961)
- 6) Barr, et al., *J. Pharm. Sci.*, **59**, 154 (1970)
- 7) Donald E. Cadwallader, *Biopharmaceutics and drug Interactions* (1974).
- 8) Y. Nakai and M. Hanano, *Pharmaceutics-Theory and application* (1974).
- 9) N.J. Legakis and J. Papavassiliou., *The Journal of Antibiotics*, **28**, 912 (1975).
- 10) A.A. Dominguez-Gil, M. Cepeda, J.L. Vila and J.J. garcia, *The Journal of Antibiotics*, **32**, 482 (1979)
- 11) H. Ferres, M.J. Basker and P.J. O'Hanlon, *The Journal of Antibiotics*, **27**, 922 (1974)
- 12) P.C. Fuchs, C. Thornaberry, A.L. Barry, T.S. Gwan, E.H. Gerlach, and R.N. Jones, *The Journal of Antibiotics*, **30**, 1098 (1977)
- 13) J.V. Uri, Paul Actor, L. Phillips and J.A. Weisbach, *The Journal of Antibiotics*, **31**, 580 (1978)
- 14) W.V. Daehne, E. Frederiksen, E. Gundersen, F. Lund, P. Morch, H.J. Petersen, K. Roholt, L. Tybring, and W.O. Godtfredsen, *J. Med. Chem.*, **13**, 607 (1970)
- 15) Richard A. Runkel, et al., *Chem, Pharm. Bull.*, **20** (7), 1457 (1972)
- 16) R.N. Brogden, et al., *Drugs* **18**, 241~277 (1979)
- 17) Gray L. Craig and W. Watson Buchanan, *Drugs*, **20**, 453~484 (1980)
- 18) Z.T. Chowhan, R. Pritchard, W.H. Rooks, and A. Tomolones, *J. Pharm.Sci.*, **67**, 1645 (1978)
- 19) Roszkowski et al, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **179**,114 (1971)
- 20) R. Runkel, M. Chaplin, G. Boost, E. Segre, and E. Forchielli, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 703(1972)

- 21) R.I. Dorfman, *Arzneim-Forsch* **25**, Nr. 2a, 278 (1975)
- 22) A.J. Glazko, W.A. Dill, A. Kazenko, L.M. Wolf and H.E. Carnes, *Antibiot. Chemother.*, **8**, 517 (1958)
- 23) K. Karemi and S. Ohashi, *藥學雜誌*, **92**, 338 (1962)
- 24) K. Kakemi, T. Arita, and S. Ohashi, *藥學雜誌*, **82**, 342, (1962)
- 25) *Ibid*, **82**, 345 (1962)
- 26) *Ibid*, **82**, 348 (1962)
- 27) A.J. Aguiar, L.M. Wheeler, S. Fusari, and J.E. Zelme, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1844 (1968)
- 28) Milo Gibaldi, *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, (1977)
- 29) G. Vita, I. De. Carneri, G. Bucher, and G. Coppi, *Antibiot. Chemother.*, **12**, 22(1962)
- 30) A.J. Glazko, *Arch. Biochem.* **23**, 411 (1949)
- 31) A.J. Glazko, *J. Biol. Chem.* **183**, 679 (1950)
- 32) S.P. Bessman, *J. Lab. Clin. Med.*, **35**, 129 (1950)
- 33) 根來, *藥學雜誌*, **70**, 669 (1950)
- 34) 小田, *ibid*, **71**, 51 (1951)
- 35) 掛貝, 宇野, 渡邊, 厚生科學研究 (1954)
- 36) Joslyn, D.A., and Galbraith, M., *J. Bact.* **59**, 711~716 (1950)