약학회지 제36권 제2호 110~114(1992)
Yakhak Hoeji Vol. 36, No. 2

1, 4-나프토퀴논 유도체의 항균 및 항진균 작용

유충규# · 류재천* · 정세영** · 김동현**
이화여자대학교 약학대학
*KIST doping control center
**경희대학교 약학대학
(Received January 24, 1992)

Antibacterial and Antifungal Activities of 1, 4-Naphthoquinone Derivatives

Chung-Kyu Ryu#, Jae-Chun Ryu*, Sae-Young Chung** and Dong-Hyun Kim**
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea
**Doping Control Center, KIST, Seoul 136-79, Korea*
***College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea*

Abstract—In order to evaluate the antimicrobial effect of 2, 3-substituted-1, 4-naphthoquinone derivatives, we newly synthesized several 2-chloro, 2-bromo and 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinones and subjected to antibacterial and antifungal activities, in vitro, against *Escherichia coli* NIHJ, *Staphylococcus aureus* ATCC6538p, *Candida albicans* 10231, *Aspergillus niger* 1231 and *Tricophyton mentagrophytes* 6085. Among these derivatives **3**, **9**, **18** and **23** showed the potent antibacterial activities. **18**, **23** and **28** have the antifungal activities. However, these compounds have no significant hemolytic activity at concentrations higher than that required for showing the antibacterial and antifungal activities.

Keywords □ 2-chloro, 2-bromo and 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone derivatives, antifungal, antibacterial, hemolytic.

1, 4-Naphthoquinone 유도체는 일반적으로 항균작용, 항진균작용, 항암작용, 항응고작용 등 다양한 생리활성이 있어 식품첨가제, 항균제나 항암제 등 새로운 물질창제에 중요한 lead compound이다.[1-3,12] 식품첨가제인 menadione, phygon 등은 1, 4-naphthoquinone 유도체로 항균, 항진균작용이 있어 보존제로 사용되었다.[1-8,13] 1, 4-Naphthoquinone 유도체는 최근 천연에서 분리 또는 합성되어지고 있으며 그 생리작용과 연관된 연구들이 행해지고 있다.[6] Adriamycin 및 acinorhodin 등의 quinone계 화합물은 항암, 항균작용이 우수하며 그외에도 DT-diaphorase의 억제와 관련되어 역전사효소의 저해작용, 전자전달계 저해작용이 있는 것으로 보고하고 있다.[6,7]

1, 4-Naphthoquinone 유도체는 mitochondria내 전자전달계에 작용하여 inhibition 과정을 통해 세포독성, 항균, 항진균 작용이 예상된다. 하나의 전자환원을 받으면 naphthoquinone semi radical이 생성되고 이 radical이 $^3O_2$와 반응하여 superoxide O_2^-가 생성된다. 그리고 연쇄적으로 ·HO 혹은 H_2O_2가 발생하여 세포독성 즉 암세포의 DNA 등을 절단하거나 세균 진균 등에 항균작용이 예상된다.[7]

또한 이 유도체는 혈액응고 작용이 있는데 1, 4-naphthoquinone 모핵을 갖고있는 V.K류는 혈액응고를 촉진시키는 물질로 결핍시엔 혈액응고인자인 FIX, FX, thrombin의 생성을 억제한다. V.K의 생리작용은 생체 산화환원 반응에 의해 산화형 V.K가 환원형 V.K

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

구조로 상호변환이 일어나기 때문이다. 이 과정을 V.K cycle이라고 하며 이 과정에 직접 관여하는 enzyme은 DT-diaphorase 이다.[1,14,15] 1, 4-Naphthoquinone과의 구조상관관계를 갖는 V.K inhibitor는 DT-diaphorase에 V.K와 상경적으로 작용하여 혈액응고를 억제한다.[1,11,15]

본 연구에서는 독성이 비교적 약하고 또한 약제내성균주의 증가로 인한 새로운 유도체의 항균, 항진균 작용에 대한 검색을 하고자 한다. 기대효과로는 독성이 약하며 넓은 항균 spectrum을 가지며 약제 내성이 없는 항균, 항진균제 개발과 항진균 항혈액응고작용 기전의 기초자료 제공이다.

항진균제, 항균제, 첨가제를 개발연구하기 위해 새로운 1, 4-naphthoquinone 유도체를 합성하여 이들 화합물에 대하여 항균작용 및 항진균작용을 조사했다. 1, 4-Naphthoquinone 유도체의 2번 혹은 3번 위치에 Cl, Br, OH가 치환된 것은 항균작용, 항진균작용과 항응고작용이 기대 된다.[1,13,17]

2, 3-Dichloro-1, 4-naphthoquinone, 2, 3-dibromo-1, 4-naphthoquinone, 2, 3-epoxy-2, 3-dihydro-1, 4-naphthoquinone 등과 amine류를 치환반응시켜서 새로운 naphthoquinone 유도체를 얻었고 그 결과는 이미 보고 하였다.[1-3]

이들 합성하여 얻어진 신물질이 항균 및 항진균작용이 있다고 사료되어 각각의 생리활성을 검색하였다. 항균작용검색은 *E. coli, S. aureus* 등 그람 양성 음성균에 *T. mentagrophytes* 등에 대하여 고체배지희석법에 의해 MIC를 측정했다.

1, 4-Naphthoquinone 유도체는 항혈액응고작용이 있어 용혈독성 실험을 실시했다.

새로 얻은 1, 4-naphthoquinone 유도체는 우수한 항균작용, 항진균작용 등이 있어 항생제 항진균제, 항암제, 식품보존제 등의 개발에 응용되리라 예상된다.

실험방법

시약－1, 4-Naphthoquinone은 Aldrich Chemical Company에서 구입하였으며, 그 밖에 사용된 각종 시약은 Sigma에서, 배지등은 Difco에서 구입하였으며 모두 특급 혹은 일급시약을 사용하였다.

기기－UV : UV spectrophotometer, Shimadzu UV-120-02를 사용하였다.

Shaking water bath : Thomastat T-22S, Thomas Kagaku Co.를 사용하였다.

IR : IR-spectrum은 KBr pellet으로 혹은 nujol에 녹여 Alphacenteauri FT-IR spectrometer로 기록하였다.

^{1}H-MNR : TMS를 표준물질로 Varian Model T-69 A spectrometer (60 MHz)로 측정하였다.

TCL : Silica gel 60F-254 (Merck company, 0.25 mm)를 사용하였으며, 전개용매는 chloroform을 사용하였고, 30% 황산 vanillin용액으로 110℃에서 발색하였다.

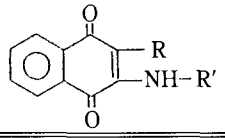
물질합성－본 실험에서 사용된 1, 4-naphthoquinone계 유도체 물질은 구입하거나 새로이 합성하여 사용하였다. 본 실험에서 사용된 새로운 물질의 합성법과 구조 물정은 이미 전보에서 보고하였다.[1-3] 이들 물질의 구조는 Table I에 명기하였다.

항균작용 검정－각 화합물에 대한 최소발육저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 고체배지희석법으로 결정하였다. 항균 작용시험을 위해 사용한 균주 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P 및 *Escherichia coli* NIHJ를 Mueller-Hinton broth에서 배양한 2×10^5의 균을 2배씩 단계적으로 희석한 검체를 넣은 Mueller-Hinton agar에 이식하여 37℃에서 20～22시간 배양한 후 육안으로 판정하였다. 대조약물로는 ampicillin을 사용하였다.(Table II, III)

항진균작용 시험－*Candida albicans* 10231과 local *Aspergillus niger* 1231, *Tricophyton mentagrophytes* 6085 균주를 사용했으며, 항균작용시험과 같이 판정하였다. 단, 배지는 sabouraud agar를 사용했으며 배양은 37℃에서 3～7일간 배양하였다. 대조약물은 griseofulvin을 사용하였다.(Table II, III)

용혈시험－흰쥐 (Wistar, 200～250g male rat, 12일 실온에서 시판사료로 사육)의 심장으로부터 heparin 처리한 혈액을 채취하여 tris buffer saline (이하 TBS라 칭함)으로 희석한 후 300G에서 5분간 원심분리후 상등액과 buffy coat를 제거했다. 동일 조작을 2회 반복하여 적혈구를 분리했다. 분리한 2×10^8 적혈구에 각각의 검체를 0.5 mg을 넣어 37℃에서 30분 배양한후, 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액중의 hemoglobin양을 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로는 warfarin을 사용하였다.(Table

Table I—2, 3-Substituted-1, 4-naphthoquinone derivatives*



Comp. No.	R	R′	Comp. No.	R	R′
1	Cl	p-carboxyanilino	**15**	OH	p-carboxyanilino
2	Cl	2-aminopyrimidino	**16**	OH	2-aminoanilino
3	Cl	anilino	**17**	Br	bromo
4	Cl	5-methylisoxazolino	**18**	Br	methyl
5	Cl	p-toluidino	**19**	Br	m-nitroanilino
6	Cl	4-sulfanilino	**20**	Br	p-chloroanilino
7	Cl	hydrazino	**21**	Br	p-toluidino
8	Cl	m-nitroanilino	**22**	Br	4-ethylanilino
9	Cl	sulfathiazolino	**23**	Cl	amino
10	Cl	sulfaguanidino	**24**	Cl	p-hydroxyanilino
11	Cl	m-carboxyanilino	**25**	Cl	m-hydrazino
12	OH	p-toluidino	**26**	Cl	4-methylpiperzino
13	OH	m-carboxyanilino	**27**	Cl	chloro
14	OH	m-nitroanilino	**28**	H	methyl

*자세한 구조, 물성, 합성법은 문헌 1), 2), 3)에 보고 했다.

IV)

결과 및 고찰

항균작용 및 항진균작용—실험에 이용한 1, 4-naphthoquinone 화합물에 대한 항균 및 항진균효과는 Table II와 Table III와 같다. 그람 양성인 *S. aureus*에 대해 효과가 우수한 것은 **3**과 **9**로서 MIC가 3.2 μg/ml로 ampicillin과 동등한 효과가 있었다. 그 다음은 **18**과 **23**으로 MIC가 6.3 μg/ml이었다. 그람 음성인 *E. coli*에 대해서는 **23**이 가장 우수했으며 MIC가 3.2 μg/ml이었다. 그 다음이 **3**과 **9**로 MIC가 12.5 μg/ml이었다. 이러한 효과는 ampicillin보다 우수한 결과였다.

*C. albicans*에 대하여서는 **18**, **23**, **28**이 우수했으며, MIC가 6.3 μg/ml이다. 그 다음이 **21**, **26**, **22**, **19**, **1**순이었으며 이것은 모두 griseofulvin보다 우수한 효과였다. 환자로부터 분리한 *C. albicans*에 대한 항진균 효과를 여기에 표기하지 않았지만 *C. albicans* 10231과 비슷한 결과를 나타냈다. *A. niger*에 대해서는 3가지 화합물밖에 조사하지 않았지만 *C. albicans*와 비슷한 결과를 나타냈다. *T. mentagrophytes*에 대해서는 **24**가 가장 우수했으며, 그 다음이 **23**과 **28**로 griseofulvin과 동등한 결과를 나타냈다.

Table II—Antibacterial and antifungal activity of 1, 4-naphthoquinone derivatives

Compound	MIC (μg/ml)			
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*	*A. niger*
1	25	12.5	25	25
2	50	12.5	50	50
3	12.5	3.2	25	25
4	50	25	50	—*
5	50	12.5	100	—
6	50	25	100	—
7	50	25	100	—
8	50	12.5	100	—
9	12.5	3.2	50	—
10	50	25	50	—
11	50	50	100	—
12	50	50	100	—
13	50	50	100	—
14	50	50	100	—
15	50	50	100	—
16	50	50	100	—

*not determined.

이와같이 1, 4-naphthoquinone 유도체가 우수한 항

Table III—Antibacterial and antifungal activity of 1, 4-naphthoquinone derivatives

Compound	MIC (μg/ml)			
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*	*T.mentagrophytes*
17	100	50	25	50
18	50	6.3	6.3	50
19	100	50	25	100
20	100	100	100	100
21	100	50	25	100
22	100	100	25	100
23	3.2	6.3	6.3	25
24	50	100	50	12.5
25	100	100	50	100
26	100	50	25	50
27	100	50	50	100
28	100	100	6.3	25
Ampicillin	3.2	−*	100	−
Griseofulvin	−	−	50	25

*not determined.

Table IV—Hemolytic activity

Compound	Hemolysis (%)	Compound	Hemolysis (%)
1	40	**15**	50
2	55	**16**	30
3	30	**17**	55
4	25	**18**	10
5	40	**19**	20
6	40	**20**	10
7	40	**21**	0
8	45	**22**	10
9	50	**23**	10
10	55	**24**	10
11	70	**25**	0
12	70	**26**	35
13	85	**27**	0
14	75	**28**	20
		warfarin	65

균 및 항진균에 대하여 우수한 효과를 발휘하는 것은 현재 사용하고 있는 항진균제에 대등하거나 우수한 효과로 사료된다. 이러한 결과는 앞으로 새로운 1, 4-naphthoquinone 유도체의 합성과 함께 새로운 항진균제의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

용혈작용—1, 4-Naphthoquinone 유도체가 우수한 항균 및 항진균작용이 있지만 이 계열의 화합물이 용혈작용, 항응고작용이 알려져 일차적으로 용혈작용에 대하여 조사했다.(Table IV) 대조약물로 사용했던 warfarin에 비해 훨씬 약한 작용을 나타냈으나 **13**, **14**, **12**, **11**은 warfarin에 비해 각각 1.23, 1.15, 1.08, 1.08 배 높았다. 그 중에서도 흥미로운 것은 **23**, **24**, **19**, **21**, **28**, **3** 등은 용혈작용이 아주 낮았다. 그럼에도 불구하고 항균작용 및 항진균작용은 우수 하였다.

앞으로 독성에 관한 실험을 더 연구 조사해야 되겠지만 첨가제, 항진균제 또는 항균제로의 개발이 시사된다.

결 론

1. 실험에 이용한 1, 4-naphthoquinone 유도체 중 *E. coli*에 대한 항균작용은 **3**, **9**, **18**, **23**화합물 순이었으며, *S. aureus*에 대해서는 **23**, **3**, **9**화합물 순이었다. 기존의 ampicillin보다 우수한 항균작용을 나타냈다.

2. 항진균작용은 **18**, **23**, **28**화합물이 우수했다. 대조약물 griseofulvin보다 우수한 항진균작용을 지니고 있다.

3. 용혈작용은 **13**, **14**, **12**, **11**화합물 순으로 강했으며, 항균작용과 항진균작용이 우수한 화합물은 거의 없었다.

4. 상기 화합물중 2위치에 Cl치환 화합물이 Br치환 화합물보다 생리활성이 강하여 치환기의 전자 흡인성과 탈리와 생체내 receptor와의 반응과 상관관계가 예상된다. 그리고 치환기의 부피가 적은것이 생리활성이 강했다.

감사의 말씀

이 논문의 일부 실험은 1990년도 진로문화재단 연구비 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1) Ryu, C.K.: Synthesis of anticoagulant 2-chloro-3-(N-arylamino)-1, 4-naphthoquinones, *Yakhak Hoeji* **32**(4), 245 (1988).

2) Ryu, C.K., Oh, J.D. and Suh, M.E.: Synthesis of

anticoagulant 3-(N-arylamino)-1, 4-naphthoquinones (II), *Yakhak Hoeji* **33**(5), 273 (1989).

3) Ryu, C.K., *et al.*: Biological activities of 1, 4-naphthoquinones. Proceeding the spring convention of the pharmaceutical society of Korea (1990).
4) Ryu, C.K.: Synthesis of anticoagulant 3-(N-arylamino)-1, 4-naphthoquinones(III). *Yakhak Hoeji* **34** (6), 422 (1990).
5) Chung, C.Y., Ryu, C.K., Ryu, J.C. and Kim, D.Y.: Biological activities of 1, 4-naphthoquinone derivatives. Proceeding International Congress of New Drug Development of the Pharmaceutical Society of Korea in Commemoration of the Society's 40th Anniversary (1991).
6) Tonozane, H., Takeuchi, Y., Choshi, T., Kishida, S. and Yamato, M.: Synthesis and antifungal activities of *dl*-griseofuvin and its congeners I. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(4), 925-929 (1990).
7) Take, Y., Sawada, M., Kunai, H., Inouye, Y. and Nakamura, S.: Mechanism of inhibition of reverse transcriptase by quinone antibiotics. *J. Antibiotics* **39**, 557 (1986); **41**, 1471 (1988).
8) Hodnet, E.M., Wongweichchintana, C., Dunn, W. and Marrs, M.: Substituted 1, 4-naphthoquinones vs. the ascitic sarcoma 180 of mice. *J. Med. Chem.*, **26**, 570 (1983).
9) Silver, R.F. and Holmes, H.L.: Synthesis of some 1, 4-naphthoquinones and reactions relating to the their use in the study of bacterial growth inhibition, *Canadian J. Chem.*, **46**, 1859 (1968).
10) Kerkar, V.D., Mhaske, R.B., Kulkarni, P.L. and Kulkarni, A.R.: Antimicrobial studies of some juglones. *Indian J. Pharm. Soc.*, **49**, 184 (1987).
11) Rehse. K. *et al.*: Gerinnungsaktivitaet von Calophylloid. *Arch. Pharm.*, (Weinheim), **312**, 72 (1979).
12) Wurm, G. and Geres, U.: Zum Mechanismus der antianaphylaktischen Aktivitaet des Plumbagin, *Pharm. Zeitung* 127, Jahrgang Nr., **40**(7), 2109 (1982).
13) Wurm, G., Geres, U. and Schmidt, H.: Untersuhungen an 1, 4-Naphthoquinonen. *D. Apotheker Zeitung* **43**, 2045 (1980).
14) O'Reilly, R.A.: In *Hemeostasis and Thrombiosis.* J. B. Lippincott Co., p. 955 (1982).
15) Wallin, R. and Suttie, J.W.: Vitamin K dependent carboxylation and vitamin K epoxidation. *Biochem. J.*, **194**, 983 (1981); *J. Biol. Chem.*, **257**, 1583 (1982).
16) Houben-Weyl: *Methoden der Organischen Chemie,* Bd. VII/3a, Chinone Teil 1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp.419, 693-695, 657 (1977).