

노르후록사신-금속이온 착물의 물리화학적 성질 및 항균력

박원봉* · 김경아 · 이명환 · 이동선 · 노동윤

서울여자대학교 자연과학대학 화학과

(Received October 12, 1992)

Physicochemical Properties and Antibacterial Activities of Metal Complexes of Norfloxacin

Won-Bong Park*, Kyung-Ah Kim, Myung-Hwan Lee, Dong-Sun Lee and Dong Yoon Rho
Department of Chemistry, Seoul Woman's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract—Norfloxacin complexes of Fe^{2+} , Cu^{2+} and Al^{3+} have been prepared as solids. The stoichiometry of the complexes has been established. IR investigation indicates the metal-ligating sites in norfloxacin. The bioactivities of complexes all lower than that of norfloxacin. The solubilities and partition coefficients have been measured as a function of temperature. The data are used to evaluate the thermodynamic parameters ΔG , ΔH , ΔS for the solute transfer process and compared with the parent quinolone, norfloxacin. The existence of such complexes is discussed in the light of quinolone mode-of-action theories.

Keywords □ Norfloxacin complex, physicochemical properties, mode-of-action.

Quinolone 항균제는 1-substituted 1,4-dihydro-4-oxo-pyridine-3-carboxylic acid 모핵을 갖는 화합물로서 nalidixic acid와 같은 초기화합물은 요로감염증 치료에 국한되어 사용되었다. 그러나 N-1, C-6, C-7, C-8 위치의 치환기를 변화시킨 결과(특히 C-6 위치는 플루오르로, 그리고 C-7 위치는 piperazine 유도체로), 많은 우수한 항균제들이 개발되었다.¹⁻³⁾

Quinolone 항균제는 DNA gyrase(topoisomerase II)의 A-subunit의 기능을 억제하여 선택적으로 DNA의 합성을 방해하여 항균력을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 그러나 약물이 세포막을 통과하여 작용점인 DNA gyrase까지의 경로는 잘 알려져 있지 않다.⁴⁻⁶⁾

8-Hydroxy quinolone(oxine)은 Cu, Cd, Zn, Mg 등의 금속이온과 침전형의 착물을 형성하고, Al, Fe, Cr, Pb, Sn 등의 금속이온과는 가용성 착물을 형성

하는 리간드로 작용하기 때문에 이들 금속의 착화제로 알려져 있으며 금속을 분리하는 방법으로도 많이 사용되고 있다.^{7,8)} 그러므로 oxine과 유사한 구조를 지녔으며 4-oxo-3-carboxylic acid가 갖는 구조적 특징으로 보아 이온화된 형태에서 quinolone 화합물은 양이온과 착화합물을 형성할 가능성이 있는 것으로 추측된다.⁹⁾ 또한 배양액에서 금속이온의 존재로 인하여 quinolone의 항균력이 감소한다는 보고도 있으며^{10,11)} Nakano는 Al, Mg, Ca이온과 nalidixic acid가 상호 반응함을 시험관내에서 증명했다.¹²⁾

본 연구에서는 quinolone 화합물의 하나인 norfloxacin의 금속착물을 화학적으로 합성하여 착물의 물리화학적 성질 및 열역학적 함수들을 산출하고, 항균력의 변화를 측정하여 quinolone 화합물의 항균작용기전을 밝혀보고자 하였다.

실험방법

시약—Norfloxacin은 대웅제약에서 제공받았으며,

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로

착물합성용 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O} \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ 및 기타 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

착물의 조성비 결정—2 mM norfloxacin 수용액 5 ml(Al인 경우에는 4~16 ml)에 2 mM 금속수용액 1~10 ml를 가하여 착화합물을 형성시킨 후, 흡광도 ($\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$)를 측정하였다. 흡광도의 증가가 정지하는 지점에서 norfloxacin과 금속과의 조성비를 결정하였다. 이때 HNO_3 와 NH_3 수용액을 사용하여 Fe^{3+} 와 Al^{3+} 용액은 pH 3.00으로, Cu^{2+} 용액은 PH 7.00으로 조정하였으며, 1 mM NaNO_3 수용액으로 이온 세기를 조정하였다.

착물의 합성—각각의 2 mM 금속이온 수용액 10 ml에 각 조성비에 해당하는 norfloxacin의 양을 넣고 교반시킨 후 0.1 M NaOH 수 ml를 가하여 반응을 완결시켰다. 반응완결 용액을 감압하에서 부피가 1/2이 되도록 농축시킨후 아세톤을 가하여 4°C에서 24 시간동안 결정화하여 아세톤으로 재결정하였다. 원심분리에 의하여 분리된 결정은 에테르로 세척하여 건조시켰다.

용해도 및 물/n-옥탄올계에서의 평형분배계수의 측정—용해도 및 분배계수 측정을 위한 norfloxacin과 각각의 금속착물의 농도는 UV-분광광도측정법 측정을 위한 norfloxacin과 각각의 금속착물의 농도는 UV-분광광도측정법($\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$)에 의하여 측정하였다. 용해도는 pH의 영향을 받으므로 인산나트륨 완충용액(pH 6.98)을 용매로 하여 측정하였으며 분배계수 측정시 물과 n-옥탄올은 상호포화되므로 검량선 작성용 용매는 0.1 N 인산나트륨 완충액(pH 7.2)과 n-옥탄올을 상호포화시킨 후 물층을 취하여 사용하였다.

항균실험—사용균주는 *Escherichia coli*(KCTC 1923)이었으며 항균제의 최소저지농도는 agar dilution method¹³⁾에 의하여 측정하였다.

실험결과 및 고찰

착물의 조성비—몰비법으로 구한 착물의 조성비는 Fe^{3+} -norfloxacin와 Cu^{2+} -norfloxacin의 경우는 1:1 Al^{3+} -norfloxacin의 경우는 1:3이었다. 이와 같은 결과는 quinolone계 화합물과 금속이온과의 상호작용 실험에서 보고된 결과와도 일치하고 있다.^{9,11,12)}

녹는점 및 색의 변화—Norfloxacin은 mp 227°, 담

홍색이었고 착물 형성후, Fe^{2+} -norfloxacin은 mp 320°, 적색, Cu^{2+} -norfloxacin은 mp 258°, 청색, 그리고 Al^{3+} -norfloxacin은 mp 254°, 황색으로 변화하였다.

분광학적 실험—합성된 세 가지의 금속화합물과 norfloxacin에 대한 IR-스펙트럼을 비교, 분석한 결과, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}(\text{C}=\text{O})$ 진동수는 다음과 같다.

norfloxacin ; 1723.2 cm, Fe^{2+} -norf ; 1633.8 cm⁻¹

Cu^{2+} -norf ; 1631.9 cm⁻¹, Al^{3+} -norf ; 1633.8 cm⁻¹

Norfloxacin의 4-oxo-3-carboxylic acid 활성부위에서, C=C 결합과 접합된 C-4 위치의 oxo기와 카르복시기 내의 C=O기가 1723.2 cm⁻¹에서 흡수진동띠를 나타내고 있다. 그러나 금속과 착화합물이 형성되면서 3-카르복시기는 카르복시이온이 되고 전자 비편재화 효과에 의하여 C=O기에 의한 진동수가 감소하게 된다(1631.9, 1633.8 cm⁻¹). C-4에 결합되어 있는 oxo기도 이 효과에 의하여 진동수가 감소하여 나타나고 있다.

이와 같은 결과는 norfloxacin과 금속 착화합물에 대한 자외선-가시 스펙트럼을 비교하여도 쉽게 알 수 있다. Norfloxacin의 경우 324 nm에서 최대 흡수띠를 나타내고 있으나 착화합물이 형성되면서 이 흡수띠가 짧은 파장쪽으로 이동을 하게 된다. Cu^{2+} -norf의 경우 최대흡수 가 38 nm에서 나타나며, norfloxacin에서 shoulder를 나타내는 흡수띠도 320 nm로 청색이동이 되고 강도도 증가되어 나타나고 있다. 이러한 흡수 스펙트럼의 변화는 norfloxacin과 금속이온과의 상호작용을 의미하고 있으며, 적외선 스펙트럼의 결과에서 본 바와 같이 4-oxo-3-carboxylic acid 활성부위와의 상호작용을 예측할 수 있다.

용해도—Norfloxacin과 금속화합물의 물(phosphate buffer, pH 6.98)에 대한 용해도 측정결과는 Table I과 같으며 %(w/v)로 나타냈다. Norfloxacin 및 모든 금

Table I—Solubilities (% w/v) of norfloxacin and norfloxacin-metal complexes in phosphate buffer (pH 6.98) as a function of temperature

T(°K)	Norfloxacin	Fe^{3+} -norf	Cu^{2+} -norf	Al^{3+} -norf
288	0.028	0.022	0.025	0.072
293	0.059	0.036	0.029	0.085
298	0.069	0.037	0.032	0.124
303	0.070	0.037	0.040	0.169
308	0.079	0.039	0.050	0.176

Table II—Mean values for K_D and $-\ln K_D$ of norfloxacin and norfloxacin-metal complexes as a function of temperature for the system water/*n*-octanol

Temperature (°K)		288	293	298	303	308
Norfloxacin	K_D	0.057	0.196	0.214	0.236	0.256
	$-\ln K_D$	2.865	1.629	1.542	1.444	1.363
Cu^{2+} -norf	K_D	0.142	0.214	0.339	0.389	0.358
	$-\ln K_D$	1.952	1.542	1.082	0.944	1.027
Al^{3+} -norf	K_D	0.038	0.131	0.351	0.465	0.536
	$-\ln K_D$	3.270	2.033	1.047	0.766	0.624

Table III—Values of the derived thermodynamic parameters, ΔG , ΔH , and ΔS for the transfer of norfloxacin and norfloxacin-metal complexes from water to *n*-octanol

Complex	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹)
Norfloxacin	3.187	13.16	32.83
Cu^{2+} -norf	2.668	44.06	138.90
Fe^{3+} -norf	2.599	93.37	304.60

Table IV—MIC of norfloxacin and norfloxacin-metal complexes for *Escherichia coli*

Complex	MIC ($\mu g\ ml^{-1}$)
Norfloxacin	0.098
Fe^{3+} -norfloxacin	1.333
Cu^{2+} -norfloxacin	0.889
Fe^{3+} -norfloxacin	1.333

속착물의 용해도는 온도가 상승함에 따라 증가하였으며 Fe^{3+} 및 Cu^{2+} 의 착화합물은 norfloxacin보다 용해도가 감소하였으나 Al^{3+} 의 착화합물은 용해도가 증가하였다.

평형분배계수—Norfloxacin과 각 착물들의 물/*n*-octanol계에서의 평형분배계수 K_D 는 Table II와 같으며 이에 의하여 산출된 열역학적 함수는 Table III과 같다. 온도가 상승함에 따라 K_D 값도 상승하고 있으며 특히 Al^{3+} -norfloxacin의 경우에는 norfloxacin보다 물에 대한 용해도가 큼에도 불구하고 *n*-octanol로의 분배계수가 크게 나타나는 것은 흥미로운 결과이다. 또한 norfloxacin과 그 금속착물들의 두 용매사이에서의 평형분배반응은 모두 비자발적 흡열반응이며 엔트로피는 증가하는 반응으로 분배반응으로 자발성이 온도에 의해 결정됨을 알 수 있다. 특히 금속착물의 경우에는 norfloxacin의 경우보다 엔트로피의 값이 훨씬 크게 나타났다.

항균력—*Escherichia coli*에 대한 norfloxacin과 각 금속착물의 항균력 측정결과는 Table III과 같다. *E. coli*에 대한 항균제의 MIC는 착물이 형성됨에 따라 10~13배가량 증가하는 것으로 보아 항균력이 현저히

감소함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 Smith¹⁰⁾의 결과와도 유사하며 norfloxacin의 작용기전 규명에 좋은 정보를 제시하고 있다. 이는 norfloxacin이 세균의 세포에 침투되기 전에 norfloxacin-metal 착물을 형성하여 norfloxacin의 활성을 감소시키는 것으로 추측된다.

세균 중 그람음성세균의 outer membrane(OM)은 약물의 침투에 대한 투과장벽 역할을 하며 이 장벽을 투과하는 능력은 항균력을 결정하는 주된 요인이 된다.¹⁴⁾ 친수성이며 크기가 작은 quinolone계 항균물질들은 *E. coli*의 OM에 존재하는 친수성인 outer membrane protein(OmpF)을 통하여 세포내에 침투하는 것으로 알려져 있다. 한편 Chapman은 quinolone 항균제가 lipopolysaccharide와 다리결합을 형성하여 OM을 안정화시키는 2가 양이온(Mg^{2+})과 착물을 형성하여 소수성을 증대시켜 소수성 경로인 inner membrane(IM)으로 노출시켜 OM을 불안정화시키고 동시에 투과성을 증가시켜 항생제가 확산되도록 하는 nonporin 경로에 의하여 세포내에 침투된다고 하였다.¹⁵⁾ 또한 Mg^{2+} 는 quinolone의 활성을 저하시키며 EDTA는 상승시킨다는 보고도 있는데¹⁶⁾ 이는 Mg^{2+} 가 OM을 안정화시켜 quinolone의 침투를 억제시키거나 또는 quinolone과 금속착물을 형성하여 quinolone의

활성을 저하시키기 때문이라고 추측할 수 있으며 한편, EDTA는 OM의 Mg^{2+} 과 착물을 형성하여 OM을 불안정화시키고 소수성을 증가시켜 항균제의 침투를 용이하게 해주었기 때문이라고 생각된다.

임상적으로도 4-oxo-3-carboxylic acid 부위가 항균 활성에 필수적이라고 생각되는 quinolone 제제의 2가 양이온과의 착물형성 가능성을 보여주는 몇 가지 보고가 있다.¹⁷⁻²⁵⁾ 즉, quinolone 제제를 Al^{3+} , Mg^{2+} 가 포함된 제산제나 Fe^{3+} 을 함유한 빈혈치료제, Zn^{2+} 를 함유한 multivitamin 등과 겸용하면 항균력이 저하됨이 밝혀졌다. 그러나 항균력의 저하가 금속이온이 OM을 더욱 안정시키기 때문인지 아니면 약물이 세포내에 침투되기 이전에 quinolone-metal 착물을 형성하여 quinolone 활성을 저하시키기 때문인지는 밝혀지지 않고 있다. 그러나 본 실험결과로 미루어 볼 때 약물이 세균의 세포에 침투하기 이전에 착물을 형성하여 약물을 활성을 저하시키는 것으로 생각된다. 따라서 이와 같은 결과는 우수한 항균력을 지닌 quinolone 제제의 개발에 참고가 되리라 생각되며 또한 임상적으로 quinolone 제제를 다른 약물과 겸용시에도 많은 도움이 되리라 생각된다.

결 론

1) Norfloxacin은 Fe^{3+} , Cu^{2+} 과 1 : 1의 착물을 형성하고, Al^{3+} 과는 1 : 3의 착물을 형성하였다. 이때 4-oxo-3-carboxylic acid 부위가 활성화되어 금속과 착물을 형성하였다.

2) Al^{3+} -norfloxacin은 다른 금속착물과는 달리 norfloxacin보다 물(pH 6.98)에 대한 용해도가 증가했으며, 그 상대적 크기는 Al^{3+} -norfloxacin > norfloxacin > Fe^{3+} -norfloxacin > Cu^{2+} -norfloxacin이며, 온도에 따라 용해도가 증가하였다.

3) Norfloxacin과 그 착물들에 대한 분배계수 K_D 는 온도상승에 따라 점차 증가하며, 298 K 이상의 온도에서 그 상대적 크기는 norfloxacin < Cu^{2+} -norfloxacin < Al^{3+} -norfloxacin의 순이었다.

4) 평형분배계수 K_D 로부터 산출된 열역학적 함수로부터 모든 분배반응은 비자발적 흡열반응이며, 무질서도 증가하는 반응임을 알 수 있다. 특히 금속착물들은 norfloxacin보다 더 용이하게 n-옥탄올로 분배되고 있다.

5) Norfloxacin이 금속과 착물을 형성할 때 항균력이 저하되는 결과를 보였는데 이것은 norfloxacin이 *E. coli*의 바깥막에 존재하는 금속과 착물을 형성하기 이전에 금속착물을 형성했기 때문으로 추측된다.

감사의 말씀

본 연구는 1990년도 한국학술진흥재단 대학부설연구소 지원 학술연구조성비의 일부로 수행되었습니다.

문 헌

- 1) Park, W. B., Lee, Y. H., Kim, K. S., Pyun, H. E., Park, M. H. and Kim, W. J.: Characterization of ciprofloxacin, HK-3140, norfloxacin, ofloxacin resistant strains of *Escherichia coli*. *Korean Biochem. J.*, **25**, 134 (1992).
- 2) Wolfson, J. S. and Hooper, D. C.: The fluoroquinolones. Structures, mechanism of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **28**, 581 (1985).
- 3) Chu, D. T. W. and Fernandes, P. B.: Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 131 (1989).
- 4) Smith, J. T. and Lewin, C. S.: Chemistry and mechanism of action of quinolone antibacterials, In *The Quinolones* edited by V. T. Andriole, 23 (1989).
- 5) Wolfson, J. S. and Hooper, D. C.: Mechanism of action and resistance to quinolone antimicrobial agents, In *Quinolone Antimicrobial Agents* edited by J. S. Wolfson and D. C. Hooper, American Society for Microbiology, Washington, 5 (1989).
- 6) Nikanish, N., Yoshida, S., Wakebe, H., Inoue, M. and Mitsuhashi, J.: Mechanism of clinical resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1043 (1991).
- 7) 한희정 : Ferric 이온과의 착화반응에 의한 Fluoro-oxo-quinoline 유도체의 정량. 서울여자대학교 석사학위 논문 (1992).
- 8) 정국영 : 8-Hydroxyquinoline 유도체의 금속착물합성 및 안정도 상수에 관한 연구, 연세대학교 석사학위 논문 (1983).
- 9) Jelick-Stankov, M., Veselinovic, D., Malesev, D. and Radovic, A.: Spectrophotometric determination

- of perfloracin in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 1571 (1989).
- 10) Smith, J. T.: Effect of physiological cation concentration on 4-quinolone absorption and potency, In *The 4-Quinolones* edited by G. C. Crumplin, Springer-Verlag, London, U.K., 15 (1990).
 - 11) 류형원, 오봉경, 서정인, 송창화, 고동성 : Cu(II) 이온이 nalidixic acid의 DNA 상호작용에 미치는 효과. *한국생화학회지*, **24**, 368 (1991).
 - 12) Nakano, M., Yamamoto, M. and Arita, T.: Interactions of aluminum, magnesium and calcium ions with nalidixic acid. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1505 (1978).
 - 13) Hirari, K., Aoyama, H., Irikura, T., Iyobe, S. and Mitsuhashi, H.: Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherchia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**, 535 (1986).
 - 14) Nikaido, H.: Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 1831 (1989).
 - 15) Chapman, J. S. and Geokgopapadakou, N. H.: Routes of quinolone permeation in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 438 (1988).
 - 16) Hirschhorn, L. and Neu, H. C.: Factors influencing *in vitro* activity of two new aryl-fluoroquinolone antimicrobial agents, difloxacin (A-56619) and A-56620. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 143 (1986).
 - 17) Swanson, B. N., Boppana, V. K., Vlases, P. H., Rotmensch, H. H. and Ferguson, R. K.: Norfloxacin disposition after sequentially increasing oral doses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**, 284 (1983).
 - 18) Nix, D. E., Wilton, J. H. Ronald, B., Dislerach, L. Williams, V. C. and Norman, A.: Inhibition of norfloxacin absorption by antacids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 432 (1990).
 - 19) Flor, S., Guay, D. R. P., Opsahl, J. A., Tack, K. and Matzke, G. R.: Effects of magnesium aluminum hydroxide and calcium carbonate antacid on bioavailability of ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2432 (1990).
 - 20) Lomaestro, B. M. and Bailie, G. R.: Effect of staggered dose of calcium on the bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1004 (1991).
 - 21) Parpia, S. H., Nix, D. E., Hejmanowski, L. G., Goldstein, H. R., Wilton, J. H. and Schentag, J. J.: Sucralfate reduces the gastrointestinal absorption of norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 99 (1989).
 - 22) Polk, R. E., Healy, D. P., Drawl, J. S. L. and Raacht, E.: Effect of ferrous sulfate and multivitamins with zinc on absorption of ciprofloxacin in normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1841 (1989).
 - 23) Grasela, T. H., Scheentag, J. J., Sedam, A. J., Wilton, J. H., Thomas, D. J., Schultz, R. W., Lebsack, M. E. and Kinkel, A. W.: Inhibition of enoxacin absorption by antacid or ranitidine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 615 (1989).
 - 24) 신상구, 최강원, 장우현 : Quinolone 항균제의 임상 약리. *대한화학요법학회지* **6**, 69 (1988).
 - 25) 최강원, 오명수 : Ciprofloxacin의 임상효과. *대한화학요법학회지* **5**, 117 (1987).