J. Fd Hyg. Safety 14(1), 55 - 59(1999)

6-(4-요오도페닐)아미노-7-클로로-5,8-퀴놀린디온의 항진균작용 및 안전성 평가

유충규† · 윤여표[1] · 허문영[2] · 이병무[3] · 강혜영 · 이유진

이화여자대학교 약학대학, [1]충북대학교 약학대학, [2]강원대학교 약학대학, [3]성균관대학교 약학대학

The Evaluation of Antifungal Activities and Safeties of 6-(4-Iodophenyl)amino-7-chloro-5,8-quinolinedione

Chung-Kyu Ryu†, Yeo-Pyo Yun[1], Moon-Young Heo[2], Byung-Mu Lee[3], Hye-Young Kang and You-Jin Yi

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

[1]College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

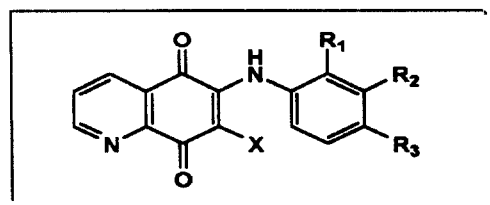
[2]College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

[3]College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Kyunggi-Do 440-746, Korea

ABSTRACT — 6-(4-Iodophenyl)amino-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK9) was evaluated for antifungal activities. The MIC values of RCK9 were determined against *A. flavus, C. albicans, C. neoformans* and *F. oxysporium*. The RCK9 showed generally potent antifungal activities against the tested fungi. Acute oral toxicity studies of RCK9 were carried out in ICR mice of both sexes. These acute oral toxicities of RCK9 were low and LD_{50} values were over 2,850 mg/kg in ICR mice. The genotoxicities of RCK9 had been evaluated. RCK9 was negative in Ames test with *Salmonella typhimurium* and chromosomal aberration test in CHL cells. The clastogenicity was tested on the RCK9 with *in vivo* mouse micronucleus assay. RCK9 did not show any clastogenic effect in mouse peripheral blood and was negative in mouse micronucleus assay. The results indicate that RCK9 has no genotoxic potential under these experimental conditions.

Key word □ 6-(4-Iodophenyl)amino-7-chloro-5,8-quinolinedione, Antifungal, Acute toxicity, Ames test, Chromosomal aberration test, Micronucleus assay

식품보존제, 화학요법제, 농약 등으로 사용할 수 있는 새로운 작용 기전의 항진균제를 개발하기 위하여 quinone 물질을 합성하여 생리활성을 검색한 결과 quinolinedione 유도체가 우수한 항진균작용을 가지며 작용기전이 기존의 항진균제와 다르다는 것을 알았다.[1,2] 특히 quinolinedione 유도체 중 6-(halophenyl)amino-7-halo-5,8-quinolinedione (RCKs, Fig. 1)이 우수한 항진균 작용을 보여주었다.[2] 본 연구자는 RCKs 유도체 중 일부의 항진균작용 및 유전독성을 시험한 결과 항진균작용도 우수하고 안전성도 높은 것으로 평가되었다.[3-6] 그래서 RCKs 유도체의 항진균제 후보 물질로서의 개발 가능성을 계속 연구하기 위해 6-(4-iodophenyl) amino-7-chloro-5,8-quinolinedione(RCK9, Fig. 1)의 항진균



RCKs : X = Cl, Br; R = F, Cl, Br,..

RCK9 : X = Cl; R_1= R_2= H, R_3 = I

Fig. 1. Chemical structure of RCKs.

작용 및 안전성을 시험하였다. 항진균력을 평가하기 위하여 전보[2]에 실험 보고하지 않은 균주를 이용하여 MIC(minimum inhibition concentration)를 측정하였다. 그리고 RCK9에 대한 안전성을 평가하기 위해 급성경구 독성,[7] Ames test,[8] 염

† Author to whom correspondence should be addressed.

색체 이상시험,[9] *in vivo* 소핵시험[10]을 행했다.

재료 및 방법

항진균 작용측정

(1) 시약 재료

RCK9를 전보[2]에 보고한 방법대로 합성하여 항진균작용 및 독성 시험에 사용했다. Mueller-Hinton broth, Sabouraud dextrose agar, BHI(brain heart infusion)는 Difco Co.(USA)에서 구입하였고, 그밖에 사용된 각종 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

(2) 전보[2]에 보고한 방법에 따라 각 화합물에 대한 MIC를 고체배지희석법으로 결정하였다. *Aspergillus flavus* KCTC 1375, *Candida albicans* KCTC1940, *Cryptococuss neoformans* KCTC 7224 및 *Fusarium oxysporium* KCTC 6051 균주를 사용했으며, Sabouraud broth에서 배양한 2×10^5의 균을 2배씩 단계적으로 희석한 검체를 넣은 Sabouraud agar에 이식하여 35°C에서 3일간 배양한 후 육안으로 판정하였다. 대조물질은 fluconazole과 ketoconazole을 사용하였다(Table 1).

Table 1. *In vitro* antifungal activities of RCK9

Compounds	MIC (μg/ml)			
	A. flavus	*C. albicans*	*C. neoformans*	*F. oxysporium*
RCK9	6.3	6.3	3.2	6.3
Fluconazole	25.0	12.5	12.5	25.0
Ketoconazole	25.0	25.0	12.5	12.5

[a] Fungi tested; *Aspergillus flavus* KCTC1375, *Candida albicans* KCTC1940, *Cryptococuss neoformans* KCTC7224 and *Fusarium oxysporium* KCTC6051. The inoculum sizes contained approximately 2×10^5 CFU/ml.

[b] Culture media tested was modified Sabouraud dextrose agar. MIC values were read after 3 days for *A. flavus, C. albicans, C. neoformans* and *F. oxysporium* at 35°C.

급성독성시험

전보[3,5]에 보고한 방법에 따라 SPF ICR계 생쥐를 사육하여, 군 분리 및 투여 용량의 설정, 시험물질 조제, 투여, 증상 관찰, 체중 측정, 부검 및 통계 처리하였다(Table 2, 3).

변이원성 시험(Ames test)

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98(유전적 특

Table 2. Mortality of male and female ICR mice treated orally with RCK9

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	2,850	6[a]/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/6	5/6	1[b]/6
	1,140	6/6	6/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	1/6
	456	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/6	5/6	1/6
	182	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	73	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
Female	2,850	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	1,140	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	456	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	182	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	73	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6

[a] survival rate

[b] final mortality

Table 3. Changes of body weight in ICR mice treated orally with RCK9

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment			
		0	1	3	7
		Mean±S.D.[a] (n)			
Male	2,850	25.31±1.38(6)	25.01±1.69(6)	30.74±1.34(6)	31.27±1.12(5)
	1,140	24.22±1.11(6)	26.16±2.06(6)	31.66±2.38(6)	31.76±2.06(6)
	456	27.02±1.42(6)	27.33±1.86(6)	31.33±1.32(6)	31.26±2.14(5)
	182	26.05±1.72(6)	27.00±1.76(6)	31.75±1.96(6)	32.12±1.87(6)
	73	26.01±0.89(6)	25.01±1.24(6)	31.73±0.98(6)	33.65±1.19(6)
	0	25.14±0.81(6)	26.66±1.80(6)	32.25±1.57(6)	33.65±1.23(6)
Female	2,850	21.06±1.11(6)	22.14±1.02(6)	24.83±1.60(6)	24.38±1.23(6)
	1,140	20.77±1.20(6)	21.40±1.05(6)	23.25±1.78(6)	25.10±1.91(6)
	456	22.27±1.28(6)	22.73±2.01(6)	24.33±2.46(6)	24.74±2.56(6)
	182	21.24±1.15(6)	21.67±1.12(6)	24.91±1.24(6)	25.13±1.07(6)
	73	20.63±1.23(6)	21.41±0.91(6)	25.00±1.18(6)	25.73±1.20(6)
	0	21.35±1.17(6)	21.31±1.14(6)	24.87±1.21(6)	25.49±1.12(6)

[a] unit; g/mouse

성 hisD3052, *rfa*, Δ*uvr*B, pkM101), TA100(hisG46, *rfa*, Δ*uvr*B, pkM101) 균주는 한국화학연구소로부터 인수하였다. 변이원성 시험 및 S-9 mix 제조는 Maron & Ames[8]법에 따라 전보[3,5]에서 보고한 방법과 동일하게 행했다. 음성대조물질은 용매인 DMSO를 사용하였고, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용 여부에 따라 2-aminofluorene(AF), sodium azide(SAZ) 등을 사용하였다(Table 4).

염색체 이상시험

RCK9에 대해 전보[3,5]에 보고한 방법에 동일하게 chinese hamster lung fibroblast(CHL)을 사용하여 시험하고 결과 판정하였다. 양성대조물질로서는 mitomycin C(MMC)를 사용하였다(Table 5).

생쥐 소핵시험(Mouse micronucleus test)

전보[3,5]에 보고한 방법에 따라 6~8주령의 20~25 g의 수컷 ICR 생쥐를 사육하여, 군 분리 및 투여 용량의 설정, 시험물질 조제, 투여, 혈액 채취, 도말표본 제작 및 통계 처리[10]하였다. 양성 대조 물질은 MMC를 사용하였다(Table 6).

Table 4. Reversion assay of RCK9 using *Salmonella typhimurium*

Sample	Dose (μg/plate)	His$^+$ Revertants/plate			
		TA98		TA100	
		S-9(-)[a]	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)
Control	DMSO	39±2	42±3	110±5	131±6
RCK9	31.25	55±7	68±7	104±9	117±3
	62.5	75±3	74±5	135±8	214±3
	125	76±5	75±2	175±4	156±6
	250	71±4	86±4	115±7	186±11
SA[b]	0.5	430±30		1300±120	
B(a)p[b]	2.0		145±10		380±15

[a] S-9(-): without S-9 mix; S-9(+): with S-9 mix
[b] SA (Sodium azide) and B(a)p [Benzo(a)pyrene] were used as positive controls for the corresponding strains

Table 6. The clastogenic effects of RCK9-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Treatment[c]	MNRETs/1000 RETs[a,b]	
	individual value	Mean±S.E.
MMC[d]		
1 mg/kg	20, 22, 21, 19, 14	19.2±1.39
RCK9		
31.25mg/kg	0, 0, 1, 1, 0	0.4±0.24
62.25 mg/kg	0, 1, 0, 0, d[e]	0.3±0.25
125 mg/kg	1, 0, 2, 1, 1	0.6±0.24
250 mg/kg	0, 1, 0, 2, d	0.8±0.48
500 mg/kg	2, 0, 0, 0, 1	0.6±0.40

[a] MNRET: micronucleated reticulocytes, RET: reticulocytes
[b] MNRETs/1000 RETs of negative control mice treated with olive oil (1 m*l*/25 g, intraperitoneally once) only was 0.8 ±0.24 after 48 hrs treatment
[c] MMC (1 mg/kg) and RCK9 were administered to mice intraperitoneally. Mice were sacrificed after 48 hrs of RCK9 treatment
[d] MMC was used as positive control
[e] d: dead

결과 및 고찰

항진균작용 평가

새로운 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위해 RCK 9에 대하여 항진균작용을 검색하였다(Table 1). *A. flavus, C. albicans, C. neoformans* 및 *F. oxysporium* 균주에 대하여 측정한 MIC는 대조 약물인 fluconazole과 ketoconazole보다 우수하였다. RCK9은 6.3 μg/m*l*에서 시험한 네 가지 균주에 대해 완전히 진균성장을 억제하였다. 한편 대조 약물인 ketoconazole은 진균에 대해 25 μg/m*l*에서 진균 성장 억제를 하였다. 전보에서 RCK9은 *Candida* sp.에 대하여도 우수한 진균작용을 보여 주었다. 이상과 같이 항진균작용을

Table 5. Chromosome aberration test of RCK9 with CHL cells

Compound	Dose (μg/m*l*)	Treatment time (hrs)	Frequencies of aberrant cells						Cells scored
			gap[a]	ctb	cte	csb	cse	nor	
DMSO			1	0	0	0	0	99	100
RCK9	0.391	24	3	0	0	0	1	97	100
	0.195	24	2	0	0	0	0	98	100
	0.098	24	2	0	0	0	0	98	100
MMC[b]	0.200	24	15	2	16	5	11	52	100

[a] gap: chromatid & chromosome gap; ctb: chromatid breakage; cte: chromatid exchange; csb: chromosome breakage; cse: chromosome exchange; nor: normal.
[b] MMC (Mitomycin C) was used as positive control.

검색한 결과를 종합하면, RCK9는 넓은 스펙트럼의 항진균 작용을 갖고 있다고 사료된다.

안전성 검색

RCK9에 대해 급성독성시험을 했다. 약 8주령의 생쥐에 RCK9를 경구 투여한 결과 수컷의 최고용량군 1마리가 투여 후 5일에 사망하였다(Table 2). 사망한 동물을 부검한 외관상의 소견에서는 별다른 증상을 나타내지는 않았다. 최고용량군(2850 mg/kg)에서 약물투여 후 RCK9의 생쥐에 대한 1회 경구투여 사망 예는 456 mg/kg 용량군에서도 나타나서 투여용량군에 관계없이 나타나는 것으로 추정되며, 또한 일반 증상에도 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으므로 약물의 독성에 기인한 현상이라고 보기에는 어려워 앞으로 흰쥐에 대한 급성독성 및 아급성독성시험을 추가로 조사하여야 할 것으로 사료된다. 또한 모든 실험동물에서 투여 후 7일까지 약물에 기인한 외관상 임상상태의 변화 및 중독증상은 발견되지 않았다.

체중 측정 결과 시험물질 투여군은 수컷, 암컷 모두가 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않았다. 단 시험물질 투여군과 대조군에서 약간의 사하증상을 보이는 예가 있었다(Table 3). 이상과 같이 RCK9의 생쥐에 대한 급성경구독성시험에서 상기의 일반 상태, 체중변화 및 부검 소견 등에는 별다른 독성이 관찰되지 않았으나 앞으로 이들에 대한 아급성 시험 및 흰쥐에 대한 급성독성 시험을 추가로 시행하여야 정확한 독성을 평가할 수 있으리라고 본다.

RCK9에 대해 *Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)을 행했다. 예비독성시험에서 결정된 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도 20 mg/plate를 공비 2로 7단계로 설정하여 평판법으로 시험하여 Table 4의 결과를 얻었다. 시험결과 RCK9는 대사활성계 존재 유무와 관계없이 Ames test에서 음성으로 나타났다.

RCK9의 염색체이상시험 결과를 각각 Table 5에 나타내었다. 세포독성시험에서 결정된 최고농도인 3.91 μg/ml로부터 공비 2로 3단계의 농도에서 시험한 결과, RCK9에서는 모든 시험농도에서 3% 이하의 염색체이상 빈도를 나타내므로 음성으로 확인되었다. 용매 대조군에서는 약 3% 이하의 염색체이상 빈도를 보였고, 양성대조군에서도 염색체이상 유발물질에 의하여 50% 이상의 염색체이상을 유발하여 본 시험이 적합하게 실시되었음을 보여주었다. 세포독성시험 및 본시험에서 시험물질의 처리 시간은 24시간으로 하였다. 이 시험의 결과, RCK9는 같은 농도에서 염색체이상을 3% 이하로 유발하므로 음성을 나타내서 유전 독성중 염색체이상 유발성은 없는 것으로 생각된다.

RCK9에 대해 생쥐 소핵시험에 의한 유전독성 시험을 행했다. 양성대조물질로 사용한 MMC의 1 mg/kg(i.p.)에서의 MNRETs 생성빈도는 투여 후 48시간에서 가장 높은 소핵생성 빈도를 나타낸다.[10] 따라서 MMC투여에서 나타난 최대생성 빈도를 나타내는 48시간에 혈액을 채취하여 MNRETs를 관찰하였다. 본 시험에서 RCK9의 투여농도는 예비시험으로부터 최고투여량을 500 mg/kg로 결정하였고, 혈액채취 시간은 48시간에 생쥐 꼬리정맥으로부터 말초혈액을 채취하여 표본을 만들어 관찰하였다. 소핵을 가진 망상적혈구의 출현빈도에 있어서 양성대조군으로 사용한 MMC는 Hayashi 등[10]의 데이터와 유사하였으며 용매대조군(올리브유)에서는 일반적인 음성대조군의 소핵생성 빈도를 나타내었다(Table 6). 5단계의 용량에 걸쳐 시험한 결과 대부분의 용량에서 음성대조군에 비해 유의성있는 증가가 나타나지 않았다. 이상의 결과로서 RCK9는 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성빈도가 증가하지 않는 것으로 보아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

이 연구는 97년도 보건복지부 신약개발 지원연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

국문요약

6-(4-Iodophenyl)amino-7-chloro-5,8-quinolinedione(RCK9)의 항진균작용과 안전성을 평가하기 위해 항진균작용시험, 급성독성시험, 변이원성 시험, 소핵시험, 염색체이상시험을 행했다. *A. flavus, C. albicans, C. neoformans* 및 *F. oxysporium*에 대하여 측정한 MIC는 대조 물질 fluconazole과 ketoconazole보다 우수하였다. RCK9는 우수한 항진균 작용을 갖고 있다고 사료된다. RCK9의 급성경구독성을 평가하기 위하여 ICR계 생쥐에 2,850 mg/kg를 투여 가능 최대용량으로 경구 투여한 후 7일 동안 급성경구독성시험에서 일반 증상, 체중변화 및 부검 소견 등에 유의성있는 다른 독성이 관찰되지 않았으며 $LD_{50치}$는 약 2,850 mg/kg 이상이라고 평가되었

다. RCK9대해 *Salmonella typhimurium*(TA98, TA100)을 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)을 한 결과에서 음성으로 나타났다. RCK9에 대해 CHL에 대해 염색체이상시험 결과는 음성인 것으로 판단된다. RCK9에 대해 *in vivo* 수준에서 생쥐소핵시험에 의한 유전독성을 평가하였다. RCK9는 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성이 나타나지 않아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bowman, C.M., Porter, T.H., Skelton, F.S. and Folkers, K.: 5,8-Quinolinequinone analogs which inhibit mitochondrial succinoxidase. *J. Med. Chem.* **14**, 206-209 (1973).
2. Ryu, C.K. and Kim, H.J.: The synthesis of 6-(N-arylamino)-7-chloro-5,8-quinolinedione derivatives for evaluation of antifungal activities. *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 139-144 (1994).
3. Ryu, C.K., Kim, D.H. Yun, Y.P., Heo, M.Y., Lee, B.M., Jang, S.J. Kim,. H.J. and Park, Y.M.: The evaluation of in vivo antifungal activities and toxicities of 6-[(N-4-chlorophenyl)amino]- 7-chloro-5,8-quinolinediones. *Yakhak Hoeji* **39**, 417-426 (1995).
4. Ryu, C.K., Heo, M.Y., Park, Y.M. and Yun, Y.P.; The evaluation of genotoxicities of antifungal 6-[(N-halophenyl) amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones. *J. Appl. Pharm.* **3**, 182-187 (1995).
5. Ryu, C.K., Kim, D.H. Yun, Y.P., Heo, M.Y., Kwon. S. M. and Chung, S.H.: The evaluation of antifungal activities and safeties of (N-2,4-dibromophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione, *J. Fd. Hyg. Safety* **11**, 299-306 (1996).
6. Ryu, C.K., Kim, D.H., Kwon S.M., Jung, S.H. and Kim, S.J.: *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of 6-[(N-4-bromo)amino]-7-chloro- 5,8-quinolinedione. *Arch. Pharm. Res.* **20**, 586-589 (1997).
7. Zbinden, G. and Flury-Roversi, M.: Significance of the LD_{50}-test for toxicological evaluation of chemical substances. *Arch. Toxicol.* **47**, 77-99 (1981).
8. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215 (1983).
9. Gulati, D.K., Sabharwaland, P.S. and Shelby, M.D.: Tests for the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Progress in Mutation Research* **5**, 413-426 (1985).
10. Hayashi, M.: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* **120**, 241-247 (1983).