

## 가교제를 이용한 Sulfanilamide 중합체의 합성과 항균특성

김종완 · 윤철훈 · 황성규 · 공승대 · 이한섭\*

명지대학교 화학공학과 · 용인대학교 환경보건학과\*  
(2000년 2월 8일 접수 ; 2000년 3월 30일 채택)

### Characterization of Antibacterial activity and Synthesis of Sulfanilamide Polymer using Crosslinking Agent

Jong-Woan Kim · Chul-Hun Yoon · Sung-Kwy Hwang · Seung-Dae Kong · Han-Seab Lee\*

Dept. of Chemical Engineering, Myongji Univ.

\* Dept. of Environmental Health, Yong In Univ.

(Received February 8, 2000 ; Accepted March 30, 2000)

**Abstract** : Drug delivery system(DDS) have been actively studied for the past twenty years. Dual action agents are unique chemical entities comprised of two different types of antibacterial compounds covalently linked together in a single molecule in such a way that both components are able to exert their bactericidal properties. In spite of the advent of the antibacterial agent the sulfa agents are the most widely used antibacterial agent today. In this study, new antibacterials derivative was synthesized using glutaraldehyde such as crosslinking agent for the purpose of dual-action as DDS study. Antibacterial activity of these new synthetic derivative between their structures and activities were examined by disc diffusion method. As a result, new synthetic derivative exhibited the broad antibacterial activities against Gram(+) and Gram(-) bacilli. Especially, the antibacterial effect of new synthetic derivative against Gram negative(*Escherichia, coli*) was much stronger than that against Gram positive.

## I. 서론

약물의 개발은 많은 시간과 연구비가 투자되지만 큰 이익을 창출하는 고부가가치 산업이다. 이러한 의약품의 개발은 폭넓은 지식이 요구되어 국내 산업의 현실상 새로운 약물의 개발이 어려운 실정이다. 따라서 기존 약물의 투여방식을 개선함으로써 효율을 증대시키는 변형신약의 연구개발이 활발히 이루어지고 있다.<sup>1)</sup> 일반적으로 투여된 약물은 혈중 약물 농도에 비례하여 나타나므로 다양한 제제학적 기술로 혈중농도를 조절해야 한다. 따라서 약물을 가능한 작용부위에 선택적으로 작용할 수 있도록 생체내 약물의 거동을 각종 기술을 이용하여 제어할 필요가 있다. 즉 약물의 부작용을 줄이고 효능을 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 제형을 DDS라하며 이것은 크게 화학적인 제어와 확산 제어 시스템으로 나눌 수 있다.<sup>2,3)</sup> 화학적인 제어 시스템으로는 약물이 고

분자 주쇄에 화학적으로 결합되어 있어 약물이 가수분해나 효소분해로 통해서 방출하게 되는데 이 같은 고분자 약물운반체를 polymeric prodrug 또는 polymer drug이라 한다. Polymer drug은 약물을 고분자 주쇄에 결합시킴으로써 체내에서 약물의 배설 시간의 조절이 가능하며 장시간에 걸친 방출조절이 가능하게 되며 약물의 흡수력을 조절하여 약물을 필요로 하는 특정 세포에만 선택적으로 약물을 분배시킬 수 있다.<sup>4)</sup> 고분자를 이용한 polymer drug이 항균력에 미치는 영향을 알아보면, 일반적으로 저분자 의약품의 경우에는 분자의 구조가 변화할 때 약리 활성이 증가하거나 반대로 감소하는 현상을 볼 수 있으며 고분자 약물에서도 예외는 아니어서 이러한 현상이 일어날 수 있다.<sup>5)</sup> Hodnett<sup>6)</sup>은 acrylic acid와 isobutyl vinyl ether의 중합체가 항중양성을 갖고 있음을 보고하였으며 Smith와 Marshall<sup>7)</sup>은  $\beta$ -락탐계 항생물질만을 사용하여 중합체를 합성하였는데 이들은 박테리아에 대한 항균 실험에서 항균력

을 보여주지 못하였다. 또한 Ascoli 등<sup>9)</sup>은 nitrofuran polymer drug을 합성하여 종전의 nitrofuran단위체인 1-(5-nitro-2-furfurildineamino)hydantoin의 항균력과 지속성을 비교하였는데 항균력은 거의 비슷하였고, 랫드에서의 약물 배설량 실험결과에 의하면 지속성이 3배 이상이라고 보고하였다.

본 연구에서는 기존의 항균제에 synthetic handle 또는 중합 가능한 관능기를 도입하여 중합하는 방법으로서 설파제의 일종인 sulfanilamide에 가교제인 glutaraldehyde를 이용하여 가교중합체로 합성하고 in vitro에서의 분해거동과 이에 대한 항균특성을 측정하여 polymer drug으로서의 가능성을 확인하여 보았다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

#### 1-1 시약

sulfanilamide 및 phosphate buffered saline(이하 PBS)는 Sigma사의 특급 시약을 사용하였고 dimethyl sulfoxide(이하 DMSO)는 Kanto사 제품을, glutaraldehyde(이하 GA)는 TCI사 제품을 사용하였다. 그 밖의 tetrahydrofuran(이하 THF), 초산, 에탄올 등의 용매는 국산 시약을 재증류하여 사용하였으며 증류수는 millipore사의 Milli-Q reagent water system을 사용하여 처리한 초순수를 사용하였다.

#### 1-2 기기

합성물의 분석과 확인은 다음의 기기와 분석방법을 이용하였다. 합성물 확인은 Bio-RAD사의 FTS형 FT-IR을 사용하여 측정하였으며 NMR은 Jeol사제의 <sup>1</sup>H-NMR(300MHz)을 이용하여 측정하였다. 시차주사 열량법(differential scanning calorimeter, DSC)는 각각의 시료 양을 10.0mg을 취하여 질소기류 하에서 Shimadzu사의 DSC-50을 이용하여 측정하였다. In vitro에서 pH 7.4와 1.5에서의 분해거동을 확인하기 위하여 Shimadzu사제 UV-2401PC를 이용하여 200~320nm에서의 흡광도 값을 측정하였다.

#### 1-3 균주 및 배지

항균력 측정에 사용된 균주는 그람 양성균으로서 Staphylococcus aureus ATCC 6538P과 Streptococcus pyogenes ATCC 21059를 사용하였으며, 그람 음성균으로는 Escherichia coli ATCC 8739과 Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027을 국립보건원

에서 분양받아서 배양하여 실험에 사용하였다. 배지로는 Biolife사의 Tryptic Soy Broth Nutrient Agar를 사용하였고, 항균 시험에 이용되는 약물 회석용 완충용액은 0.1M phosphate buffer [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2.0g) + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(8.0g) + 초순수(1 l)]와 DMSO를 사용하였다.

### 2. 가교제에 의한 sulfanilamide 중합체의 합성

Sulfanilamide 12.0g(0.056M)을 DMSO 100ml에 용해한 후 GA 14.1g(0.035M)를 1시간에 걸쳐서 첨가하고 여기에 2.0% 초산수용액 100ml을 서서히 적하하여 110°C에서 4시간 환류 교반한 다음 다시 상온에서 2시간 교반하여 냉암소(-5°C)에 하루동안 보관하였다. 보관한 반응물에 초순수 100ml를 부어 생성된 결정을 THF에 녹여 회전증발기를 통해 여분의 불순물을 제거하고 에탄올과 증류수로 세척하였다. 회전증발기로 재결정 처리하고 50°C에서 진공 오븐과 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>을 사용하여 2일 동안에 감압건조(70cm Hg 진공)시켜 10.5g의 황토색 분말결정을 얻었다. 합성과정은 Fig.1에 나타내었다.

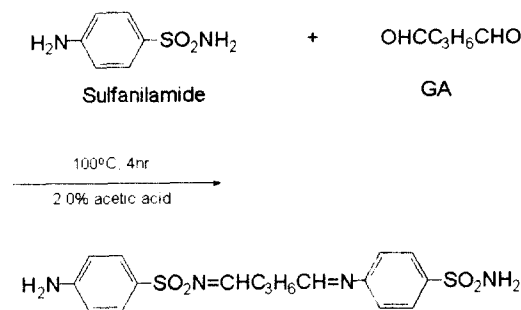


Fig. 1. Polymerization of sulfanilamide using glutaraldehyde.

### 3. 분해거동 측정

약물은 경구투여하면 식도를 통과하여 소화관을 이동하면서 약물을 방출한다. 소화관은 일정한 길이와 가지고 있기 때문에 약물이 이동하는 데는 일정한 시간이 소요되며, 또한 소화관 액의 pH는 산성, 약산성을 거쳐 알칼리성으로 변한다. 경구투여는 이러한 투여 경로를 이동하면서 약효를 발휘하고 주사제의 경우 혈관을 통해 전신으로 빠르게 확산되어 진다. 본 연구에서는 경구투여를 고려하여 위산과 유사한 조건으로 제조하기 위하여 1N HCl 수용

액을 이용하여 pH 1.5 완충용액을 제조하였고, 주사체에 의한 투여를 고려하여 혈장과 유사한 조건인 pH 7.4의 PBS용액으로 완충용액을 제조하여 사용하였다. 합성약물의 *in vitro*에서의 약리 활성구조에 이르는 분해거동을 확인하고자 각각 제조된 완충용액을 99.0ml을 삼각플라스크에 넣었다. 미리  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에 맞추어 놓은 항온조에 삼각플라스크를 넣어 온도평형이 이루어지게 하였다. 여기에 합성약물의 농도가  $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 stock solution인 DMSO 용액을 1.0ml가하여 그 농도가  $2.0 \times 10^{-7}\text{M}$ 이 되도록 한 후, 110rpm에서 sink condition을 유지하기 위하여 1.0ml 채취 후 즉시 1.0ml의 완충용액을 넣어 농도를 유지하고 사용한 약물의 최대 흡수파장( $\lambda_{\text{max}}$ )에서 시간에 따른 변화를 자외선 분광측정법에 의하여 측정하였다.

#### 4. 디스크 확산법에 의한 항균력 측정

항균력 측정 방법으로 임상적으로 그 타당성이 인정된 Bauer-Kirby 방법<sup>9)</sup>을 응용하여 실험하였다. Tryptic Soy Broth을  $121^\circ\text{C}$ , 1기압, 15min동안 멸균하고 분양 받은 4종의 냉동보관 균주를 배양기에서  $37^\circ\text{C}$  하루동안 배양하였으며 실험에 필요한 다른 도구들도 멸균하여 준비하였다. 배지를  $50 \sim 55^\circ\text{C}$ 로 식힌 후 petri dish에 10ml씩 분주하여 flow chamber에서 1시간정도 건조시킨 후 멸균된 면봉을 균 배양액에 충분히 적시어 표면이 건조된 배지 위에 골고루 접종하였다. 이 때 처음에는 전 표면에 한 방향으로 문질러 바르고 다시 되풀이하여 표면에 골고루 접종하였다. 균 접종이 끝난 petri dish에 합성한 가교 중합체를 적신 paper disc(Sigma co., 3mm)를 가볍게 눌러 고정시킨 후 30분 이내  $37^\circ\text{C}$  배양기에 18시간동안 배양시킨 후 판독하였다. 판독은 zone reader를 사용하여 디스크 직경을 포함한 발육억제대 직경을 18시간 후에 측정하였고 발육억제대 주변에 미약한 발육이나 작은 발육억제대안의 큰 집락이 생겼을 경우에는 계대배양(subculture)하고 재실험하여 clean zone을 측정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Sulfanilamide 중합체의 합성 확인

양말단기 1차 아민을 지닌 sulfanilamide를 DMSO 용매하에서 가교제인 GA를 이용하여 가교 고분자 중합형태로 합성하였다. 합성된 sulfanilamide 중합체

IR인 Fig. 2에서는 sulfanilamide의 1차 아민기가 GA의 알데히드기와 결합하여  $3300 \sim 3500\text{cm}^{-1}$  부근에서 방향족에 치환된 1차 아민의 특성흡수대가 2차 아민의 특성흡수대로 나타나며  $1650 \sim 1690\text{cm}^{-1}$  부근에서는 이민기의 특성흡수대가, GA의 지방족의  $\text{CH}_2$ 기의 특성흡수대가 생성됨을 확인하여 sulfanilamide 중합체의 합성을 확인하였다. Fig. 3 sulfanilamide 중합체의 NMR에서는 1차 아민기의 2H가 6.9ppm 부근에서 사라지고 GA의  $\text{CH}_2$ 기의 6H가 3.5ppm 부근에서 생성됨으로서 가교제의 의한 sulfanilamide 중합체가 합성됨을 확인하였다. Fig. 4(a)는 원물질인 sulfanilamide의 DSC thermogram을 나타낸 것으로  $166.0 \sim 167.0^\circ\text{C}$  부근에서 발열 피크를 나타내지만, (b)의 합성한 가교 중합체는  $268.0 \sim 270.0^\circ\text{C}$  부근에서 흡열 피크를 나타내 녹는점의 변화를 확인하였는데 이는 sulfanilamide의 중합에 의한 분자량 증가와 가교제인 GA의 가교반응에 다른에 따른 녹는점의 상승 때문이라고 생각된다.

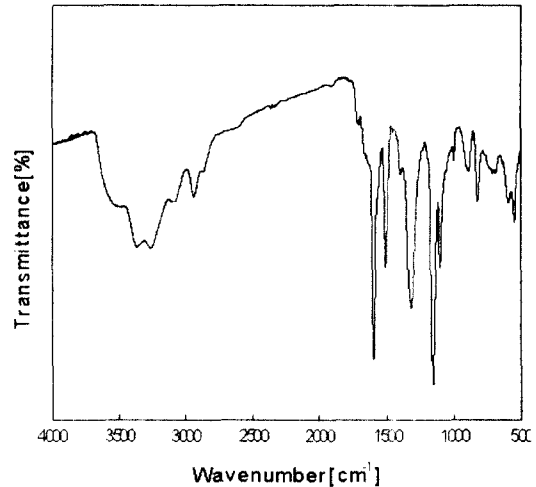


Fig. 2 IR spectra of sulfanilamide polymerization.

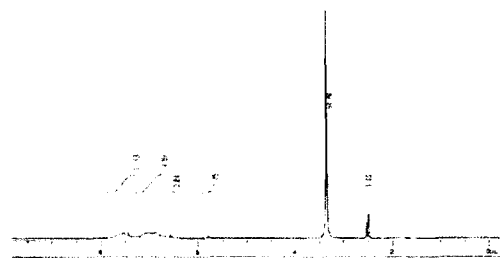


Fig. 3 NMR spectrum of sulfanilamide polymerization.

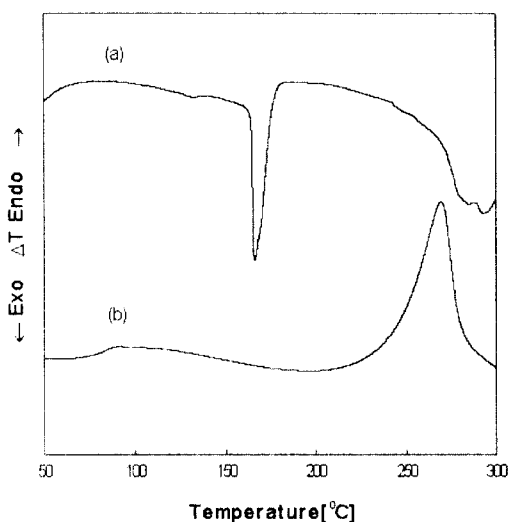


Fig. 4. DSC thermograms of sulfanilamide(a) and sulfanilamide polymer(b).

## 2. 분해거동

모든 약물은 방출, 흡수, 분포, 그리고 대사와 배설의 4단계를 거친다. 특히 경구제의 경우 약물의 대부분이 소장을 통해 혈액에 흡수된 후 간을 거쳐 심장으로 이동하여 전신으로 퍼지는 복잡한 흡수경로를 거친다. 그러나 간에서 대부분의 약물이 대사 작용을 일으켜 그 형태가 변하며 치료부위에 도달하기 전에 효능을 상실하게 되는 초회 통과효과 (first-pass effect)와 위산에 의해 손실로 주사제에 비하여 더 많은 양의 약물을 투여해야 한다. 우선 Fig. 5의 *in vitro*에서 주사제 형태로 혈액내 투여를 고려한 pH 7.4에서 합성약물의 분해거동을 확인해보면 일반적으로 지용성 약물인 설파제는 가수분해가 일어나지 않으나<sup>10, 11)</sup> 가교제에 의해 결합된 합성약물은 이민의 이중결합을 가지고 있어 6시간만에 각각의 원물질인 sulfanilamide와 GA로 분해되어지는 것을 흡광도 값의 증가로서 확인하였고 6시간 이후에는 원물질로 완전 분해되어 더 이상의 흡광도

증가를 보이지 않았다. 결과적으로 가교제인 GA에 의한 가교결합을 통하여 일정시간 동안의 약물 분

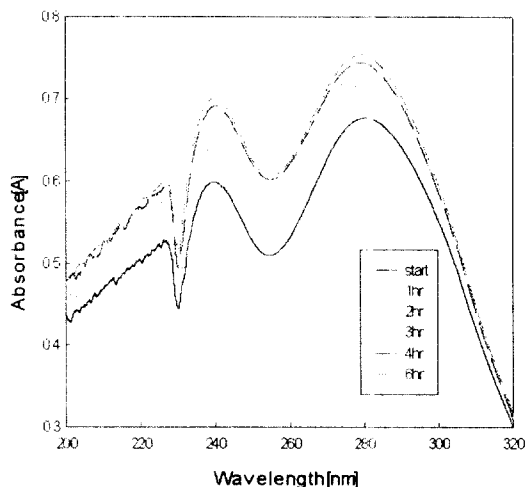


Fig. 5. UV spectra of sulfanilamide polymer concentration of  $2 \times 10^{-7} M$  with various time intervals at pH 7.4.

해 및 손실에 대한 지연성을 나타내어 준다고 생각된다. 방출제에 관여하는 생체내외의 변수는 시간, pH, 온도 및 기타 생물학적 인자에 의하여 영향을 받는데 본 연구에서 화학적인 결합을 통해 합성한 합성물의 경우 화학적인 결합에 의하여 소화관 통과시 위산에 의해 약물이 보호되어 대부분의 약물의 흡수가 일어나는 소장에 이르러 각각의 약리 활성 구조로 분해되어지는 지속성(duality)의 가능성을 확인하였다.

## 3. 항균력 측정

본 연구에서는 Bauer-Kirby방법<sup>9)</sup>을 응용하여 디스크의 지름을 포함한 clean zone을 측정하고 감수

Table 1. Disk susceptibility test of sulfanilamide polymer drug

Strain	Concentration ( $\mu g/ml$ )		
	1100	1200	1500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P Gram(+)	11.50 $\pm$ 1.73*	13.50 $\pm$ 0.58	14.50 $\pm$ 0.58
<i>Streptococcus pyrogenes</i> ATCC 21059 Gram(+)	14.80 $\pm$ 0.84	15.75 $\pm$ 0.50	16.9 $\pm$ 0.15
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 Gram(-)	16.40 $\pm$ 1.30	17.60 $\pm$ 0.55	18.60 $\pm$ 0.89
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 Gram(-)	14.60 $\pm$ 1.52	16.60 $\pm$ 0.54	18.40 $\pm$ 1.14

\*The values are mean $\pm$ S.D(n=3)

Fig. 6. Photographs of disk susceptibility test of 500(a), 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) on *Staphylococcus* and 500(c), 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d) on *Pseudomonas* by sulfanilamide polymer.

성 판단기준은 내성은 12.0mm 이하, 중등도 감수성은 13.0~16.0mm, 감수성은 17.0mm 이상으로 합성한 약물의 세균에 따른 감수성을 판단하였다.<sup>12)</sup> Table 1은 sulfanilamide 중합체의 디스크 확산법의 결과로 포도상구균은 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상이어야만 중등도의 감수성을 나타내지만 다른 균들은 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서도 감수성을 나타내었다. Fig. 6의 디스크 확산법에 의해 나타난 clean zone의 사진으로도 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서는 나머지 균들은 감수성을 나타내었으며 포도상구균에서만 감수성이 좋지 않은 것으로 나타났다. 결과적으로 그람 양성균 일부와 음성균에 감수성을 보였으며 이는 단일 설파제가 대체적으로 그람 음성균에서는 효과를 나타내지 못하나 합성한 sulfanilamide 중합체의 경우 다른 균들에 비하여 그람 음성인 대장균에 우수한 감수성을 나타내었다.

과을 사용하였으며, 그람 음성균으로는 과

#### IV. 결론

설파제의 일종인 sulfanilamide에 가교제인 glutaraldehyde를 이용하여 중합체로 합성하고 in vitro에서의 분해거동과 이에 대한 항균특성을 측정하여 polymer drug으로서의 가능성을 확인하여 보

았다.

1. 합성한 sulfanilamide 중합체는 sulfanilamide의 1차 아민기가 GA의 알데히드기와 결합하여 2차 아민기의 특성흡수대로 나타나며 결합된 GA의 지방족의 CH<sub>2</sub>기의 특성흡수대가 생성됨을 확인하여 중합체의 합성을 확인하였으며 녹는점의 변화를 확인하였는데 이는 중합에 의한 분자량 증가와 가교제인 GA의 가교반응에 다른에 따른 녹는점의 상승 때문이라고 생각된다.
2. 지용성 약물인 설파제는 가수분해가 일어나지 않으나 가교제에 의해 결합된 합성약물은 가수분해에 의한 흡광도 값의 증가를 확인하였고 가수분해 후에 원물질로 완전 분해되어 더 이상의 흡광도 증가를 보이지 않았으며 이는 가교제인 GA에 의한 가교결합을 통하여 일정시간 동안의 약물 분해 및 손실에 대한 지연성을 나타내어 준다고 생각된다.
3. 합성 약물은 그람 양성균 일부와 음성균에 감수성을 보였으며 이는 단일 설파제가 대체적으로 그람 음성균에서는 효과를 나타내지 못하나 sulfanilamide 중합체의 경우 다른 균들에 비하여 그람 음성인 대장균에 우수한 감수성을 나타내었다.

#### 참고문헌

1. Hitoshi Sezaki, 藥物送達法, 廣川書店, 日本, 225(1990).
2. J. G. L. Jones, "Drug Delivery Systems", Ellis Horwood Ltd., England, 11(1987).
3. W. Tune, "Drug Delivery Devices Fundamentals and Applications" Praveen, Tyle, Ed., Dekker, New York, Vol. 32, 213(1988).
4. D. K. Kweon, D. W. Kang, W. K. Kim, Polymer, 20(4), 675(1996).
5. 竹本喜一, 田伏岩夫, 醫藥高分子, 構談社, 日本, 235(1978).
6. E. H. Hodnett, Polymers as Antitumor Agents, Polymer News, 8(2), 23(1983).
7. H. Smith and A. C. Marshall, Nature, 232, 45(1971).
8. F. Ascoli, G. Casinit, M. Ferappi, and E. Tubaro, J. Med. Chem., 10(3), 97(1967).
9. Victor Lorian, M. D., Editor. Antibiotics in Laboratory Medicine, Third Edition, New York, 17(1980).

10. Bohne, Toxicology, chemotherapeutics and pharmacokinetics, *Chemotheraphy*, 14, 195(1969).
11. Shkadova, Solubility studies, *Farm. Zh.*, 24, 39(1969).
12. K. P. Klugma, *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 171(1990).