

Polyacrylic acid(PAA)-Sulfacetamide의 합성과 항균성

김종완 · 김용렬*† · 이우윤**

단석산업 기술연구소 개발팀
*대전대학교 이공대학 화학공학과
**인천대학교 자연과학대학 화학생물학부

Synthesis and Antibacterial Activity of Polyacrylic Acid (PAA)-Sulfacetamide

Jong Woan Kim, Yong Ryul Kim*† and U Youn Lee**

Department of Development, Research Institute of Technology, Dansuk Industrial Co. Ltd.

*Department of Chemical Engineering, Dae Jin University

**Division of chemistry and Biology, Natural Science, In Cheon University

(Received 5 February 2001 ; Accepted 20 February 2001)

ABSTRACT

Recently there were many studies not only to enhance drug delivery effect but to reduce side effect. Drug delivery system is able to improve efficiency with decreasing side effect of drug dosage. It made possibility to use for a long term. Polymer drug was prepared by acid halide method with polymer in such of polyacrylic acid and sulfacetamide. Its chemical properties were identified by means of IR, TGA. The antibacterial activities of polymer drug were studied by MICs and disk susceptibility test. The antibacterial activities by clean zone were increased in order of *Staphylococcus aureus* < *Escherichia Coli*. < *Streptococcus pyrogenes* < *Pseudomonas aeruginosa* at disk susceptibility test. The antibacterial activities of polymer drug against variety bacillus were excellent compared to those of control drug such as sulfacetamide.

Keywords : Polymer drug, Antibiotics, Sulfacetamide, Drug delivery system(DDS), MICs

I. 서 론

의약품의 연구개발, 특히 신약 개발은 많은 시간과 막대한 연구비가 투자되지만 성공을 거두면 막대한 이익을 창출하는 고부가가치 산업이다. 이러한 신약은 의약, 생물학 및 합성화학 등에 폭넓은 지식이 요구되어 새로운 약물의 개발이 어려운 실정이다. 따라서 기존의 약물을 이용하여 제제나 투여방식을 개선함으로써 효율을 증대시키는 변형 약물의 연구개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히 항생제나 항암제는 암세포와 정상세포의 선택성이 적으므로 기존의 투여방법을 개선하지 않으면 정상세포의 파괴를 가져올 뿐 아니라 내성균이 나타나게 된다.^{1,2)} 이러한 내성균 출현이나 부작용 등 기존의 약물투여의 문제점을 해결하고자 약물전달 시

스템(drug delivery system, 이하 DDS) 개념이 도입되었는데 약물을 적용하기에 편리하고 약리효과가 최적으로 작용될 수 있는 제형으로 가공된 후 생체에 투여되는 방법³⁾으로, 고분자 약물의 결합은 약물이 고분자 주체에 화학적으로 결합되어 있으며 약물은 기수분해나 효소분해를 통해서 방출되게 된다. 이와 같은 polymeric drug carrier를 polymer prodrug이라 한다. 약물을 고분자 주체에 결합시킴으로써 체내에서 약물의 배설시간의 조절이 가능하며 또한 장시간에 걸친 방출조절이 가능하게 된다. 고분자 약물은 약물의 흡수력을 조절하여 약물을 필요로 하는 특정한 세포에만 선택적으로 약물을 분배시킬 수 있다. 이와 같은 약물 방출조절 효과를 가져오기 위해서는 고분자가 인체에 무독성이고 발암성이 없어야 하는 것은 물론이며 염증이나 알레르기성이 없어야 하고 체내에서 분해되더라도 독성물질을 방출하지 않는 고분자 물질의 선택이 가장 중요한 요건이다.^{4,5)} 따라서 polymer drug에 주로 사용되는 고분자 약물 운반체로는 polysaccharide와 같은 천연고분자와

†Corresponding author : Department of Chemical Engineering, Dae Jin University
Tel: 031-539-1995, Fax: 031-539-1990
E-mail: yrkim@road.daejin.ac.kr

합성고분자로 poly(amino acid)나 poly(phosphazenes)등이 사용되어진다. Polymer drug의 약효에 관한 연구의 예로, Hodnett⁶⁾는 acrylic acid와 isobutyl vinyl ether의 혼성 중합체가 항종양성이 있음을 보고하였으며 Wang과 Sheetz⁷⁾는 poly(methacrylic acid)와 살균제인 phenoxarsine를 이용하여 poly(methacryloyloxyphenoxarsine)을 합성하였는데, 곰팡이 박테리아 등에 대한 살균력을 나타내었음은 물론이고, 제조제로서도 유용한 중합체임을 보고하였다. 또한, Ascoli 등⁸⁾은 nitrofuran polymer drug을 합성하여 종전의 nitrofuran단위체인 1-(5-nitrofurfurilideneamino) hydantoin의 항균력과 지속성을 비교하였는데 항균력은 유사하였고, 랫드 소변에서 배설량 결과에 의하면 지속성이 3배 이상이라는 보고가 있었는데, 이 실험이 polymer drug의 지속성을 보여주는 한 예이다.

본 연구에서는 기존 약물투여의 해결 가능성을 제시하고자 chemical conjugation이라는 방법으로 sulfa제의 고유의 약리활성 구조에 영향을 미치지 않는 범위에서 대중 약물 요법으로 유용하게 사용되어지고 있는 설과제 항균제를 이용하여 고분자인 polyacrylic acid(이하 PAA)와 반응으로 prodrug을 합성하고 배양한 그림양성균과 음성균 등 4종의 세균을 약물의 항균력 실험에 이용되는 디스크 확산법과 평판배지 희석법을 통하여 합성한 약물의 항균활성을 측정하였다.

II. 실험방법

1. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약 중 poly acrylic acid(M_w :2,000), sulfacetamide는 Aldrich사 제품을 사용하였고 N,N-dimethylformamide(이하 DMF)는 Yakuri사 제품을 사용하였다. 그 밖의 tetrahydrofuran(이하 THF), thionyl chloride, 피리딘, 아세트, methylene chloride 등의 용매는 국산 시약을 일반 정제법⁹⁾에 의하여 재증류하여 사용하였으며 증류수는 Millipore사의 milliQ reagent water system을 사용하여 처리한 초순수를 사용하였다. 합성물의 분석과 확인은 먼저 반응물과 합성물에 대한 합성물 확인은 Bio-RAD사의 FTS형 FT-IR을 이용하여 KBr pellet법을 사용하여 측정하였다. 열중량 분석장치(TGA)와 시차 열분석장치(DTA)는 Shimadzu사제 TG/DTA 50을 이용하여 열적 안정성을 측정하였다.

항균력 측정에 사용된 균주는 그림 양성균으로서 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P과 *Streptococcus pyrogenes* ATCC 21059을 사용하였으며, 그림 음성균으로는 장내세균으로 *Escherichia coli* ATCC 8739과

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027을 국립보건원에서 분양 받아서 배양하여 실험에 사용하였다. 배지로는 Difco사의 Mueller Hinton Agar, Tryptic Soy Broth, Biolife사의 Nutrient Agar를 사용하였고, 약물 희석용 완충용액은 0.1M phosphate buffer와 DMSO를 사용하였다.

2. Polymer drug의 합성

먼저 polymer drug을 합성하는 전단계로 PAA 13.5 g을 DMF 50 ml에 완전히 용해 후 이어서 thionyl chloride 30 ml를 첨가한 후 80°C에서 4시간 동안 교반하였다. 잔여분의 thionyl chloride을 황산 trap으로 제거한 다음 methylene chloride 50 ml을 넣어 상온에서 1시간 교반하였다. 차가운 곳(-5°C)에서 12시간 방치 후 초순수 500 ml를 넣고 빠르게 교반하여 얻은 결정을 에탄올을 이용하여 유상의 부유물을 제거하고 초순수로 세척하고 THF에 녹여 회전증발기를 이용하여 여분의 불순물을 제거하고 증류수로 세척하여 50°C에서 진공오븐과 P₂O₅을 사용하여 2일 동안에 감압건조(70 cmHg)시켜 9.2 g의 polyacryloyl 분말결정을 얻었으며 이 중 8.0 g을 DMF 50 ml에 완전히 용해 후 methylene chloride 50 ml에 sulfacetamide 10.0 g을 분산시켜 서서히 dropping하여 피리딘 촉매하에 110°C에서 12시간동안 교반 반응하였다. 반응 종료 후 반응물을 차가운 곳(-5°C)에서 12시간 방치 후 차가운 초순수 500 ml를 넣고 교반하여 얻은 결정을 초순수와 에탄올로 세척하여 50°C에서 진공오븐과 P₂O₅을 사용하여 2일 동안에 감압건조(70 cmHg 진공)시켜 8.4 g의 분말결정을 얻었다. 합성과정은 Fig. 1에 나타내었다.

3. Polymer drug 항균활성 실험

본 연구에서는 항균제의 항균력 측정에 널리 이용되는 평판배지 희석법과 디스크 확산법을 이용하여 polymer drug의 항균력을 측정하였다.

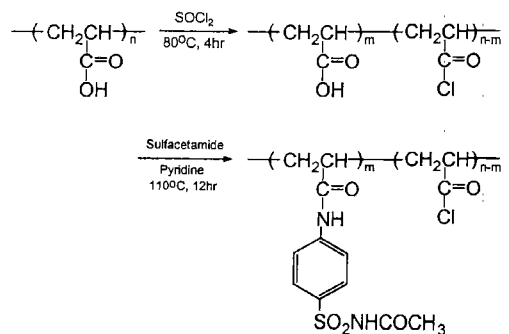


Fig. 1. Synthesis of polymer drug.

평판배지 희석법은 순수 배양된 배지에서 1~2 집락 (colony)을 따서 10.0 ml Tryptic Soy Broth가 담긴 유리 튜브에 풀어 37°C 배양기에서 하루 동안 배양하여 실험에 사용할 균을 활성화 시킨 후, 배지를 평량하여 증류수로 잘 녹인후 121°C, 1기압, 15분 동안 멸균하고 피펫 팁, 주사기와 주사기 바늘, 완충용액, 희석용액 (saline) 등도 미리 멸균하여 준비하고 약물은 2500 µg/ml 농도로 제조 후 부피비를 다르게 하여 각각의 페트리 디쉬에 분주하였다.

페트리 디쉬에 시험약물 이름 및 농도를 표시하고 배지는 50~55°C로 식힌 후 앞서 준비한 약물을 담고 있는 각각의 페트리 디쉬에 10 ml씩 분주하여 잘 섞어 약물을 담고있는 평판을 만들었다. 완전히 평판이 굳으면 flow chamber에서 1시간 정도 건조시킨 후 배양된 균액을 0.9% saline으로 1000배 희석하여 약물을 담고 있는 평판을 낮은 농도에서 높은 농도의 순서로 균액을 접종하였다. 접종한 균액이 완전히 배지 내에서 흡수될 때까지 실온에 방치한 후 완전히 건조된 평판을 37°C 배양기에서 하루 동안 배양시켜 측정하였다.

디스크 확산법에 의한 감수성 측정 결과를 일괄성 있고 믿을만한 결과를 얻기 위해서는 검사방법과 기술이 표준화되어야 하며 엄격한 관리가 필요하다. 본 연구에서는 임상적으로 그 타당성이 인정된 Bauer-Kirby 방법¹⁰⁾을 응용하여 실험하였다.

평판배지 희석법과 동일한 방법으로 평판을 만들고 페트리 디쉬에 시험약물 이름 및 농도를 표시하고 균 배양액의 농도를 맞춘 후 15분 이내에 건조된 배지에 멸균된 면봉을 사용하여 균 배양액에 충분히 적시고 페트리 디쉬 내벽에 돌리면서 과다한 균액을 제거하였다. 이 때 처음에는 전 표면에 한 방향으로 문질러 바르고 다시 되풀이하여 전 표면에 골고루 접종하였다. 디스크 디스펜서를 이용하여 필요한 디스크를 균이 골고루 접종된 페트리 디쉬 위에 올려 놓고 디스크 중앙을 가볍게 눌러 배지위에 고정하고 30분 이내에 배양기에 거꾸로 배양시켰다.

디스크 확산법의 판독은 zone reader를 사용하여 디스크 직경을 포함한 발육억제대(clean zone) 직경을 18시간 후에 측정하였고 발육억제대 주변에 미약한 발육이나 작은 발육억제대안의 큰 집락이 생겼을 경우에는 계대배양(subculture)하여 발육억제대를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Polymer drug의 합성 확인

Polymer drug을 합성하기 위한 전단계로서 PAA의

카르복실기를 acyl halide(-COCl)로 치환시키기 위하여 thionyl chloride를 사용하여 acid chloride화 된 polyacryloyl 합성하였다.

Acid chloride로 치환되기 전의 PAA의 IR인 Fig. 2(a)에서는 카르복시기의 C=O가 1700~1725 cm⁻¹ 부근에서 또 3000~3300 cm⁻¹ 부근에서 히드록시기의 흡수대가 나타나 있다. 그러나 thionyl chloride를 이용하여 acid chloride로 치환시킨 polyacryloyl의 IR인 (b)에서는 3000~3300 cm⁻¹ 부근에서 히드록시기가 감소하고 acid chloride의 특성흡수대인 1750~1785 cm⁻¹ 부근에서 새롭게 acyl halide의 특성흡수대가 생성되어 polymer drug을 합성하기 위한 전단계인 polyacryloyl

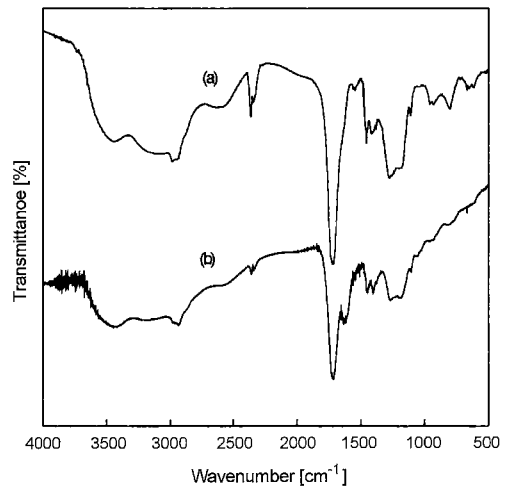


Fig. 2. IR spectra of PAA(a) and polyacryloyl(b).

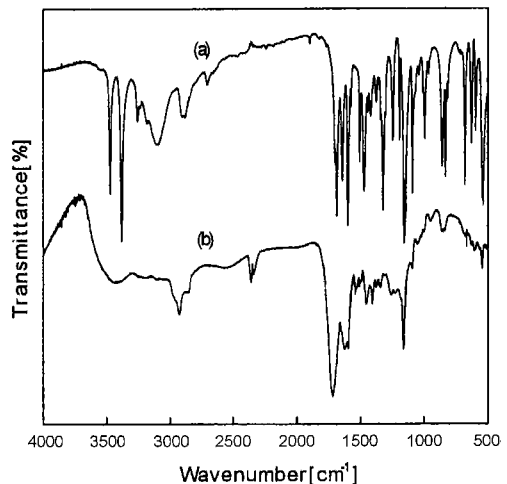


Fig. 3. IR spectra of sulfacetamide(a) and Polymer drug(b).

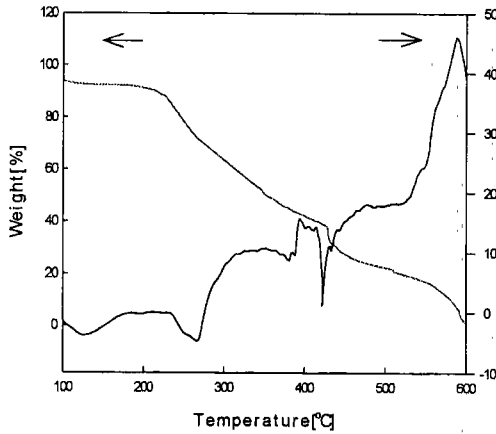


Fig. 4. TGA/DTA curve of PAA.

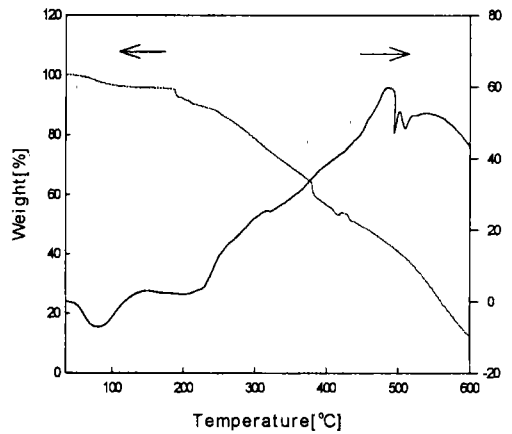


Fig. 5. TGA/DTA curve of polymer drug.

의 합성을 확인할 수 있었다. Fig. 3(b)은 polymer drug의 IR로 1750~1785 cm 부근에서 나타나는 polyacryloyl의 -COCl 특성흡수대와 3400 cm 부근에서 나타나는 sulfacetamide의 -NH2의 특성 흡수대가 사라지고 -CONH 특성흡수대가 1550~1650 cm 부근에서 생성됨을 확인하였다.

한편 Fig. 4와 5는 PAA와 polymer drug의 TGA/DTA thermogram을 나타낸 것이다. PAA의 경우 209.0°C 부근에서 Tg(유리전이온도)를 형성한 후 429.0°C 부근에서 Tm(완전용융온도)이 형성되는 것으로 나타났다. 그러나 polymer drug의 경우 187.0°C 부근에서 초기분해가 일어나고 379°C 부근에서 최종

분해가 일어나는 것으로 보아 Tg값은 상승하고 Tm값은 크게 저하됨을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 PAA 내에 인접한 사슬에서 형성된 히드록시기의 수소원자가 치환됨으로서 분자내 수소결합력의 감소로 인하여 열적 안정성이 저하되는 것으로 설명할 수 있다.

3. Polymer drug 항균 활성 측정

Table 1은 polymer drug의 평판 배지 희석법의 결과로 그람 양성인 황색포도상 구균, 연쇄상 구균, 그람 음성인 대장균의 경우 1100 µg/ml 이상에서 감수성을 나타내었다. 그러나 sulfacetamide의 우수한 감수성¹¹⁾을

Table 1. MICs of polymer drug by agar dilution method

Concentration (µg/ml)	250	500	750	900	1000	1100	1200	1300	1500	2000
Bacterias										
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Psedomonas</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Table 2. Disk susceptibility test of polymer drug

Concentration (µg/ml)	500	1100	1200	1500
Bacteria				
<i>Staphylococcus</i>	14.67 ± 0.82	18.00 ± 0.71	18.50 ± 0.65	19.67 ± 1.97
<i>Streptococcus</i>	15.20 ± 0.45	19.40 ± 1.14	19.85 ± 0.45	20.17 ± 0.75
<i>Escherichia</i>	15.80 ± 1.48	18.50 ± 1.38	19.05 ± 0.85	20.83 ± 0.75
<i>Psedomonas</i>	17.20 ± 2.28	20.00 ± 1.26	20.40 ± 0.95	21.83 ± 1.17

*unit:mm.

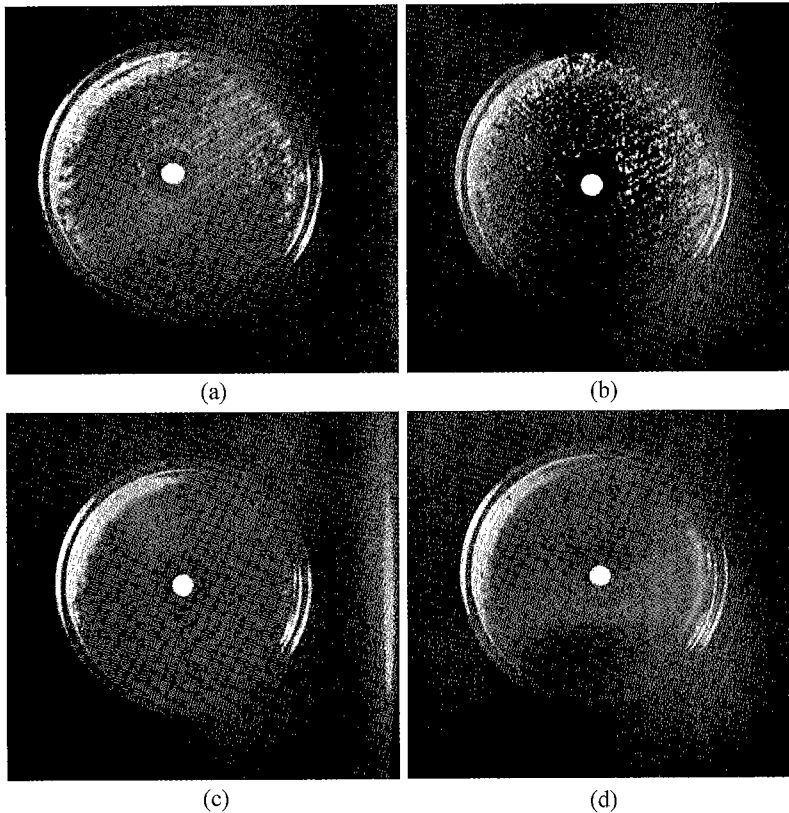


Fig. 6. Photographs of disk susceptibility test of (a) 500, (b) 1100 µg/ml on *Staphylococcus* and (c) 500, (d) 1100 µg/ml on *Pseudomonas* by polymer drug.

보이는 장내 음성 호기성 간균인 녹농균의 경우에는 1000 µg/ml 이상에서 감수성을 나타내어 sulfacetamide의 항균력 양상을 유지하는 것으로 보인다.

디스크 확산법의 경우 Bauer-Kirby방법을 응용하여 디스크의 지름을 포함한 clean zone 측정하여 일반적으로 sulfanlamide의 감수성 판단기준은 내성은 12.0 mm 이하, 중등도 감수성은 13.0~16.0 mm, 감수성은 17.0 mm 이상으로 합성한 약물의 세균에 따른 감수성을 판단하였다.¹⁰⁾

Table 2는 polymer drug의 디스크 확산법의 결과로 500 µg/ml에서 녹농균은 감수성을 보이고 나머지 균들은 중등도 감수성을 나타내었고, 1100 µg/ml 이상에서는 그람 양성균과 음성균 모두에서 감수성을 나타내어 평판배지 회석법에 비해 전체적으로 우수한 항균력을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. Fig. 6은 polymer drug의 디스크 확산법에 의해 발육억제대에서 나타난 그림으로 녹농균이 발육억제대에서 다른 균에 비해 넓은 것을 확인할 수 있다.

IV. 결 론

실과제 항균제를 이용하여 고분자인 polyacrylic acid(PAA)와의 반응으로 prodrug을 합성하고 배양한 그람양성균과 음성균 등 4종의 세균을 약물의 항균력 실험에 이용되는 디스크 확산법과 평판배지 회석법을 통하여 합성한 약물의 항균활성을 측정하였다.

1. acid chloride로 치환시킨 결과 히드록시기가 감소하고 acyl halide의 특성흡수대가 생성되어 polymer drug을 합성하기 위한 전 단계인 polyacryloyl의 합성을 확인할 수 있었으며 sulfacetamide의 -NH₂의 특성 흡수대가 사라지고 -CONH 특성흡수대가 1550~1650 cm 부근에서 생성됨을 확인하여 polymer drug이 합성되었음을 확인하였다.

2. 평판 배지 회석법의 결과로 그람양성인 황색포도상구균, 연쇄상구균, 그람음성인 대장균의 경우 1100 µg/ml 이상에서 감수성을 나타내었으며 sulfacetamide에 대하여 우수한 감수성을 보이는 간균인 녹농균의

경우에는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 감수성을 나타내어 sulfacetamide의 항균력 양상을 유지하는 것으로 나타났다.

3. 디스크 확산법의 결과로 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 녹농균은 감수성을 보이고 나머지 균들은 중간정도 감수성을 나타내었고, 1100 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 그람 양성균과 음성균 모두에서 감수성을 나타내어 평판배지 희석법에 비해 전체적으로 우수한 항균력을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- 1) Langer S. and Wise D. L.: "Medical Applications of Controlled Release", CRC Press, Florida, U.S.A., 2, 5-29, 1984.
- 2) Mainardi J. L. and Shlaes D. L.: Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *J. Infect. Dis.*, 171, 1646-1650, 1995.
- 3) Kweon D. K., Kang D. W. and Kim K. W.: Control of Drug Release Using the Chitosan-g-poly(vinyl alcohol) Copolymer, *Polymer*, 20, 4, 675-671, 1996.
- 4) Rosen H. B., Chang J., Wnek R. E., Linhardt R. J. and Langer R.: Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery, *Biomaterials*, 4, 131-134, 1984.
- 5) Kim S. W., Peterson R. V. and Feijen J.: "Polymeric drug Delivery System", in Drug Design(ed. E. J. Ariens), Vol X, Academic Press, N. Y. 193-198, 1980.
- 6) Hodnett E. H.: Polymers as Antitumor Agents, *Polymer News*, 8, 323-325, 1983.
- 7) 竹本喜一, 田 岩夫, "醫藥高分子", 講談社, 5-18, 1978.
- 8) Ascoli F., Casini G., Ferappi F. and Tubaro E.: *J. Med. Chem.*, 10, 97-101, 1967.
- 9) Perrin D. D. and Armarego W. R. F.: Purification of laboratory Chemicals, 3rd Ed., 365-372, 1988.
- 10) Victor Lorian, M. D.: Antibiotics in Laboratory Medicine, Third Edition, New York, 17-20, 1980.
- 11) 서울대학교 의과대학 약리학 교실 : sulfonamide계 항균제와 요로감염 치료제, 약리학, 고려의학, 562-570, 1994.