J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 17. No. 4, December, 2000. 267~272

Sulfa제의 Dual Action에 의한 지속성과 항균성

공승대 · 황성규 · 윤철훈 · 김진영* · 이한섭**

명지대학교 세라믹화학공학부
건국대학교 화학생물공학부 신소재공학*
용인대학교 환경보건학과**
(2000년 11월 22일 접수; 2000년 12월 21일 채택)

Antibiotics and Durability by Dual Action of Sulfa Agents

Seung Dae, Kong · Sung-Kwy Hwang · Cheol Hun, Yoon · Jin Yeong Kim*, Han Seob Lee**

Div. of Ceramic & Chemical Engineering, Myong Ji Univ.
**Dept. of Materials chemistry & Engineering, Kon Kuk Univ.*
***Dept. of Environmental Health, Yong In Univ.*
(Received, November 22, 2000 ; Accepted December 21, 2000)

Abstract : Dual-actions are the most recently used delivery system in drug study. Dual-action agents are unique chemical entities comprised of two different type of antibacterial compounds covalently linked together in a single molecule in such a way that both components are able to exert their bactericidal properties. Crosslinked sulfadiazine-sulfanilamide such as antibiotics is synthesized by synthetic handle with glutaraldehyde. As a result, New synthetic antibacterial agent exhibited the broad antibacterial activities against *gram*(+) and *gram*(-) of 4 strains and a long durability supposing that the stomach and blood.

1. 서 론

약물의 투여방식은 고농도의 약물이 체내로 흡수되어 혈중농도가 독성을 나타내는 농도이상으로 나타나 부작용을 나타내며, 또한 배설시간이 너무 빨라 치료에 필요한 유효농도 이하로 혈중농도가 떨어져 과량의 약물투여가 불가피해진다. 이 같은 투여방식으로 인한 경제적 손실 및 부작용은 매우 크다.[1,2] 또한 의약품은 의약, 생물학 및 합성화학 등에 폭넓은 지식이 요구되어 새로운 약물의 개발이 어려운 실정이다. 따라서 기존의 약물을 이용하여 제재나 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.[3,4] 그러므로 저분자 약물에 반응성이 우수한 관능기나 합성용 손잡이(synthetic handle)를 도입하여 방법[5]을 이용하여 반감기가 짧은 약물을 서로 결합하여 체내에서 방출시간을 조절하고 약물의 복합효능을 나타내는 이중작용(dual action) 시스템이 많이 이용되고 있다. 이러한 항균제의 이중작용에 대하여 Albrecht[6,7]는 cefotaxime에 ciprofloxcin을 카바메이트 형태로 결합한 화합물은 cephalosporin과 quinolone에서 나타나는 광범위한 스펙트럼을 보여 주었고 Corraz[8]는 펜엠/카바페엠과 ciprofloxcin의 카바메이트 형태로 결합한 화합물이 세파로스포린이나 퀴놀론이 가지지 못한 혐기성 세균에 대한 항균활성을 보임으로 이중작용의 가능성을 보여주었다. 이와 같이 이중작용에 대한 약물끼리의 합성방법으로는 약물의 합성하는 방법으로는 인체에 독성작용이 적은 가교제를 사용한 glutaredehyde법이 널리 사용되어지는데 Oyrton와 Kawase등[9]은 키토산의 1차 아민기를 glutaredehyde의 알데히드기로 결합한 가교 키토산에 lactate dehydrogenase를 함유시켜 랫드의 간세포에서 이들 약물을 5일 동안 서서히 방출시켰음을 보고하였으며, Poznansky[10]은 알부민에 숙취해소

에 좋은 효능을 보이는 asparaginase을 결합하여 약품 합성의 이용 가능성을 보고하였다.

한편 설파제는 초기 항균제로서 Domagk 등이 합성 말라리아 치료제의 연구에 자극되어 azo색소류의 항균작용을 검토하고 강한 항균작용이 있는 Prontosil rubrum을 발견하였으며, 이어서 Trefouel 등은 Prontosil의 항균작용은 azo합성에 기인하는 것이 아니라 생체내에서 환원되는 4 - amino-benzene sulfonamide가 작용의 실체임을 실험적으로 증명하였다.[11] Sulfonamide계 약물들은 감염의 예방 및 치료에 처음 사용된 화학 요법제이며 인류가 최초로 발견한 획기적인 항균제이기도 하다. 이 약물들이 처음 사용됨으로써 감염성질환의 유병률과 사망률이 현저하게 감소되었다. Sulfa제가 항균작용을 나타내는 세균으로서는 *gram*양성의 구균과 *gram*음성의 간균의 일부가 있다. 대부분의 세균감염은 항균제로 치료하나 내성균주의 출현이 커다란 문제로 되어왔다. 따라서 교차내성이 없는 항균제를 개발하는 것이 매우 중요한 과제이다.

본 연구에서는 약물의 약리활성 구조에 영향을 주지 않고 새로운 약물의 구조를 합성하는 방법으로 sulfadiazine과 sulfanilamide를 합성용 손잡이(synthetic handle)이며 가교제인 glutaraldehyde를 이용하여 가교결합 시키고 이를 *in vitro*에서 위산과 혈액의 조건을 고려하여 약물의 가수분해에 따른 지속성과 *in vitro*에서 디스크 확산법을 이용하여 항균성을 연구하여 Dual Action에 의한 약물의 가능성을 확인하여 보았다.

2. 실 험

2.1. 실험재료 및 기기분석

본 연구에 이용한 sulfa제 약물로서 sulfadiazine과 sulfanilamide는 Aldrich사 특급시약을 그대로 사용하였으며 sulfa제끼리의 화학적 가교결합을 위하여 TCI사의 glutaraldehyde(이하 GA)를 재증류하여 사용하였다. 초산은 덕산화학의 일급시약을 일반 정제법으로 재증류하여 사용하였으며 phosphate buffered saline(이하 PBS)는 Sigma사의 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 증류수는 Millipore사의 Milli-Q reagent water system을 사용하여 처리한 초순수를 사용하였다.

합성을 확인하기 위하여 Bio-RAD사의 FTS형 FT-IR을, JEOL(300㎒)사의 1H-NMR을 통해 합성을 확인하였다. 합성한 약물의 *in vitro*에서 pH 7.4와 1.5에서의 분해거동을 확인하기 위하여 Shimadzu사제 UV-2401PC을 이용하여 흡광도 값을 측정하였다.

항균력 측정에 사용된 균주는 그람양성균으로 *Staphyloccus aureus* ATCC 6538P와 *Streptococcus pyrogenes* ATCC 21059, 그람음성균으로 *Escherichia coli* ATCC 8739와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027를 국립보건원에서 분양 받아서 배양하여 실험하였다. 배지로는 Difco사의 Tryptic soy broth과 Mueller-Hinton Medium 사용하였으며 항균 시험에 이용되는 약물 희석용 완충용액은 0.1M phosphate buffer [K_2HPO_4(2.0g) + KH_2PO_4(8.0g) + 초순수(1 *l*)]와 DMSO를 사용하였으며 그 외의 모든 실험 도구는 멸균하여 사용하였다.

2.2. Dual action을 위한 항균제 합성

Sulfadiazine 8.0g(0.032M)과 sulfanilamide 5.5g(0.032M)을 DMSO 80ml에 각각 용해한 후 GA 14.1g(0.035M)를 1시간에 걸쳐서 적하시키면서 3구 둥근 플라스크에서 반응시켰다. 여기에 2.0% 초산수용액 100ml을 서서히 적가하여 100℃에서 4시간 교반한 다음 상온에서 2시간 반응 후 하루동안 -5℃의 냉암소에 방치하였다. 생성된 결정을 THF로 재결정 처리하고 회전증발기를 통해 여분의 불순물을 제거하고 에탄올과 증류수로 세척하였다. 40℃에서 진공오븐과 P_2O_5를 사용하여 2일 동안 감압건조시켜 수율 70.8%인 황토색의 분말결정의 합성 항균제를 얻었다. 합성과정은 Fig. 1에 나타내었다.

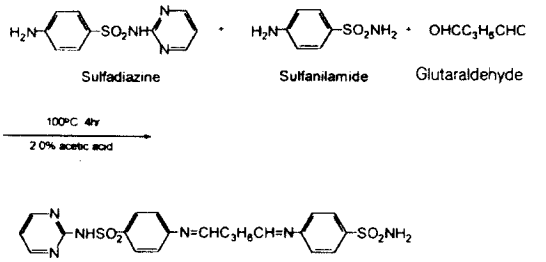


Fig. 1. Synthesis of synthetic antibacterial agent.

2.3. Dual action에 의한 항균제의 분해거동

경구투여하면 약물은 식도를 통과하여 소화관을 이동하면서 약물을 방출한다. 소화관은 일정한 길이를 가지고 있기 때문에 약물이 이동하는 데는 일정시간이 소요되며, 또한 이동하는 동안 소화관액의 pH는 산성, 약산성을 거쳐 알카리성으로 변한다. 경구제는 이러한 투여 경로를 이동하면서 약효

를 발휘하고 주사제의 경우 혈관을 통해 전신으로 빠르게 확산되어 진다.

본 연구에서는 경구투여를 고려하여 위산과 유사한 조건으로 제조하기 위하여 1N HCl 수용액에 pH 변화를 방지하기 위하여 3N NaCl로 이온강도를 조절하여 6시간 상온에서 방치하여 pH 1.5 완충용액을 제조하였고, 주사제에 의한 투여를 고려하여 혈장과 유사한 조건인 pH 7.4의 PBS용액으로 완충용액을 제조하여 사용하였다. 합성약물의 in vitro에서의 약리 활성구조에 이르는 분해거동을 확인하고자 각각 제조된 완충용액을 99.0㎖을 삼각플라스크에 넣었다. 미리 37.0±0.5℃에 맞추어 놓은 항온조에 삼각플라스크를 담그어 온도평형이 이루어지게 하였다. 여기에 합성약물의 농도가 2.0×10^{-5}M의 stock solution인 DMSO 용액을 1.0㎖ 가하여 그 농도가 2.0×10^{-7}M이 되도록 한 후, 110rpm에서 sink condition을 유지하기 위하여 1.0㎖ 채취 후 즉시 1.0㎖의 완충용액을 넣어 농도를 유지하고 사용한 약물의 최대 흡수파장(λ_{max})에서 시간에 따른 변화를 분광광도법에 의하여 측정하였다.

2.4. Dual action에 의한 항균제의 항균성 측정

디스크 확산법의 경우는 Tryptic Soy Broth을 121℃에서 15분 동안 멸균하고 분양받은 4종의 냉동보관 균주를 배양기에서 하루동안 배양하였다. Mueller Hinton Medium을 평량하여 증류수에 용해시킨 후, 121℃, 15분 동안 멸균하고 실험에 필요한 다른 도구들도 멸균하여 준비하였다. 배지를 50~55℃로 식힌 후 petri dish에 10ml씩 분주하여 flow chamber에서 1시간정도 건조시킨 후 멸균된 면봉을 균 배양액에 충분히 적시어 표면이 건조된 배지 위에 골고루 접종하였다. 이때 처음에는 전 표면에 한 방향으로 문질러 바르고 다시 되풀이하여 전표면에 골고루 접종하였다. 균접종이 끝난 petri dish에 약물을 적신 paper disc를 가볍게 눌러 고정시킨 후 30분이내 37℃ 배양기에 18시간 동안 배양시킨 후 판독하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균제의 합성확인

Sulfadiazine과 sulfanilamide를 가교제인 GA의 알데히드기와 sulfa제 항균제의 1차 아민기를 이민(imine)의 형태로 합성하였다.

Fig. 2(a)는 원물질인 sulfanilamide의 IR로 3300~3500cm^{-1}부근에서 방향족에 치환된 1차 아민기의 두 개의 특성흡수대가 나타나 있으나 합성한 항균제의 IR인 Fig. 2(b)에서는 sulfadiazine과 sulfaniamide의 1차 아민기가 GA의 알데히드기와 결합하여 2900cm^{-1}부근에 GA의 CH 특성흡수대와 1550cm^{-1}부근에서 GA와 결합한 SO_2NH의 특성흡수대가 생성되어 있음을 확인할 수 있었다. Fig. 3(a)는 원물질인 sulfanilamide의 NMR로 방향족에 치환된 1차 아민기의 2H가 5.8ppm 부근에서 SO_2NH_2기의 2H가 6.9ppm 부근에서 확인되었고, 합성항균제의 NMR인 Fig. 3(b)에서는 1차 아민기의 2H가 5.8ppm 부근에서 사라짐으로서 합성을 확인하였다. Fig. 4(a)는 원물질인 sulfadiazine의 DSC themogram을 나타낸 것으로 261℃ 부근에서 발열피이크를 나타내지만, 합성항균제의 DSC themogram인 Fig. 4(b)에서는 232~233℃ 부근에서 흡열 피이크를 보여 녹는점의 변화를 확인하였다. 이는 sulfadiazine과 sulfanilamide의 1차 아민기의 수소결합이 GA의 알데히드기와 결합하여 분자내 수소결합력의 감소와 이중결합에 의한 분자내 안정성 저하 때문에 녹는점이 저하된다고 생각된다.

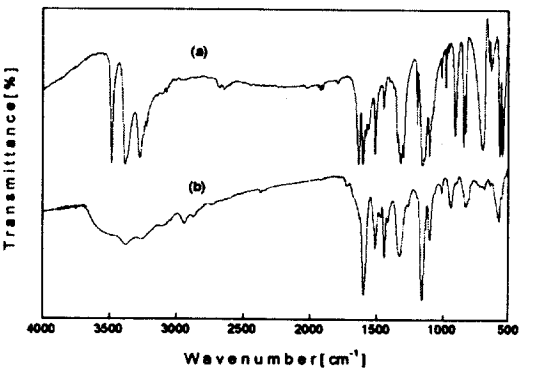
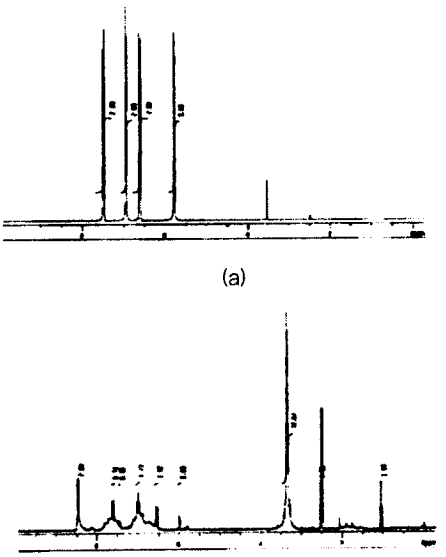


Fig. 2. IR spectra of (a)sulfanilamide and (b)synthetic antibacterial agent.

3.2. Dual action에 의한 항균제의 분해거동

모든 약물은 방출, 흡수, 분포, 그리고 대사와 배설의 4단계를 거친다. 경구제나 주사제는 혈액을 약물의 수송수단으로 혈액에 의해 희석된다는 것을 감안한다면 작용부위에서 실제 필요로 하는 양보다 훨씬 많은 약물을 투여해야 효과를 볼 수 있다. 특히, 경구제의 경우 약물의 대부분이 소장을 통해 혈액에 흡수된 후 간을 거쳐 심장으로 이동하여 전신으로 퍼지는 복잡한 흡수경로를 거친다. 그러나 간에서 대부분의 약물이 대사작용을 일으켜 그 형태가 변하여 치료부위에 도달하기 전에 효능을 상실하게 되는 초회 통과효과(first-pass



(a)

(b)

Fig. 3. NMR spectra of (a)sulfanilamide and (b)synthetic antibacterial agent.

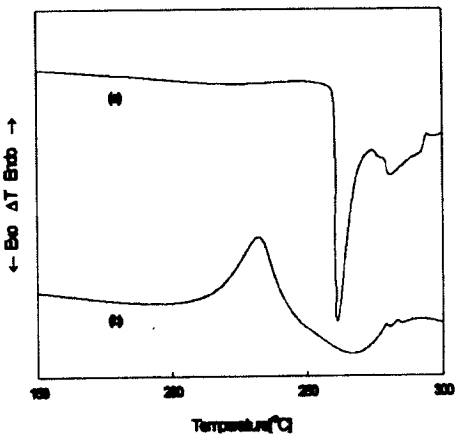


Fig. 4. DSC thermograms of (a)sulfadiazine and (b)synthetic antibacterial agent.

effect)와 위산에 의한 손실로 주사제에 비하여 더 많은 양의 약물을 투여해야 한다.

우선 Fig. 5는 *in vitro*에서 주사제 형태로 혈액내 투여시를 고려한 pH 7.4에서 합성약물의 약리활성에 이르는 분해거동을 확인해 보면 일반적으로 지용성 약물인 설파제는 가수분해가 일어나지 않으나 [12,13] 가교제에 의해 결합된 합성약물은 가수분해에 약한 이민의 이중결합을 가지고 있어 6시간만에 각각의 원물질인 sulfadiazine과 sulfanilamide로 분해

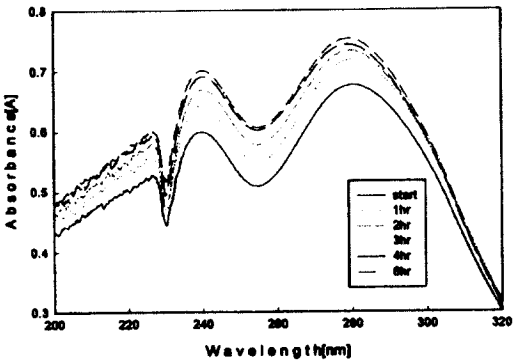


Fig. 5. UV spectra of synthetic antibacterial agent concentration of 2×10^{-7}M with various time intervals at pH 7.4(blood and small intestines).

되는 것을 sulfadiazine의 최대 흡수파장인 240nm와 sulfanilamide의 최대 흡수 파장인 260nm 부근에서 흡광도 값의 증가로서 확인하였고 6시간 이후에는 각각의 설파제로 완전 분해되어 더 이상의 흡광도 증가를 보이지 않았다. 이는 GA에 의한 설파제끼리의 결합을 통하여 일정시간 동안의 약물 분해 및 손실에 대한 지속성을 나타내어 준다고 생각된다.

Fig. 6은 *in vitro*에서 위산을 고려하여 pH 1.5에서 합성약물의 약리활성에 이르는 분해거동을 확인하고자 34시간동안 측정한 것으로 pH 7.4의 경우에는 6시간만에 원물질로 분해되어졌으나 pH 1.5의 경우에 34시간 동안에 서서히 가수분해되어 sulfanilamide의 최대흡수파장인 260nm 부근으로 최대 흡수파장이 이동되어지는 것을 확인하여 pH 7.4의 경우와 유사한 분해거동을 나타내고 더욱 느린 분해속도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 합성한 약물이 소장이나 혈액을 고려한 pH 7.4보다

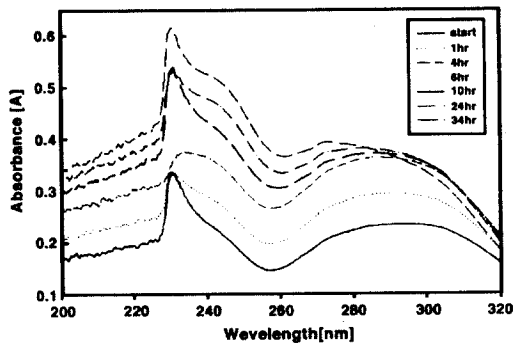


Fig. 6. UV spectra of synthetic antibacterial agent concentration of 2.0×10^{-7}M with various time intervals at pH 1.5.(the stomach).

위산이라는 가정의 산성용액에 더 안정적이기 때문이라 생각되며 경구투여시 위산에 의한 약물소실을 가교제에 의한 합성약물이 어느 정도 지연시킬 수 있으리라 생각된다.

방출제어에 관여하는 생체내외의 변수는 시간, pH, 온도 및 기타 생물학적 요소에 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 분해되는 지속성을 확인하였다. 이는 위산에 의한 약물의 소실로 인한 작용부위에 치료유효한 농도를 유지하기 위하여 더 많은 양의 약물을 투여하던 기존의 문제점을 저농도 투여만으로도 위장에서 소실 없이 많은 양의 약물을 소장에 이르게 하여 과량투여에 의한 약물의 낭비나 부작용을 최소화하고 설파제중 일부 sulfadiazine과 같이 반감기가 짧은 약물의 경우 반감기를 지연시켜 반복투여로 인한 불편감과 독성작용을 줄일 수 있으리라고 기대되어진다

3.3. 합성항균제의 디스크 확산법에 의한 항균성

Mueller Hinton Medium에 접종하였던 세균들을 배양한 후 18시간 후에 판독한 결과를 Table 1과 Fig. 7에 나타내었다. 일반적으로 sulfa제의 내성과 감수성의 판단기준은 내성은 발육저지대의 지름이 12.0㎜이하, 중등도 감수성의 경우 13.0~16.0㎜, 감수성은 17.0㎜이상으로 보고하고 있다.[14] 디스크 확산법에 대한 결과로 대장균의 경우 500㎍/㎖에서 감수성을 나타내나 녹농균은 중등도 감수성을 나머지 그람양성균은 내성을 나타내었다. 1200㎍/㎖이상에서 모든 균에 감수성을 보였는데 sulfadiazine은 대장균에 감수성이 우수하고 sulfanilamide는 대장균, 포도상 구균 및 연쇄상구균에 좋은 감수성을 나타내고 있다. 일반적으로 sulfa제들은 그람음성균보다는 양성균에서 우수한 감수성[15]을 나타낸다고 알려져 있지만 합성약물은 sulfadiazine과 sulfanilamide 간의 이중작용에 의하여 그람음성균인 대장균에서 더 넓은 clean zone을 형성하는 것으로 나타났다.

4. 결 론

기존의 약물투여 방법에 따른 문제점을 극복하기 위해 sulfa제를 가교제를 통한 화학적인 결합에 의하여 약물을 합성하여 *in vitro*에서 방출조절 시스템의 일종인 이중작용(dual action)에 대하여 연구하였다.

1. 경구투여시 위산의 영향을 고려한 pH 1.5에서의 합성약물은 34시간 동안 서서히 분해되어지는데 이는 합성한 약물이 서서히 결합이 끊어져 원물질로 분해되어지는 경향을 원물질의 최대 흡수파장이 시간에 따라 증가하는 것으로 확인하여 일정시간 동안 위산에 의해 약물이 보호되어 위산에 의해 불

Table 1. Disk Susceptibility Test of Sulfadiazine-Sulfanilamide

Bacteria \ Concentration (㎍/㎖)	500	1100	1200	1500
Staphylococcus ATCC 6538P	12.75±0.50	16.20±1.20	16.9±0.94	18.20±0.83
Streptococcus ATCC 21059	12.00±0.71	17.50±0.58	18.20±0.84	19.00±1.00
Escherichia ATCC 8739	17.40±0.55	19.40±1.14	20.45±0.58	21.6 ±0.89
Psedomonas ATCC 9027	13.40±0.50	17.60±0.84	18.35±0.96	19.40±0.55

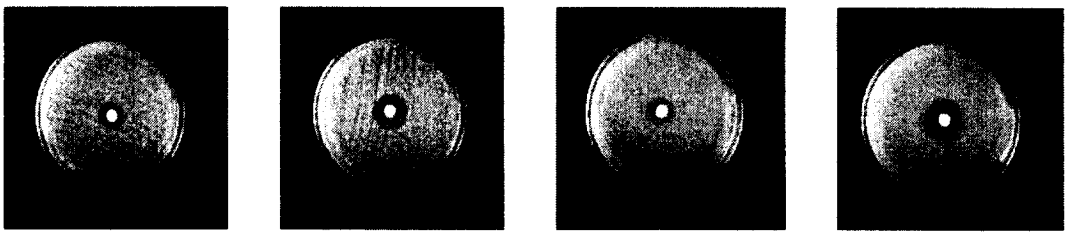


Fig. 7. Photographs of disk susceptibility test of (a) 500, (b)1100㎍/㎖ on Staphyloccus and (c)500, (d)1100 ㎍/㎖ on Pseudomonas for synthetic antibacterial agent by dual action.

활성 되어지는 약물의 양을 최소화할 수 있으리라 기대된다.

2. 대부분의 약물의 흡수가 일어나는 소장이나 주사제의 투여에 의한 혈류를 고려한 pH 7.4에서는 6시간만에 합성약물이 원물질로 분해가 일어나 위산에서 서서히 분해되어지던 약물이 소장에 이르러 빠르게 분해되어 각각의 약물의 약리활성 구조로 변환되어 보다 효율적인 약리작용을 할 것으로 기대된다.

3. 디스크 확산법에 대한 결과로 대장균의 경우 500㎍/㎖에서 감수성을 나타내나 녹농균은 중등도 감수성을 나머지 그람양성균은 내성을 나타내었으며 1200㎍/㎖이상에서 모든 균에 감수성을 보였으며 합성약물은 sulfadiazine과 sulfanilamide간의 이중작용에 의하여 그람음성균인 대장균에서 더 넓은 clean zone을 형성하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. R. H. Guy and J. Hadgraft, "Drug Parameters Imporyant for Transdermal Delivery", vol. Ⅲ, p. 4, CRC press, Florida(1987).
2. P. Johnson and J. G. Lioyd-Jones, "Drug Delivery Systems", p. 7, Ellis HorwoodLtd., England(1987).
3. S. Langer and D. L. Wise, "Medical Applications of Controlled Release", vol. 2, p. 2, CRC Press, Florida, U.S.A(1984).
4. J. L. Mainardi and D. M. Shlaes, *J. Infect. Dis.*, **171**, 1646(1995).
5. 橋本嘉辛, "藥物送達法", p. 225, 廣川書店, (1990).
6. H. A. Albrecht, *J. Med. Chem.* **34**, 669(1991).
7. H. A. Albrecht, *J. Med. Chem.* **33**, 77(1990).
8. A. J. Corraz, *J. Med. Chem.* **35**, 1828(1992).
9. A. C. Oyrton, Jr. Monteiro, and Claudio Airoldi, *Inter. J. Bio. Macro.* **26**, 119(1999)
10. M. J. Poznansky, "Methods of Drug Delivery", p. 82, Pergamon Press, Oxford (1986).
11. N. A. Buurgers, "Medicinal Chemistry", part Ⅱ, 4th ed., p. 1, Wiley Interscience, New York(1982).
12. M. H. Bohne, *Chemotheraphy*, **14**, 195 (1969).
13. D. K. Shkadova, Solubility Studies, *Farm. Zh.*, **24**, 39(1969).
14. M. Victor Lorian, "Antibiotics in Laboratory Medicine", 3rd ed., p. 17, New York(1980).
15. 서울대학교 의과대학 약리학교실, 약리학, 고려의학, 562(1994).