

## $\beta$ -락탐계 항생물질의 폴리아크릴산 중합체의 합성 및 항균성

진정일 · 최성모 · 장민선\* · 민신흥\*  
고려대학교 화학과 · 동아제약주식회사 중앙연구소\*  
(Received October 25, 1986)

### Synthesis and Antibiotic Activities of Poly (acrylic acid) Modified $\beta$ -Lactam Cyclics

Jung-Il Jin, Sung-Mo Choi, \*Min-Sun Chang and \*Shin-Hong Min  
Department of Chemistry, Korea University, Seoul 132, and  
\*Central Research Laboratory, Dong-A Pharmaceutical Company, Seoul 131, Korea

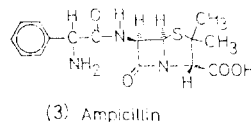
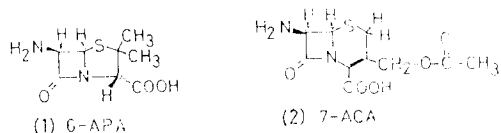
**Abstract**—A series of modified poly(acrylic acid)'s containing different levels of 6-aminopenicillanic acid (6-APA), 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) and 6-[D-(−)- $\alpha$ -aminophenyl acetamido] penicillanic acid (ampicillin) as pendant groups were prepared. Antibiotic activities of the newly prepared drugs were examined against the various gram-positive and gram-negative bacteria. It was found that ampicillin modified composition possesses antibiotic activities against the gram-negative as well as the gram-positive bacteria.

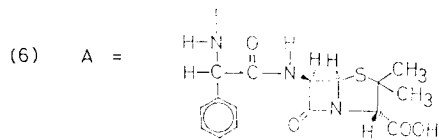
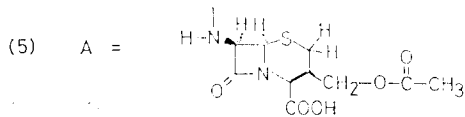
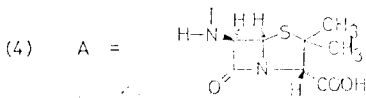
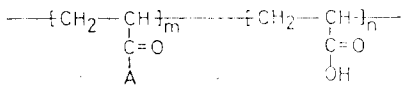
현재까지 알려진 저분자량 항생물질은 우리 체 내에 머무를 수 있는 시간이 제한되어 있어 보통 필요이상의 양을 섭취하거나 약효가 연속적이 되도록 수시간마다 약을 먹어야 하는 데, 이렇게 필요이상의 약을 투입하는 데서 여러가지 부작용이 야기될 위험이 있다. 이와 같은 문제점의 해결방법으로 중합체약에 대한 관심이 집중되고 있다. 중합체약<sup>1)</sup>은 활성의 지속적인 효과를 기대할 수 있으며, 또 용해도와 확산의 변화 등에 의해 약 자체의 활성의 변화나 증감이 예상된다.

한편 최근에 진과 장<sup>2)</sup>은  $\beta$ -락탐고리를 가진 항생제 구조 6-APA(3)<sup>3)</sup>, 7-ACA(2)<sup>4)</sup> 및 엠펜실린(3)을 각각 diisocyanate와 diacid dichloride에 반응시켜 이합체성 화합물로 만든 후 단위체 항생물질과 항균력을 비교 검토하였는데, 6-APA의 우레아 유도체는 각 미생물에 전혀 항균성을 나타내지 않고 diacid 유도체는 *Sarcina lutea*나 *Staphylococcus aureus*와 같은 일부 그람양성균에 매우 우수한 항균력을 나타냈으며, 7-ACA의 우레아 유도체는 일부 그람양

성 균에는 꽤 큰 항균성을 보여 주었으나 그람 음성균에 대해서는 전혀 감수성이 없었다. 그러나 7-ACA의 diacid 유도체는 그람음성균에 대해 큰 감수성을 나타냈다. 또한 엠펜실린의 우레아 유도체는 엠펜실린에 비해 감수성이 떨어졌으나 diacid 유도체는 엠펜실린에 전혀 감수성이 없는 그람음성균 대부분에 커다란 감수성을 보여 주었음을 발표했다.

본 연구에서는 진과 장의 실험 결과<sup>2-4)</sup>를 토대로 지속성이 있는 항생물질의 개발에 목적을 두고, 폴리아크릴산을 합성한 후 폴리염화아크





릴로일로 변화시켜 이를 6-APA(1), 7-ACA(2) 및 앰피셀린(3)의 아미노기와 반응을 시켜 얻은 중합체약의 항균성을 몇가지 그람양성균, 그람 음성균 및 eukaryote인 *Candida albicans*에 대하여 실험했다.

실험 방법

기기 및 시약—IR스펙트럼은 JASCO DS-710G Diffraction Grating IR 스펙트로포토메타를 사용하여 얻었으며, 원소분석은 Carlo Erba사의 원소분석기 Model 1106을 사용하였다.

아크릴산은 미국 Aldrich 제품을 사용했고, 염화메틸렌과 염화티오닐은 일본의 Junsei chemical 사 제품을, 트리에틸아민은 일본의 SHINYO Pure chemical사 제품을 그리고 벤젠은 독일 Merck제를 사용했다.

항생제인 6-APA는 일본의 Meiji Seika사 제품을, 7-ACA는 오스트리아의 Biochem사 제품을 그리고 무수 앰피셀린은 동아제약에서 합성한 물질로서 영국 약전규격<sup>5)</sup>에 적합한 제품을 사용했다. 그리고 미생물 감수성 테스트를 위해 Difco 제품의 Müller-Hinton<sup>6)</sup> agar와 broth를 사용했다.

폴리아크릴산의 합성<sup>7)</sup>—아크릴산 100g을 1% wt.의 과산화벤조일을 개시제로 사용하여 벤젠 (1l) 중에서 60°C에서 중합시켰다. 4시간 동안

중합시킨 후 생긴 중합체를 걸러 모으고 잔류 개시제를 제거하기 위해 톨루엔으로 씻고 원심분리기로 중합체를 모았다. 이 중합체를 진공 건조시킨 후 황산건조기 속에 보관하였다.<sup>8)</sup> 수득률은 65%였고 분자량은  $3.8 \times 10^5$ 이었다.<sup>8)</sup>

6-APA, 7-ACA 및 앰피셀린 잔기를 갖는 중합체의 합성—6-APA, 7-ACA 및 앰피셀린 잔기를 곁가지에 포함하는 폴리아크릴산은 합성법이 유사하였다. β-락탐화합물과 폴리아크릴산중 카르복시산의 몰 농도비를 0.75 : 1, 0.50 : 1 및 0.25 : 1로 바꾸면서 반응시켜 세가지 조성을 합성하였다. 합성법이 모두 같았으므로 6-APA를 사용하여 0.75 : 1의 몰농도로 반응시킨 경우를 대표적인 예로 서술하였다.

폴리아크릴산 1.44g(0.02몰)을 염화티오닐과 4시간 반응시킨 후 여분의 염화티오닐을 감압하에서 증류하여 제거하고 남은 폴리염화아크릴로일을 염화메틸렌 15ml에 속였다. 6-APA 3.24g(0.015몰)을 염화메틸렌 30ml에 분산시키고 온도를 4°C로 유지하면서 트리에틸아민 4.05g(40 mmole)을 가하여 교반 용해시킨 후<sup>9)</sup> 폴리염화아크릴로일의 용액을 서서히 첨가하여 0°C에서 3시간 반응시켰다. 반응물을 감압 농축시키고 염산 수용액을 사용하여 산성화시킨 후 걸러서 증류수로 충분히 씻었다.

생성물을 실온에서 진공건조기와 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>를 사용해서 건조시켜 목적하는 고체 2.73g을 얻었다. (수득률 61.9%). 또한 6-APA : 폴리아크릴산 0.50 : 1(수득률 76.3%)과 0.25 : 1(수득률 77.9%)의 몰비를 같은 방법으로 합성하였다.

7-ACA에도 0.75 : 1(수득률 71.4%), 0.50 : 1(수득률 82.2%) 및 0.25 : 1(수득률 74.2%)의 몰비를 같은 방법으로 반응시켰으며, 마찬가지로 앰피셀린의 경우<sup>10)</sup>도 0.75 : 1(수득률 62.9%), 0.50 : 1(수득률 64.6%) 및 0.25 : 1(수득률 71.7%)로 반응시켜 목적으로 하는 중합체약을 합성하였다.

항균력 실험—앞에서 합성한 중합체약의 미생물에 대한 감수성을 알아보기 위해 6-APA, 7-ACA 및 앰피셀린 무수물을 대조군으로 하여 실험하였다.

미생물은 *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*(이상 그람양성균), *Alkaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*(이상 그람음성균), *Candida albicans*(*eukaryote*)를 사용하였다. 이들을 배양하기 위한 배지로서는 Müller-Hinton broth와 Müller-Hinton agar<sup>6)</sup>를 사용했다.

(1) 시료의 제조—0.5M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와 0.1M NaOH를 사용하여 pH7.5인 인산염 완충액<sup>11)</sup>을 제조한 후 각 시험관에 중합체약이 완충용액 1ml 당 100 $\mu\text{g}$  되게 취하였다. 완충액 속에서 중합체약 6-APA 0.25 : 1(4-1), 0.50 : 1(4-2) 및 0.75 : 1(4-3)은 약간 현탁한 상태에서 5% NaOH 용액을 몇 방울 첨가해서 더 맑게하여 시험하였고, 또한 완충액 속의 중합체약 7-ACA 0.25 : 1(5-1), 0.50 : 1(5-2) 및 0.75 : 1(5-3)은 매우 현탁하여 pH가 8.5까지 되도록 5% NaOH 용액을 첨가해서 용해도를 증가시켜 시험하였으나 워트 용액보다 훨씬 현탁하였다. 한편 중합체약 앰피실린 0.25 : 1(6-1), 0.50 : 1(6-2) 및 0.75 : 1(6-3)도 완충용액에 완전히 녹지 않았으나 5% NaOH 용액을 몇 방울 떨어뜨리니 거의 맑게 용해하여 그 용액을 시험에 사용하였다.

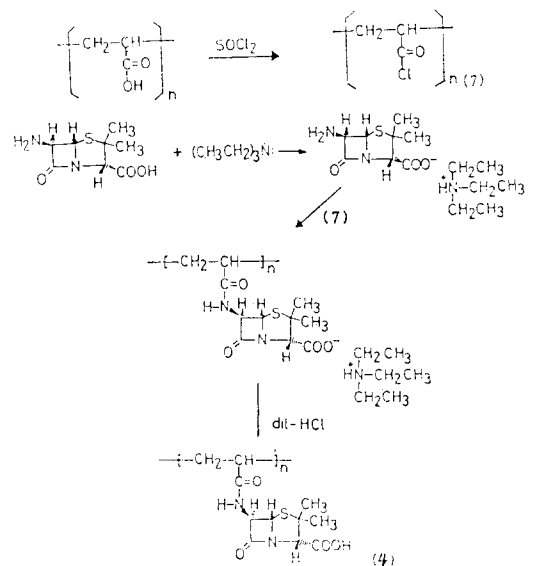
(2) 감수성 실험<sup>12)</sup>—Müller-Hinton agar 용액을 마개가 있는 시험관에 8ml씩 따라 붓고 121°C에서 30분간 멸균시킨 후 페트리 접시를 깔아서 냉각시켰다. 완전히 냉각된 후 이 agar plate에 앞서 열거한 각 미생물을 접종하여 단일 균 덩어리를 분리해 낸 후 여기서 1개 내지 2개의 균 덩어리를 이용하여 5ml Müller-Hinton broth에 접종한 다음 37°C에서 12시간 배양시켰다. 다음에 배양액 0.5ml와 50°C의 agar-용액 8ml를 Vortex 믹서를 이용하여 완전히 섞은 후, 이미 Müller-Hinton agar가 깔려있는 페트리 접시에 고르게 부어 넣었다. 10분간 건조시킨 후 상기에서 제조한 각 중합체약 2.5ml을 함유하는 용액 2.5ml를 6.5mm 크기의 디스크 위에 떨어뜨린 후 멸균 핀셋을 이용하여 이들 디스크를 agar 위에 올려놓고 24시간 후 저지환의 직경을 측정했다.

## 실험결과 및 고찰

**중합체약의 합성 및 구조 확인**—본 연구에서는  $\beta$ -락탐 화합물의 아미노기와 중합체의 산염화물을 반응시켜서 생성물을 얻는 것이 목적이었으므로 6-APA, 7-ACA 및 앰피실린의 카르복실기는 트리에틸아민과 우선 반응시켜 염으로 만들어서 카르복실기를 보호한후<sup>13)</sup> 원하는 반응을 시도하였다. 합성된 화합물은 IR 스펙트럼으로 구조를 확인하였고, 폴리아크릴산의 카르복시산기에 여러 약들이 실제로 반응한 양은 원소분석으로 알 수 있었다.

**6-APA와 폴리염화아크릴로일과의 반응**—6-APA의 카르복실기를 보호하고 동시에 용해시키기 위해 용매로 트리에틸아민을 사용하였다. 폴리아크릴산은 염화티오닐을 사용하여 폴리염화아크릴로일(7)로 만든 후 염화메틸렌에 녹이고 이것을 반응액에 가하였다. 반응 후 염산 용액으로 산성화시켜 목적하는 화합물(4-1), (4-2) 및 (4-3)을 얻었다. 전체적 반응경로는 Scheme 1에서 보여주고 있다.

Scheme 1



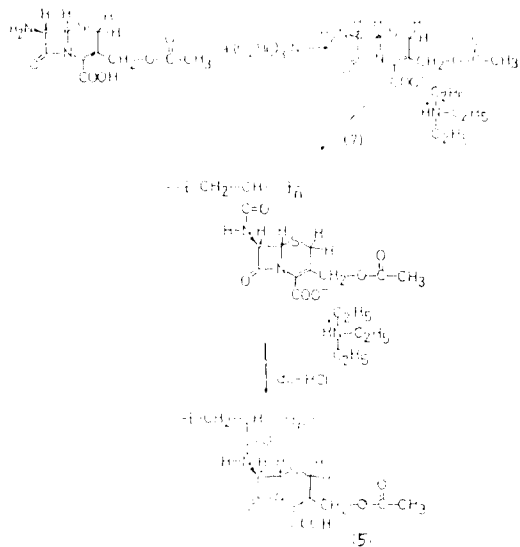


Table I-Elemental analysis of 6-APA modified poly(acrylic acid)\*.

[6-APA] [COOH]	E.A.**	Designation	N, wt (%)	C, wt (%)
0.25	4-1	4-1	4.5(17.2)	49.5(17.3)
0.50	4-2	4-2	6.4(30.3)	49.3(31.7)
0.75	4-3	4-3	6.5(31.0)	49.3(32.5)

\* The numbers shown in parentheses are the mole % of carboxylic acid group reacted with 6-APA. These values were calculated based on the results of elemental analysis.

\*\* Elemental analysis.

이때 폴리아크릴산의 카르복시산기와 6-APA의 몰비율 1 : 0.25, 1 : 0.50 및 1 : 0.75로 바뀌어 가면서 합성한 중합체약(각각 4-1, 4-2 및 4-3)의 조성을 Table I에 보여주고 있다.

이 Table에서 볼 수 있듯이 모든 경우에 생성물에 실제로 결합된 6-APA 잔기의 양은 반응시킨 양에 비하여 훨씬 낮았다. 특히 6-APA를 많이 사용했을 때 실제 반응한 양의 분율이 더 낮은 것을 알 수 있었다. 용액 중에 있는 폴리염화아크릴로일이 마구잡이 코일로 존재하기 때문에 6-APA가 산염화물기에 접근하기 어려울 뿐만 아니라, 일단 6-APA가 반응한 인접위치에는 또 다른 6-APA 분자가 접근하기 힘들게 입체장애

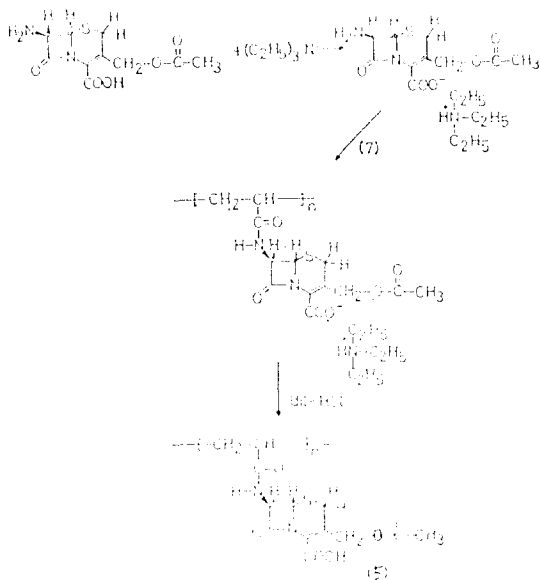
를 받기 때문에 이 같은 현상이 관찰되는 것 같다.

이들 중합체약의 IR 스펙트럼에서는 흡수띠들이 넓게 퍼져있어 구조확인이 힘들었으나 1750 cm<sup>-1</sup> 부근에서 β-락탐고리의 카르보닐기의 신축에 의한 흡수띠를 볼 수 있었고, 1710cm<sup>-1</sup>과

1650cm<sup>-1</sup>에서 각각  $\begin{matrix} \text{C} \\ \parallel \\ \text{COH} \end{matrix}$ 와  $\begin{matrix} \text{O} & \text{H} \\ \parallel & | \\ \text{C} & \text{N} \end{matrix}$ 의 카르보실기의 신축 운동에 의한 흡수띠를 볼 수 있었다.

7-ACA와 폴리염화아크릴로일과의 반응—7-ACA의 카르복실기를 보호하고 동시에 용해시키기 위해 용매로 트리에틸아민을 사용하였다. 폴리아크릴산은 임화티오닐을 사용하여 폴리염화아크릴로일로 만든 후 염화메틸렌에 녹이고 이것을 반응액에 가하였고, 반응 후 염화 용액으로 중화시켜 목적하는 화합물(5)을 얻었다. 전체적 반응경로는 Scheme 2에서 보여주고 있다.

Scheme 2



이때 폴리아크릴산의 카르복시산기와 7-ACA의 몰비율 1 : 0.25, 1 : 0.50 및 1 : 0.75로 바뀌어 가면서 합성한 중합체약(각각 5-1, 5-2, 5-3으로 표시하였음)의 조성을 Table II에 보여주고 있다.

**Table II**-Elemental analysis of 7-ACA modified poly(acrylic acid)\*.

[7-ACA] [COOH]	E.A.**	Designation	N, wt (%)	C, wt (%)
0.25	5-1	3.8(15.1)	49.2(12.5)	
0.50	5-2	6.1(35.4)	48.5(35.4)	
0.75	5-3	6.7(43.3)	48.3(42.9)	

\* The numbers shown in parentheses are the mole % of carboxylic acid group reacted with 7-ACA. These values were calculated based on the results of elemental analysis.

\*\* Elemental analysis.

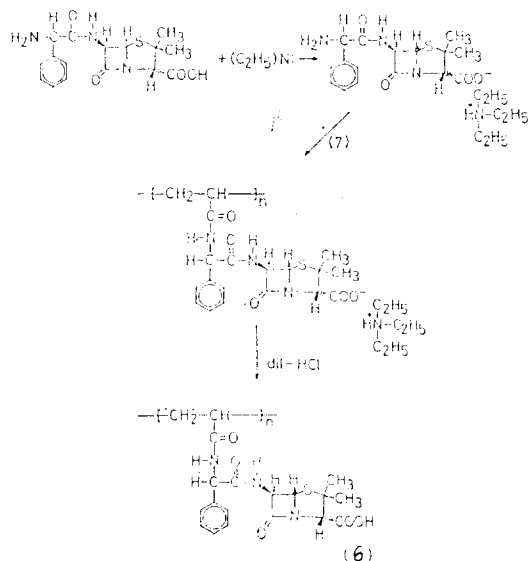
이 Table에서 볼 수 있듯이 여기에서도 모든 경우에 생성물에 실제로 결합된 7-ACA의 양은 반응시킨 양에 비해 훨씬 적었다. 그 이유는 7-APA 유도체의 경우와 같이 중합체의 형태 및 입체장애 때문으로 생각된다.

이들 중합체약의 IR스펙트럼에서는 대략 1770, 1690, 1645 $\text{cm}^{-1}$ 에서 각각  $\beta$ -락탐고리,  $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ ,  $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$ 의 카르보닐기의 신축 진동에 의한 흡수띠를 볼 수 있었다.

엠펜실린과 폴리염화아크릴로일과의 반응—엠펜실린의 카르복실기를 보호하고 동시에 용해시키기 위해 용매로 트리에틸아민을 사용하였다. 폴리아크릴산은 염화티오닐을 사용하여 폴리염화아크릴로일로 만든 후 염화메틸렌에 넣고 이것을 반응액에 가하였고, 반응 후 염산 용액으로 중화시켜 목적하는 화합물 (6)을 얻었다. 전체적 반응경로는 Scheme 3에서 보여주고 있다.

이때 폴리아크릴산의 카르복시산기와 엠펜실린의 몰비를 1 : 0.25, 1 : 0.50 및 1 : 0.75로 바꾸어 가면서 합성한 중합체약(각각 6-1, 6-2, 6-3으로 표시하였음)의 조성을 Table III에 보여주고 있다.

이 경우에는 Table에서 볼 수 있듯이 모든 경우에 생성물에 실제로 결합된 엠펜실린의 양은 반응시킨 양에 비하여 훨씬 낮았다. 이들 중합체약의 IR스펙트럼은 대략 1740 $\text{cm}^{-1}$ 에서  $\beta$ -락탐의 카르보닐의 신축진동에 의한 흡수띠를, 1695

**Scheme 3**

$\text{cm}^{-1}$ , 1650 $\text{cm}^{-1}$ 에서 각각  $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ 와  $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$ 의 카르보닐의 신축진동에 의한 흡수띠를 보여주었으며 1530 $\text{cm}^{-1}$  내지 1500 $\text{cm}^{-1}$ 에서  $\text{N}-\text{H}$ 의 방향족  $\text{C}=\text{C}$ 에 의한 흡수 띠를 보여주었다.

화합물의 항균력—실험에서 서술된 방법으로 행한 여러 미생물에 대한 항균력 실험 결과를 Table IV에 종합하였다. 표에서 알 수 있듯이 우선 대조군으로 사용한 6-APA, 7-ACA 및 엠펜실린의 항균력을 비교하여 보면 6-APA와 7-AOA는 항균력을 갖고 있지 못하고, 엠펜실린

**Table III**-Elemental analysis of ampicillin modified poly(acrylic acid)\*.

[Ampicillin] [COOH]	E.A.**	Designation	N, wt (%)	C, wt (%)
0.25	6-1	5.6(17.0)	53.4(16.3)	
0.50	6-2	7.2(28.8)	54.4(26.9)	
0.75	6-3	8.0(37.2)	54.9(33.7)	

\* The numbers shown in parentheses are the mole % of carboxylic acid group reacted with ampicillin. These values were calculated based on the results of elemental analysis.

\*\* Elemental analysis.

Table IV—Antibacterial activities of the polymeric drugs.

Classification	Microorganism	Compound											
		(1)	(2)	(3)	(4-1)	(4-2)	(4-3)	(5-1)	(5-2)	(5-3)	(6-1)	(6-2)	(6-3)
Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	###	+	+	—	+	—	+	+	—	—
Gram(+)	<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—
Gram(+)	<i>Sarcina lutea</i>	+	—	###	—	—	—	+	+	+	+	###	###
Gram(-)	<i>Alkaligenes faecalis</i>	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	###	+
Gram(-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	###
Eukaryote	<i>Candida albicans</i>	—	—	###	—	—	—	+	+	+	+	###	+

Inhibition Zone ; — : ≈Zero, + : <12mm, ++ : ≈12~20mm, ### : ≈20~30mm, #### : >30mm.  
 Potency of ampicillin anhydrous(purity : 99.0%) used was 990 mcg/mg.

은 일부 그람양성균과 eukaryote에 우수한 항균력을 갖고 있음을 알 수 있다.

본 연구에서 합성한 중합체약중 6-APA 유도체(4-1, 4-2, 4-3)는 항균력을 갖지 못하고, 7-ACA 유도체(5-1, 5-2, 5-3)는 7-ACA 자체보다 항균력이 증가되었고 특히 그람양성균에 대해 항균력이 증가되었다. 엠펜실린 유도체(6-1, 6-2, 6-3)는 엠펜실린과는 달리 그람양성균 뿐 만 아니라 그람음성균에도 항균력이 매우 증가하였다.

그리고 7-ACA와 엠펜실린의 유도체 중 β-락탐 간의 농도가 큰 중합체약이 β-락탐 간의 농도가 낮은 약보다 항균력이 큼을 알 수 있다.

한편 엠펜실린의 폴리아크릴산 유도체 뿐 아니라 6-APA와 7-ACA의 폴리아크릴산 유도체는 모두 용해가 잘 되지 않아서 감수성 실험에 어려움을 겪었으나, 원래 폴리아크릴산의 분자량이 3.8×10<sup>5</sup>이나 되어 분자량이 더 작은 폴리아크릴산을 사용하거나, 더 친수성이 큰 중합체를 사용하여 앞에서와 같은 실험을 하면 훨씬 용해가 잘되고 감수성 실험에 더 좋은 효과가 나타날 것으로 기대된다.

또한 중합체에 β-락탐계 항생물질 구조가 결합되어 있을 때는 항균력의 지속성이 예상되나 아직 지속성에 관한 결과는 얻지 못하였다.

문헌

1) Guy Donaruma, L. and Vogl, O.: "Polymeric

Drugs", Acad. Press., N.Y., 1979, p.162-163.

2) 장민선 : "새로운 β-락탐계 항생물질의 합성 및 합성균에 관한 연구", 고려대학교 화학과 석사학위논문, 서울, 1983.

3) Lednicer, D. and Mitscher, L.A.: "The Organic Chemistry of Drug Synthesis", Wiley-Interscience Pub., N.Y., 1977, p. 408-p. 420.

4) Flynn, E.H.: "Cephalosporins and Penicillins", Acad. Press., N.Y., 1972, p. 28.

5) British Pharmacopoeia, Vol. 1, London Her Majesty's Stationery Office, 1980, p. 33.

6) "BBL. Manual of Products and Laboratory Procedures," Dickinson and company, N.Y., 1973, p. 126-p. 127.

7) Mark, H.F., Gaylord, N.G., and Bikales, N.M.: "Encyclopedia of Polymer Science and Technology," Interscience Pub., N.Y., 1972, p.197-p. 226.

8) Rodriguez, F.: "Principles of Polymer System," Hemisphere Pub., N.Y., 1982, p.163-p.167.

9) Bodanszky, M., Klausner, Y.S., and Ondetti, M. A.: "Peptide Synthesis," Wiley-Interscience Pub., N.Y., 1976, p. 50.

10) U.S. Patent 3, 140, 282 (July 7, 1964).

11) Kolthoff, I.M. and Sandell, E.B.: "Quantitative Chemical Analysis," Mcmillan Company, N.Y., 1969, p.1162.

12) Lorian, V.: "Antibiotics in Laboratory Medicine," Williams and Wilkins, Baltimore, 1980, p.24-p. 54.

13) Bodanszky, M., Klausner, Y.S., and Ondetti, M.A.: "Peptide Synthesis," Wiley-Interscience Pub., N.Y., 1976, p. 15.