

*In vitro*에서 Sulfonamide의 Dual Action에 의한 항균특성

정덕채 · 황성규* · 김종완* · 석지현** · 김운겸***

인천대학교 화학과 · 명지대학교 화학공학과
영인대학교 환경보건학과** · 서울산업대학교 정밀화학과***
(1999년 11월 11일 접수 : 1999년 11월 30일 채택)

Antibiotics Characteristics by Dual action of Sulfonamide Agents *In vitro*

Duck-Chae Jung · Sung-Kyu Hwang* · Jong-Woan Kim*
Ji-Hyun Seok** · Woon-Kyeom Kim***

Dept. of Chemistry, University of InChon

*Dept. of Chemical Engineering, Myong-Ji Univ.

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

***Dept. of Fine chemistry, Seoul National Univ. of Technology

(Received November 11, 1999 ; Accepted November 30, 1999)

Abstract : 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. Crosslinked sulfadiazine-sulfacetamide such as antibiotics synthesized by crosslinking reaction such as glutaraldehyde. These structures of the compounds were confirmed by IR, NMR. 4 strains of Gram(+) and Gram(-) revealed effective susceptibility to synthetic crosslinked sulfadiazine-sulfacetamide.

I. 서론

기존 약물의 투여방식은 단시간 내에 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)} 특히, 항생제와 항암제 등의 의약품은 독성농도와 치료 유효농도 사이의 차이가 매우 작으며 선택성이 작으므로 기존 투여방식을 개선하여야 한다.³⁾ 그러므로 약물의 약리활성 구조에 영향을 주지 않는 다른 약물의 구조를 도입하는 한 방법으로 의약품의 이중작용(Dual Action)에 관한 연구가 보고되고 있다. 그 예로 cephalosporin이나 penem/carbapenem은 세포벽 합성에 관여하는 효소를 불활성화하거나 β -lactamase에 의하여 불활성화되면 락탐고리가 깨지고 C3 위치의 치환기가 유리된다. 이때 이탈기가 quinolone과 같은 항균제이면 이러한 구조는 이중작용을 나타내

게 된다. 전체적으로 β -lactam이 가진 Gram양성균에 대한 효과와 quinolone의 Gram음성균에 대한 강한 효과를 합하여 광범위한 스펙트럼을 나타내게 된다. 또한 quinolone은 용해도가 문제가 되므로 이는 용해도를 증가시킨 quinolone의 전구약물 형태를 나타낸다.^{4,5)}

한편 대부분의 세균감염은 항균제로 치료하나 내성균주의 출현이 커다란 문제로 되어왔다. 따라서 교차내성이 없는 항균제를 개발하는 것이 매우 중요한 과제이다. 이중 sulfaj은 지금도 요로감염증, 화상, 장염, 안과영역 등에서 중요한 위치를 차지하고 있으며 sulfamine을 모체로 한 수많은 sulfaj 항균제가 개발되었다. sulfaj의 항균기간에 관하여는 다양한 설이 제시되어왔다. 그 중에서 세균의 대사에 필요한 PABA(p-aminobenzoic acid)와 pterin과의 축합반응을 방해하는 competitive inhibition theory이 지지되고 있다.⁶⁾ Sulfaj은 N-치환 이중방향족 고리에 따라서 항균력에 차이가 있으며 신장독성과 관련하여 산성노 조건에서의 용해도가 중요하며 경구 또는 주사제형으로 투여하는데 주사제

형시 나트륨염으로 투여한다. Trimethoprim과 같은 dihydrofolate reductase(DHFR)억제제와 sulfa제를 병용하여 투여하면 그 작용은 상승적으로 나타나며 내성균주의 출현가능성은 줄어든다.^{7,8)} Sulfa제 중 국소에 적용하는 약물이 있는데 sulfacetamide는 안과영역에서 사용되고 있으며 mafenide는 화상치료에 이용된다. 나병치료에 사용하는 sulfone유도체로는 Dapsone이 대표적인 약물이다. Sulfa제가 항균작용을 나타내는 세균으로서는 Gram양성의 구균과 Gram음성의 간균의 일부가 있다.

본 연구에서는 약물의 약리활성 구조에 영향을 주지 않고 다른 약물의 구조를 도입하는 한 방법으로 가교제인 glutaraldehyde를 이용하여 sulfacetamide와 합성한 sulfadiazine을 두 약물의 약리활성구조에 영향을 주지 않는 치환기에 가교 결합 시키고 이를 *In vitro*에서 디스크 확산법을 이용하여 Dual Action에 의한 항균특성을 연구하여 보았다.

II. 실험

1. 실험재료 및 기기분석

먼저 sulfadiazine을 합성하기 위하여 4-nitrobenzenesulfonyl chloride와 2-amino pyrimidine은 Aldrich사 특급시약을 그대로 사용하였으며 sulfacetamide는 Sigma사의 특급시약을 그대로 사용하였다. 또한 항균제끼리의 화학적 결합을 위하여 TCI사의 glutaraldehyde(이하 GA)를 재증류하여 사용하였다. 용매로 사용한 N, N-dimethylformamide(이하 DMF)은 Yakuri사의 특급시약을 초산은 덕산 화학의 일급시약을 일반 정제법⁹⁾으로 재 증류하여 사용하였다. Bio-RAD FTS형 FT-IR을, JEOL(300MHz)사의 ¹H-NMR을 통해 합성을 확인하였다. 항균력 측정에 사용한 균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Streptococcus pyogenes* ATCC 21059, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027를 국립보건원에서 분양 받아서 배양하여 실험하였다. 배지로는 Difco사의 Tryptic soy broth과 Mueller-Hinton Medium 사용하였고, petri dish, glass tube, pipet, tip등은 멸균하여 사용하였다.

2. Sulfadiazine의 합성¹⁰⁾

4-nitrobenzenesulfonyl chloride 11.1g(0.05mol)과

2-aminopyrimidine 4.8g(0.05mol)을 DMF에 완전히 용해시키고 pyridine촉매하에서 45분간 상온에서 반응하여 sulfonamide를 합성하였다. 이때 얻어진 반응물을 Fe와 1N염산을 촉매로 사용하는 Bechamp 환원법¹¹⁾을 이용하여 24시간동안 환류하여 생성된 결정물을 에탄올과 증류수로 재결정 처리하고, 40°C의 진공오븐과 P₂O₅를 사용하여 2일 동안 감압건조(70cmHg)시켜 백색의 sulfadiazine 9.5g(Mw 250.3)을 얻었다.

합성방법은 Fig. 1에 나타내었다. 이때, 수율은 75.9%이었다.

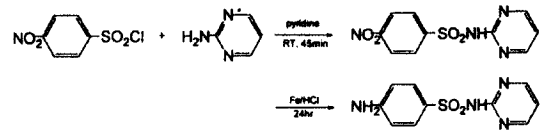


Fig. 1. Synthesis of sulfadiazine

3. Dual action에 의한 항균제의 합성

합성한 sulfadiazine 8g(0.032mol)과 sulfacetamide 6.85g(0.032mol)을 DMF 20.0mL에 각각 용해한 후 GA 12.8g(0.032mol)를 1시간에 걸쳐 적가시키면서 3구 등근 플라스크에서 반응 시켰다. 여기에 2.0% 초산수용액 100mL을 서서히 적가하여 110°C에서 4시간 교반시킨 다음, 상온에서 2시간 반응시킨 후 하루동안 -5°C의 냉암소에 방치하였다. 생성된 결정물을 THF로 재결정 처리하고 회전증발기를 통해 여분의 불순물을 제거하고 에탄올과 증류수로 세척하였다. 40°C의 진공오븐과 P₂O₅를 사용하여 2일 동안 감압건조시켜 sulfadiazine-sulfacetamide 10.6g(Mw 528.6)의 분말결정을 얻었다.

합성방법은 Fig. 2에 나타내었다. 이때, 수율은 62.7%이었다.

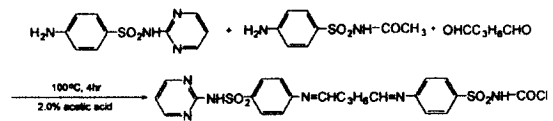


Fig. 2. Synthesis of sulfadiazine-sulfacetamide.

4. 항균제의 항균력 측정

디스크 확산법의 경우는 Tryptic Soy Broth을 121°C, 1기압에서 15min동안 멸균하고 국립보건원으로부터 분양받은 4종의 냉동보관 균주 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia*

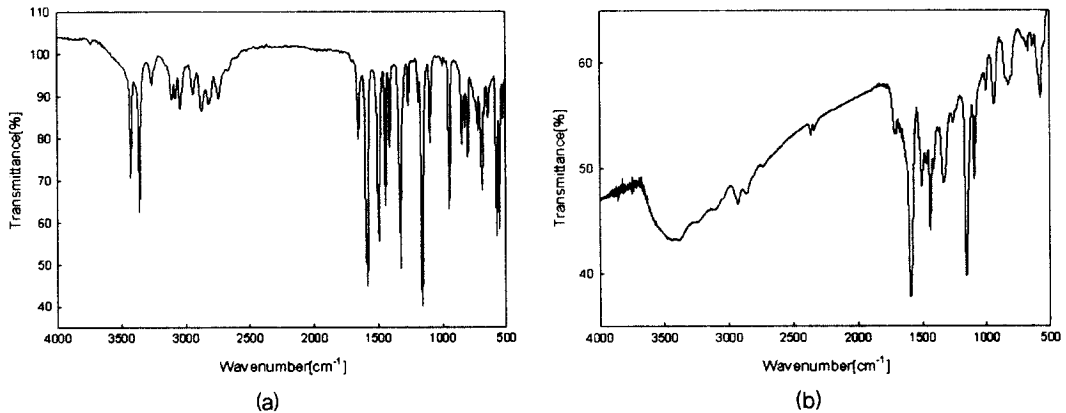


Fig. 3. IR spectrum of sulfadiazine(a) and synthetic compound(b).

coli ATCC 8739, *Streptococcus pyrogenes* ATCC 21059, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027를 37°C 배양기에서 하루동안 배양하였다. Mueller Hinton Medium을 평량하여 증류수에 용해시킨 후, 121°C, 1기압에서 15min 동안 멸균하고 실험에 필요한 다른 도구들도 멸균하여 준비하였다. 배지를 50~55°C로 식힌 후 petri dish에 10ml씩 분주하고 flow chamber에서 1시간정도 건조시킨 후 멸균된 면봉을 균 배양액에 충분히 적시어 표면이 건조된 배지 위에 골고루 접종하였다. 처음에는 전 표면에 한 방향으로 문질러 바르고 다시 되풀이하여 전표면에 골고루 접종하였다. 균집종이 끝난 petri dish에 약물을 적신 paper disc를 가볍게 눌러 고정시키고 30분이 지난 다음 37°C 배양기에 18시간동안 배양시킨 후 판독하였다.

평판배지 회석법은 agar 배지를 이용하여 최소살균농도를 측정하는 방법이다. 먼저 순수 배양된 배지에서 1~2 집락을 따서 0.5ml Tryptic Soy Broth가 담긴 유리 튜브에 풀어 37°C 배양기에서 하루동안 배양하였다. 배지를 평량하여 증류수로 잘 녹인 후 121°C, 1기압에서 15min 동안 멸균하고 디스크 확산법에서와 같이 다른 도구들도 멸균하여 준비하고 약물은 2000 µg/mL 농도로 제조 후 파피비를 각각 다르게 하여 petri dish에 분주하였다. Petri dish에 시험약물 이름 및 농도를 표시하고 배지는 50~55°C로 식힌 후 앞서 준비한 약물을 담고 있는 petri dish에 10mL씩 분주하여 잘 섞어 약물을 담고 있는 plate를 만들었다. 완전히 plate가 굳으면 flow chamber에서 1시간 정도 건조시킨 후 배양된 균액을 0.9% saline으로 1000배 회석하여 약물을 담고 있는 plate를 낮은 농도에서 높은 농도의 순서로 균액을 접종하였다. 접종한 균액이 완전히 배지내

에서 흡수될 때 까지 실온에 방치한후 완전히 마른 plate를 37°C 배양기에서 18시간 배양시킨 후 판독하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 항균제의 합성

Robin와 Winnek의 합성법을 이용하여 얻어진 sulfadiazin과 sulfacetamide을 약물 합성에 이용되는 glutaraldehyde법¹²⁾을 이용하여 2.0% 초산수용액하에서 합성하였고 이를 FT-IR, ¹H-NMR에 의해 확인하였다. Fig. 3(a) FT-IR에서는 1325cm⁻¹, 1140cm⁻¹부근에서 2-amino pyrimidine에서는 볼 수 없는 SO₂기의 특성흡수대가 나타나 있었으며, Fig. 4(a) NMR에서는 6.0ppm 부근의 sulfadiazine의 벤젠고리에 NH₂기가 나타나 있음으로 sulfadiazine의 합성을 확인하였다. Fig. 3(b) 합성 항균제의 IR에서는 sulfadiazine의 3400cm⁻¹부근에서 NH₂기가 NH로 1690cm⁻¹부근에서 C=N기의 특성흡수대가 생성되었고, Fig. 4(b) NMR에서는 6.0ppm의 NH₂기가 소멸되고 8.4ppm 부근에서 C=N기의 특성흡수대가 3.5ppm 부근에서 glutaraldehyde의 CH₂기의 특성흡수대가 생성됨으로써 새로운 항균제의 합성을 확인하였다.

2. 항균제의 항균력 실험

2-1. 디스크 확산법

Mueller Hinton Medium에 접종하였던 세균들을 배양한 후 18시간 후에 판독한 결과를 Table 1에

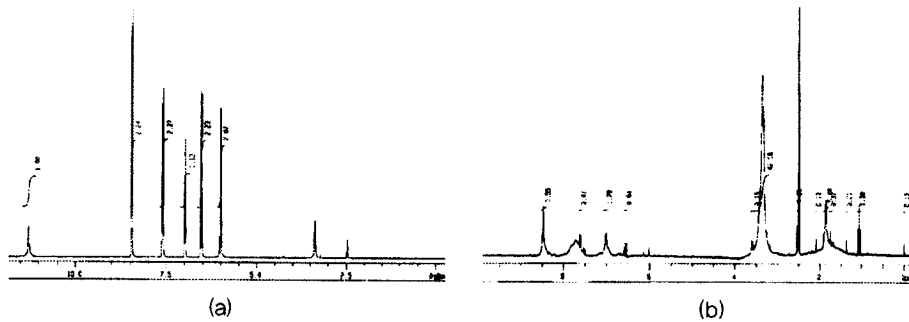


Fig. 4. NMR spectrum of sulfadiazine(a) and synthetic compound(b).

나타내었다. 일반적으로 sulfonamide의 내성과 감수성의 판단기준은 내성은 발육저지대의 지름이 12.0mm이하, 중등도 감수성의 경우 13.0~16.0mm, 감수성은 17.0mm이상으로 나타나있다.¹³⁾ 본 실험에서 합성된 항균제의 경우 500µg/mL에서 13.2~15.2mm의 clean zone을 보여 중등도 감수성을 나타냈으며 1100µg/mL에서는 17.8~20.8mm의 clean zone을 보여 4종의 균에 모두에 감수성을 보임을

알 수 있다. Fig. 5는 *Pseudomonas aeruginosa*의 약물의 농도별 디스크 확산법의 결과 사진을 나타낸 것이다. 약물의 농도가 증가할수록 clean zone의 크기가 증가하는 것을 확인하였다. Fig. 6은 *Staphylococcus aureus*의 항균제의 농도별 디스크 확산법의 결과 사진으로 약물의 농도가 증가할수록 clean zone의 크기가 증가하나 Fig. 5에 비교하여 크기가 적었다. 이는 그람음성 호기성 간균인

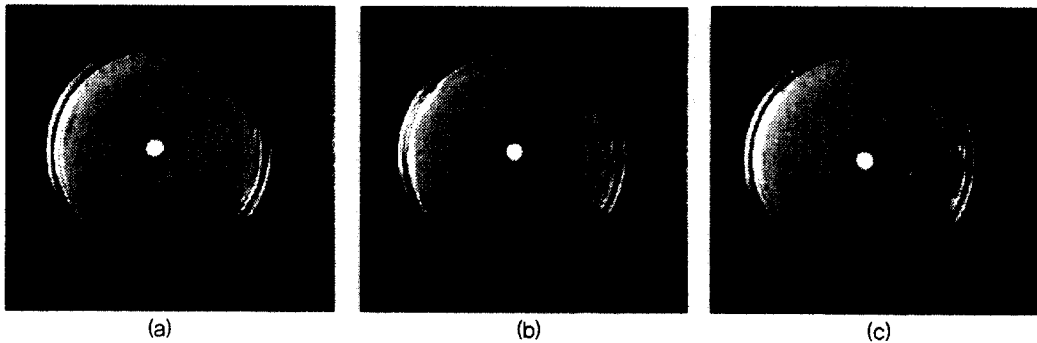


Fig. 5. Photographs of 500µg/mL(a), 1100µg/mL(b) and 1500µg/mL(c) on *Pseudomonas aeruginosa*[Gram(-)] ATCC 9027 by Disk Susceptibility Test

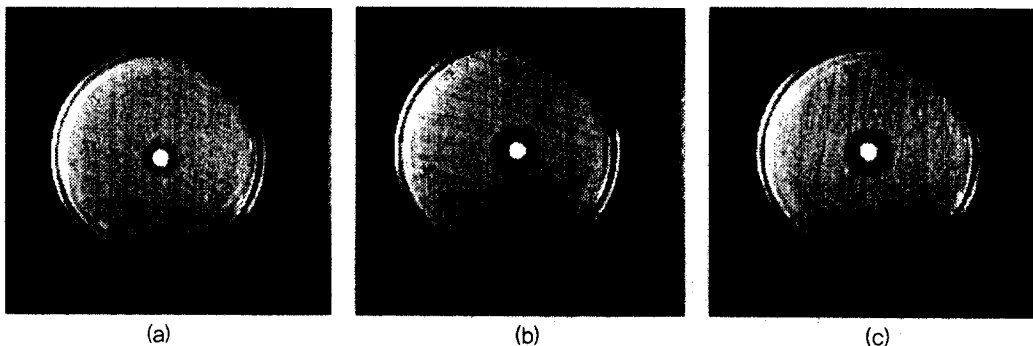


Fig. 6. Photographs of 500µg/mL(a), 1100µg/mL(b) and 1500µg/mL(c) on *Staphylococcus aureus*[Gram(+)]ATCC 6538P by Disk Susceptibility Test

*Pseudomonas aeruginosa*에 우수한 감수성을 나타내는 sulfacetamide의 영향으로 *Staphylococcus aureus*보다 우수한 감수성을 나타내는 것으로 보인다.^{14, 15)}

Table 1. Disk Susceptibility Test of Synthetic Compound

Bacteria	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	13.6mm	17.8mm	19.6mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	13.6mm	19.4mm	20.6mm
<i>Streptococcus pyrogenes</i> ATCC 21059	13.2mm	19.2mm	20.4mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	15.2mm	20.8mm	23.8mm

2-2. 평판배지 회석법

합성한 항균제를 평판배지 회석법으로 측정된 최소살육농도를 Table 2에 나타내었다. 디스크법의 결과와 유사하게 그람양성인 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*와 그람음성인 *Escherichia coli* 경우 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 감수성을 나타내었고, 그람음성 호기성간균인 *Pseudomonas aeruginosa*는 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 감수성을 보여 평판배지 회석법 역시 sulfacetamide의 영향으로 그람음성 호기성간균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 보다 우수한 항균 특성을 나타나는 것으로 보인다.

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration Test of Synthetic Compound

Bacteria	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)									
	250	500	750	1000	1100	1250	1500	1750	2000	
<i>staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>Streptococcus pyrogenes</i> ATCC 21059	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

- : absence of growth, + : presence of growth

IV. 결론

항생제의 내성과 기존의 투여방식의 문제점을 해결하고자 DDS(Drug Delivery System)의 일종인 dual action을 이용하여 기존의 sulfa제 항균제를 가교제를 통해 결합시켜서 디스크 확산법을 통해 항균력을 측정하였다.

① Dual Action방법으로 합성한 항균제는 sulfadiazine의 3400 cm^{-1} , 6,0ppm부근에서의 NH_2 기의 특성흡수대가 NH 기로 glutaraldehyde를 통해 결합시킨 항균제는 IR, NMR에서 1690 cm^{-1} , 8,4ppm

부근에서 가교결합에 의한 C=N기의 특성흡수대가 생성되고 glutaraldehyde의 CH_2 기의 특성흡수대인 2900 cm^{-1} , 3,5ppm부근에서 생성됨으로써 가교제에 의한 항균제끼리의 합성을 확인하였다.

② 디스크확산법의 경우 약물의 농도가 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 중등 감수성을 보이고 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 그람양성에 감수성을 보여 그람양성, 음성 모두에 비교적 우수한 항균력을 보였다.

③ 평판배지 회석법의 경우 약물의 최소 살균농도가 1100~1250으로 디스크 확산법의 경우와 같이 그람음성과 양성 모두에 비교적 우수한 항균력을 보였고, 특히 sulfacetamide의 영향으로 합성한 항균제는 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여 우수한 항균력을 보여 sulfa제 항균제끼리의 Dual Action의 가능성을 보여 주었다.

참고문헌

1. J. H. Kim and Y. M. Lee, *J. of Korean Ind. & Eng. Chemistry*, **2**, 87(1991).
2. S. K. Chandra-sekaran and R. Capoozza, *J. of membranae Sci.*, **3**, 271(1978).
3. J. G. Loyd - Jones, "Drug Delivery Systems",

- Ellis Horwood Ltd., England, 11(1987)
4. H. A. Albrecht *et al.*, *J. Med. Chem.*, **34**, 2857(1991).
5. A. J. Corraz *et al.*, *J. Med. Chem.*, **35**, 1828(1992).
6. Kun il kang, *Medical chemistry*, 250(1993).
7. J. H. Chan and B. Rothm, *J. Med. Chem.*, **34**, 550(1991).
8. J. V. Johnson, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **32**, 1942(1989).
9. D. D. Perrin and W. L. F. Armarego, *Purification of laboratory Chemicals*, **3rd Ed.**, 365(1988).

10. P. S. Winnek and Jr., R. O. Robin, *US Pat.*, 2,410,793(1947).
11. A. J. Bechamp, *Ann. Chim. Phys.*, 42(3), 186(1854)
12. M. J. Poznansky, in *Methods of Drug Delivery*, Pergamon Press, Oxford, 82(1986).
13. M. D. Victor Lorian, Editor, *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Third Edition, New York, 17(1980).
14. 박선섭, 유일준, 이원유, 조원순, *약리학*, 정문각, 334(1997).
15. 서울대학교 의과대학 약리학교실, *약리학*, 고려의학, 562(1994).