한국환경보건학회지, 제30권 제5호(2004)
Kor. J. Env. Hlth., Vol. 30, No. 5, pp 374~377(2004)

Glutaraldehyde를 이용한 설파제의 합성과 지속성에 관한 연구

윤철훈†
대진대학교 화학공학과

A Study on the Durability and Synthesis of Sulfa Agents Using Glutaraldehyde

Cheol Hun Yoon†
Department of Chemical Engineering, DaeJin University, Pocheon 487-800, Korea
(Received Sep. 17, 2004/Accepted Dec. 16, 2004)

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.

Keywords: dual action, sulfadiazine, synthetic handle, crosslink agent

I. 서 론

기존의 약물을 이용하여 제재나 투여방식을 개선함으로써 효율을 증대시키는 변형 약물의 연구개발이 활발히 이루어지고 있다.[1,2] 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 synthetic handle을 도입하는 방법[5]을 이용하여 반감기가 짧은 약물을 서로 결합하여 체내에서 방출시간을 조절하고 약물의 복합효능을 나타내는 dual action 시스템이 많이 이용되고 있다. 이러한 항균제의 dual action에 대하여 Albrecht[6,7]는 cefotaxime에 ciprofloxcin을 카바메이트 형태로 결합한 화합물은 cephalosporin과 quinolone에서 나타나는 광범위한 스펙트럼을 보여 주었고 Corraz[8]는 펜엠/카바페엠과 ciprofloxcin이 결합한 화합물이 세파로스포린이나 퀴놀론이 가지지 못한 혐기성 세균에 대한 항균활성을 보임으로써 dual action의 가능성을 보여주었다. 이와 같이 dual action에 대한 약물끼리의 합성방법으로는 인체에 독성작용이 적은 가교제를 사용한 glutaredehyde 법이 널리 사용되어지는데 Oyrton 등[9]은 키토산의 1차 아민기를 glutaredehyde의 알데히드기로 결합한 가교 키토산에 lactate dehydrogenase를 함유시켜 랫드의 간세포에서 이들 약물을 5일 동안 서서히 방출시켰음을 보고하였으며, Poznansky[10]는 알부민에 숙취해소에 좋은 효능을 보이는 asparaginase를 결합하여 약품 합성의 이용 가능성을 보고하였다.

한편 Sulfonamide계 약물[11]들은 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 세균감염을 치료하나 내성균주의 출현이 커다란 문제로 되어왔다.

본 연구에서는 기존 약물의 약리활성 구조에 영향을 주지 않고 새로운 약물의 구조를 합성하는 방법으로 설파제의 일종인 sulfadiazine과 sulfanilamide를 synthetic handle로써 유기물 가교제로 사용되는 glutaraldehyde를

†Corresponding author : Department of Chemical Engineering, DaeJin University
Tel: 82-31-330-6386, Fax: 82-31-337-2951
E-mail : ych520@hanmail.net

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.

II. 실 험

1. 재료 및 기기분석

본 연구에 이용한 sulfadiazine과 sulfanilamide는 TCI사 특급시약을 그대로 사용하였으며 가교결합을 위하여 Waco사의 glutaraldehyde(이하 GAD)를 재증류하여 사용하였다. 초산은 동양화학의 일급시약을 재증류하여 사용하였으며 phosphate buffered saline(이하 PBS)는 Sigma사의 특급 시약을 사용하였다. 합성을 확인하기 위하여 HP사의 FT-IR을, JEOL사의 ^{1}H-NMR을 통해 합성을 확인하였다. 합성한 약물의 *in vitro*에서 pH 7.4와 1.5에서의 분해거동을 확인하기 위하여 HP사 UV1040C을 이용하여 시간에 따른 농도의 변화값을 측정하였다.

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

2. 가교제를 이용한 항균제 합성

Sulfadiazine 8.0 g(0.032 M)과 sulfanilamide 5.5 g (0.032 M)을 DMSO 80 m*l*에 각각 용해한 후 GAD 14.1 g(0.035 M)을 1시간에 걸쳐서 적하시키면서 3구 등근 플라스크에서 반응시켰다. 여기에 2.0% 초산수용액 100 m*l*을 서서히 떨어뜨리면서 100℃에서 8시간 교반한 다음 상온에서 2시간 반응 후 24시간동안 −5℃의 냉암소에 방치하였다. 생성된 결정을 THF로 재결정 처리하고 불순물을 제거하고 에탄올과 증류수로 세척하였다. 40℃에서 진공오븐과 P_2O_5를 사용하여 48시간 동안 감압 건조시켜 수율 70.8%인 황토색의 분말결정의 합성 항균제를 얻었으며 합성과정은 Fig. 1에 나타내었다.

3. UV에서의 항균제 분해거동 측정

본 연구에서는 경구투여를 가정하여 위산과 유사한 조건인 pH 1.5 완충용액을 제조하였고, 주사제에 의한 투여를 고려하여 혈장과 유사한 조건인 pH 7.4의 PBS 용액으로 완충용액을 제조하여 사용하였다. 합성약물의 *in vitro*에서의 약리 활성구조에 이르는 분해거동을 확인하고자 각각 제조된 완충용액을 99.0 m*l*을 삼각플라스크에 넣었다. 미리 37.0±0.5℃에 맞추어 놓은 항온조에 삼각플라스크를 넣고 온도평형이 이루어지게 하였다. 여기에 합성약물의 농도가 2.0×10^{-5}M의 stock solution인 DMSO 용액을 1.0 m*l* 가하여 그 농도가 2.0×10^{-7}M이 되도록 한 후, 110 rpm에서 sink condition을 유지하기 위하여 1.0 m*l* 채취 후 즉시 1.0 m*l*의 완충용액을 넣어 농도를 유지하고 사용한 약물의 최대 흡수파장(λ_{max})에서 시간에 따른 변화를 흡광도법에 의하여 측정하였다.

4. 디스크 확산법에 의한 항균성 측정

Tryptic Soy Broth를 121℃에서 15분 동안 멸균하고 분양받은 4종의 냉동보관 균주를 배양기에서 24시간 동안 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 10 m*l*씩 분주하여 flow chamber에서 1시간정도 건조시킨 후 멸균된 면봉을 균 배양액에 충분히 적시어 표면이 건조된 배지 위

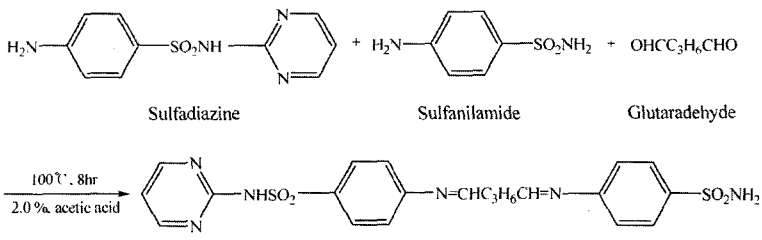

Fig. 1. Synthesis of crosslinked sulfa agent.

에 골고루 접종하였다. 이 때 처음에는 전 표면에 한 방향으로 문질러 바르고 다시 되풀이하여 전표면에 골고루 접종하였다. 균 접종이 끝난 배지에 약물을 적신 paper disc를 가볍게 눌러 고정시킨 후 30분 이내 37°C 배양기에 18시간동안 배양시킨 후 판독하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 항균제의 합성확인

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

Fig. 2(a)는 원물질인 sulfanilamide의 IR로 3300~3500 cm^{-1} 부근에서 방향족에 치환된 1차 아민기의 두 개의 특성흡수대가 나타나는 것을 확인하였다. 합성한 항균제의 IR인 Fig. 2(b)에서는 sulfadiazine과 sulfanilamide의 1차 아민기가 GAD의 알데히드기와 결합하여 3300~3500 cm^{-1} 부근에서 방향족에 치환된 1차 아민의 특성흡수대가 2차 아민기의 하나의 특성흡수대로 1650~1690 cm^{-1} 부근에서 이민기의 특성흡수대가 생성됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 3(a)는 원물질인 sulfanilamide의 NMR로 방향족에 치환된 1차 아민기의 2H가 5.8 ppm 부근에서 SO_2NH_2기의 2H가 6.9 ppm 부근에서 확인되었고, 합성 항균제의 NMR인 (b)에서는 1차 아민기의 2H가 5.8 ppm 부근에서 사라지고 GAD의 CH_2기의 6H가 3.5 ppm 부근에서 생성됨으로써 합성을 확인하였다.

2. 합성 항균제의 분해거동

Fig. 4는 *in vitro*에서 주사제 형태로 혈액 내 투여

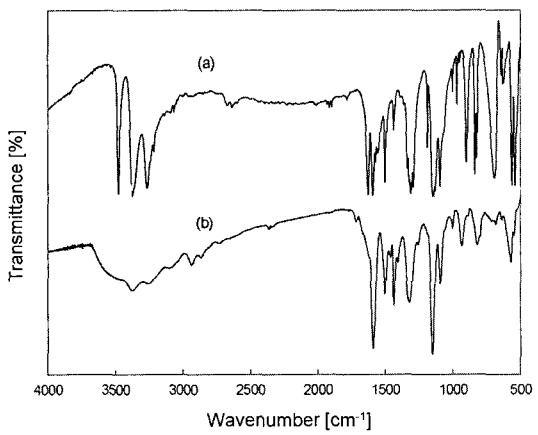

Fig. 2. IR spectra of (a) sulfanilamide and (b) crosslinked sulfa agent.

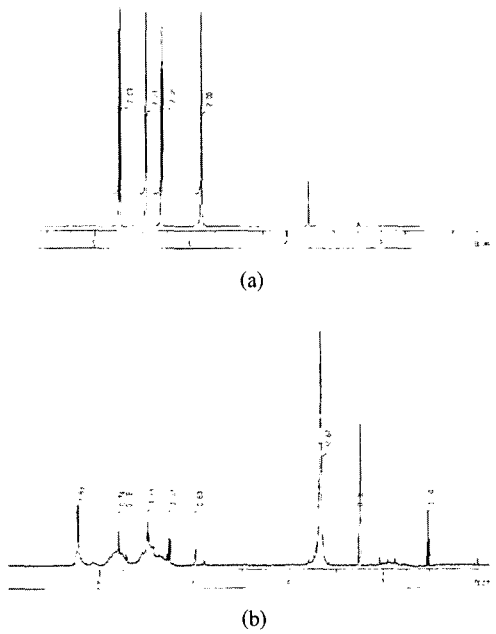

Fig. 3. NMR spectra of (a) sulfanilamide and (b) crosslinked sulfa agent.

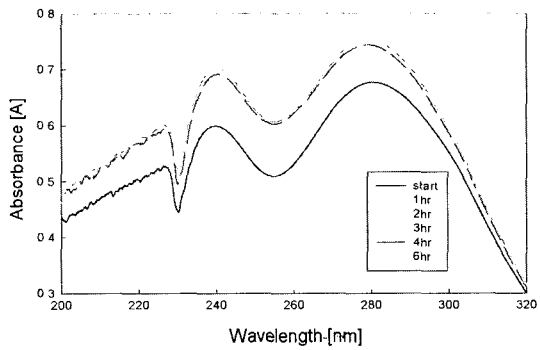

Fig. 4. UV spectra of synthetic antibacterial agent concentration of $2\times10^{-7}M$ with various time intervals at pH 7.4 (blood and small intestines).

시를 고려한 pH 7.4에서 합성약물의 약리활성에 이르는 분해거동을 확인한 것으로서 일반적으로 지용성 약물인 설파제는 가수분해가 일어나지 않으나[12,13] 가교제에 의해 결합된 합성약물은 가수분해에 약한 이민의 이중결합을 가지고 있어 6시간 만에 각각의 원물질인 sulfadiazine과 sulfanilamide로 분해되는 것을 sulfadiazine의 최대 흡수파장인 240 nm와 sulfanilamide의 최대 흡수 파장인 260 nm 부근에서 흡광도 값의

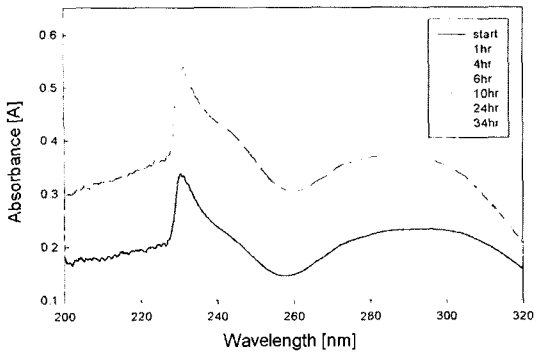

Fig. 5. UV spectra of synthetic antibacterial agent concentration of 2.0×10^{-7} M with various time intervals at pH 1.5 (the stomach).

증가로써 확인하였고 6시간 이후에는 각각의 설파제로 완전 분해되어 더 이상의 흡광도 증가를 보이지 않았다. 이는 GAD에 의한 설파제끼리의 결합을 통하여 일정시간 동안의 약물 분해 및 손실에 대한 지속성을 나타내어 준다고 생각된다.

Fig. 5는 *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 260 nm 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 위산이라는 가정의 산성용액에 더 안정적이기 때문이라 생각되며 경구 투여시 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 통과 시 위산에 의해 약물이 보호되어 대부분의 약물의 흡수가 일어나는 소장에 이르러 각각의 약리 활성 구조로 분해되는 지속성을 확인하였다. 이는 위산에 의한 약물의 소실로 인한 작용부위에 유효한 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 설파제 중 일부 sulfadiazine과 같이 반감기가 짧은 약물의 경우 반감기를 지연시켜 반복투여로 인한 불편감과 독성작용을 줄여 줄 수 있다고 생각된다.

IV. 결 론

기존의 약물투여 방법의 또 다른 방법으로 sulfa제의 가교제를 통한 화학적인 결합에 의하여 약물을 합성하여 *in vitro*에서 방출조절 시스템의 일종인 dual action에 대하여 연구하였다.

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

2. 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 불활성 되어지는 약물의 양을 최소화할 수 있으리라 기대된다.

참고문헌

1. Guy, R. H. and Hadgraft, J. : Drug parameters imporyant for transdermal delivery. **3**, 4-11, CRC Press, Florida, 1997.
2. Johnson, P. and Lioyd-Jones, J. G. : Drug delivery systems, 7-18, Ellis Horwood Ltd., England, 1994.
3. Langer, S. and Wise, D. L. : Medical applications of controlled release, **2**, 2-8, CRC Press, Florida, U.S.A, 1994.
4. Mainardi, J. L. and Shlaes, D. M. : *J. Infect. Dis.*, **171**, 1646-1654, 1995.
5. 橋本嘉辛 : 藥物送達法, 225-231, 廣川書店, 225-231, 2000.
6. Albrecht, H. A. : *J. Med. Chem.*, **54**, 669-672, 2001.
7. Albrecht, H. A. : *J. Med. Chem.*, **53**, 77-85, 2000.
8. Corraz, A. J. : *J. Med. Chem.*, **35**, 1828-1833, 1992.
9. Oyrton, A. C., Monteiro, Jr. and Claudio Airoldi : *Inter. J. Bio. Macro.*, **26**, 119-125, 1999.
10. Poznansky, M. J. : Methods of Drug Delivery, 82-85, Pergamon Press, Oxford, 1996.
11. Buurgers, N. A. : Medicinal Chemistry, Part II, 4th ed., 1-5, Wiley Interscience, New York, 1992.
12. Bohne, M. H. : *Chemotheraphy*, **14**, 195-211, 1969.
13. Shkadova, D. K. : *Farm. Zh.*, **24**, 39-46, 1969.