

Polyacryloyl- 및 Polymethacryloylcephradine의 합성과 항균작용에 관한 연구

金壇日 · 車月石 · 羅在雲* · 金永浩† · 高玉鉉‡

조선대학교 공과대학 화학공학과

† 세종대학교 자연대학 화학과

‡ 조선대학교 약학대학 약학과

(1991. 5. 20 접수)

Synthesis and Antimicrobial Activity of Polyacryloyl- and Polymethacryloylcephradine

Sun Il Kim, Wol Suk Cha, Jae Woon Na*, Young Ho Kim†, and Ok Hyun Ko‡

Department of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

† Department of Chemistry, King Sejong University, Seoul 133-150, Korea

‡ Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

(Received May 20, 1991)

요약. Polyacrylic acid와 polymethacrylic acid를 N-hydroxysuccinimide에 반응시켜 poly(N-acryloxy-succinimide)와 poly(N-methacryloxy-succinimide)를 합성하고, 이것과 cephadine을 반응시켜 polyacryloylcephradine과 polymethacryloylcephradine을 합성하였다. 이들 중합체의 항균성을 2단계 희석법에 의하여 최소 발육저지 농도로서 조사하였다. Polyacryloylcephradine 중합체에 대한 최소 발육저지 농도는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Escherichia coli* BE 1186 및 *Salmonella typhimurium* TV 119 균주들에 항균성이 대체적으로 우수하였다. Polymethacryloylcephradine 중합체에 대한 최소 발육저지 농도는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* BE 1186 및 *Salmonella typhimurium* TV 119 균주들에 대해서 항균력을 보여주었다.

ABSTRACT. The reaction of N-hydroxysuccinimide with polyacrylic acid and polymethacrylic acid gave poly(N-acryloxy-succinimide) and poly(N-methacryloxy-succinimide), whose reaction with cephadine provided polyacryloylcephradine and polymethacryloylcephradine. The antimicrobial activities of these polymeric drugs were investigated in terms of minimum inhibitory concentration by the common twofold dilution technique. Polyacryloylcephradine revealed excellent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Escherichia coli* BE 1186 and *Salmonella typhimurium* TV 119. Polymethacryloylcephradine revealed excellent *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* BE 1186 및 *Salmonella typhimurium* TV 119.

서 론

의약품의 연구개발, 특히 제제개발에 관한 최근의 연구활동은 필요한 양을 “필요한 때, 필요한 장소”에 의약품을 공급함으로써 경제적인 손실을 감소시키

고, 약효를 배가시키는 의약품의 투여방법이 최근 큰 관심의 대상이 되고 있다. 현재 사용하고 있는 의약품은 체내에서 용해, 흡수 전달 과정에서 허용 농도 이상 공급됨으로서 오는 부작용은 독성작용까

지 유발하게 되며 원하는 장소에 전달되지 못하고 신체 전 부위에 전달되기 때문에 과량의 의약품 투여가 불가피하며, 이로 인한 손실 및 부작용은 막대하다^{1~3}. 특히 항생제나 항암제는 암세포와 정상세포의 선택성이 적으므로 기존의 투여방법을 개선하지 않으면 정상세포의 파괴를 가져올 뿐이다.

보통 약이란 저분자 화합물로 되어 있으며 분자량은 500 이하인 것이 대부분이고 큰 것은 1,500 정도인 것도 있다. 고분자에 저분자인 의약을 결합하여 만든 고분자 의약은 약효와 지속성의 향상이나 안정화, 지연성, 의약의 서방성 등을 목표로 한다². 이와 같은 효과를 가져오기 위해서는 carrier인 고분자가 무독성이고 발암성이 없어야 하는 것은 물론이며, 염증이나 알레르기성이 없어야 하는 것이 첫째 조건이다. 저분자인 의약품의 경우에는 분자의 구조나 conformation이 변화할 때 약리활성이 증가하거나 반대로 감소하는 현상을 종종 볼 수 있다. 고분자 의약에서도 예외는 아니어서 이러한 현상이 일어난다^{4,5}. 간단한 비닐 중합체의 약효에 관한 연구의 예로 Hodnett⁶는 acrylic acid과 isobutyl vinyl ether의 혼성 중합체가 항종양성을 갖고 있음을 밝혔으며, Wang과 Sheetz⁷는 poly(methacryloyloxyphenoxarsine)을 합성하였는데, 곰팡이, 박테리아 등에 대한 살균력을 보여주었음은 물론이고 제초제로서도 유용한 중합체임이 밝혀졌다. Cornell과 Donaruma^{8,9}는 tropone이 박테리아, 곰팡이, 바이러스에 대해서 항균력을 갖고 있는 것을 확인하여 poly(2-methacryloyltropone)을 합성하여 박테리아에 대해서 항균력을 시험해 보았으나 단위체 약보다 항균력은 떨어짐을 알았다. Smith와 Marshall¹⁰은 β -락탐계 항생물질만을 사용하여 중합체를 합성하였는데, 이들은 박테리아에 대한 항균력 실험에서 모두 항균력을 보여주지 못하였다. 한편 Ascoli 등¹¹은 nitrofuran 중합체의 본보기인 5-nitro-2-furaldehyde polyacryloylhydrazine을 합성하여 전통의 nitrofuran 제제인 1-(5-nitro-2-furfurylidineamino)hydantoin의 항균력과 지속성을 비교하였는데 항균력은 거의 비슷하였고, 쥐의 비뇨기 실험결과에 의하면 지속성이 3배 이상이라는 보고가 있었는데, 이 실험이 중합체의 지속성을 보여주는 한 예이다.

본 연구에서는 방출조절성 약제의 개발을 위한

전단계로 polyacrylic acid와 polymethacrylic acid에 N-hydroxysuccinimide를 반응시켜 poly(N-acryloylsuccinimide)와 poly(N-methacryloylsuccinimide)를 합성하였다. 이 화합물을 cephadrine의 α 탄소 위치에 있는 아미노기와 반응시켜 중합체약을 각각 합성하였다. 또한 각 중합체약에 대해서는 그램 양성균 4종(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580), 그램 음성균 3종(*Escherichia coli* BE 1186, *Salmonella typhimurium* TV 119, *Alcaligenes faecalis*) 및 진균 1종(*Candida albicans* ATCC 10231)에 대하여 항균력을 검토하였다.

실험

시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 중 polyacrylic acid(M_w 20,000), polymethacrylic acid(M_w 15,000), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide 및 N-hydroxysuccinimide은 Polyscience Ins. 특급시약을 그대로 사용하였으며, cephadrine은 Sigma Chem. Co. 제품을 사용하였다. 그리고 triethylamine, dimethylformamide, ethylacetate 등의 유기용매는 Tokyo Kasei Chem. Co. 혹은 Aldrich Chem. Co. 제품을 일반 정제법¹²에 의해 재증류하여 사용하였다. 합성한 화합물을 확인하는데 사용한 기기는 FT-IR spectrophotometer(Bruker IFS 66), FT-NMR spectrometer(Bruker AC-F 300 MHz) 및 DSC(Metter TA-3000)를 사용하였다.

Poly(N-acryloylsuccinimide)와 poly(N-methacryloylsuccinimide)의 합성. Polyacrylic acid와 polymethacrylic acid를 N-hydroxysuccinimide로 에스테르화시키는 반응은 P. Ferruti 등¹³과 동일한 방법으로 합성하였다.

Poly(N-acryloylsuccinimide)와 cephadrine의 중합체약 합성. Dimethylformamide 20 ml에 triethylamine 1.40 ml(13.84 mmol)을 혼합한 후 cephadrine 4.06 g(11.62 mmol)을 가하여 실온에서 용해시켰다. Poly(N-acryloylsuccinimide) 1.96 g(11.59 mmol)을 dimethylformamide 10 ml에 녹여 위의

용액에 syringe를 사용하여 30분간 서서히 적하시켰다. 적하가 끝난 후 실온에서 4시간 교반하고 1일 동안 냉암소(-5°C)에 방치하였다. 이 반응액에 ethylacetate 20 ml 및 중류수 50 ml를 가하고 1시간 교반시킨 후 수층을 취하여 d-HCl로 pH 5.5가 되게 조절하여 결정을 석출시켜 여취하여 중류수로 충분히 씻어 실온에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 이 생성물을 acetone으로 재결정하여 60°C 에서 진공오븐과 P_2O_5 를 사용하여 2일 동안 감압 건조시켜 유백색 고체인 polyacryloylcephradin 4.15 g(수득률 68.94%)를 얻었으며, mp.는 105°(dec) 였다.

IR(KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3339, 1522(\text{N-H}), 3032$ (aromatic C-H), 2938(aliphatic C-H), 1775(β -lactam C=O), 1736(COOH), 1657(CONH), 1522(N-H bending), 1429(aromatic C=C); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm}) = 9.38(\text{d}, 1\text{H}, \text{CONH})$, 8.52 (m, 1H, α -CHNH⁺), 5.86(s, 1H, α -CHNH⁺), 5.61 ~5.68(m, 4H, 2' & 5'-CH₂), 5.07(d, 1H, 6-H), 4.62 (s, 1H, 6'-H), 4.40(s, 2H, 3'4'-CH), 3.41~3.53 (q_{AB} , $J=18\text{ Hz}$, 2H, 2-CH₂), 2.20(brs, 1H, -CH₂-CH-), 2.01(s, 3H, 3-CH₃), 1.34~1.15(brs, 2H, -CH₂-CH-).

Poly(N-methacryloxy succinimide)와 cephradine의 합성. Dimethylformamide 10 ml에 triethylamine 1.21 ml(11.96 mmol)를 혼합한 후 cephradine 3.49 g(9.99 mmol)을 가하여 실온에서 용해시켰다. Poly(N-methacryloxy succinimide) 1.83 g(10.01 mmol)을 dimethylformamide 5 ml에 녹여 위의 용액에 syringe를 사용하여 30분간 서서히 적하시켰다. 적하가 끝난 후 실온에서 6시간 교반하고 1일 동안 냉암소(-5°C)에 방치하였다. 이 반응에 ethylacetate 14 ml 및 중류수 40 ml를 가하고 90분간 교반시킨 후 수층을 취하여 d-HCl로 pH 5.5가 되게 조절하여 결정을 석출시켜 여취하여 중류수로 충분히 씻어 실온에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 이 생성물을 acetone으로 재결정하여 60°C 에서 진공오븐과 P_2O_5 를 사용하여 2일 동안 감압 건조시켜 유백색 고체인 polymethacryloylcephradine 4.18 g(수득률 78.57%)를 얻었으며, mp.는 120°(dec) 였다.

IR(KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3409, 1498(\text{N-H}), 3032$ (aromatic C-H), 2937(aliphatic C-H), 1775(β -lac-

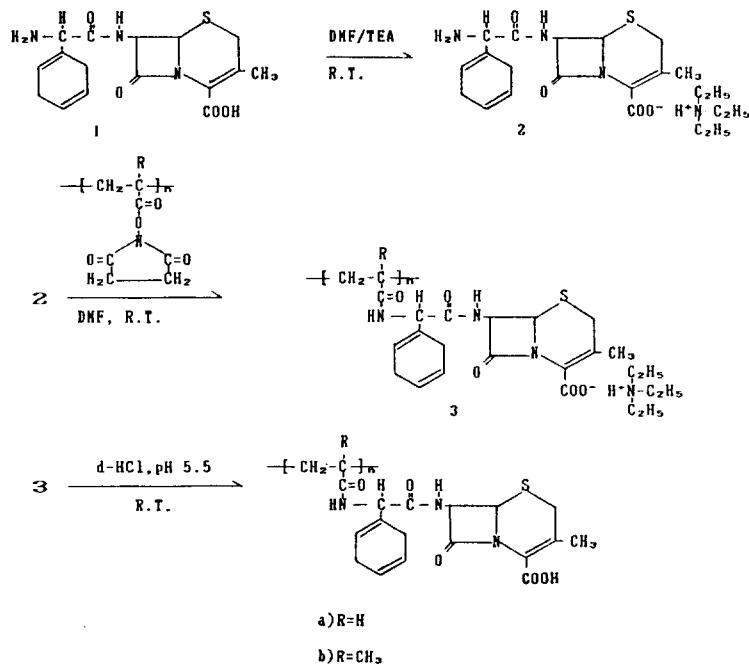
tam C=O), 1739(COOH), 1660(CONH), 1498(N-H bending), 1433(aromatic C=C); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm}) = 9.38(\text{d}, 1\text{H}, \text{CONH})$, 8.52 (m, 1H, α -CHNH⁺), 5.86(s, 1H, α -CHNH⁺), 5.61 ~5.68(m, 4H, 2' & 5'-CH₂), 5.07(d, 1H, 6-H), 4.62 (s, 1H, 6'-H), 4.40(s, 2H, 3'4'-CH), 3.41~3.53 (q_{AB} , $J=18\text{ Hz}$, 2H, 2-CH₂), 2.04(s, 3H, 3-CH₃), 1.24(brs, 2H, -CH₂-CH₂), 1.02~0.89(brs, 3H, -CH₂-CH₂-).

황균성 시험. 전보¹⁴와 동일한 방법으로 하였다.

결과 및 고찰

합성. 각 단계별 합성경로는 Scheme 1에 나타내었다. Polyacrylic acid와 polymetacrylic acid의 chlorination은 thionyl chloride를 사용하여 시도하였으나, polyacryloylchloride와 polymethacryloylchloride은 매우 수분에 민감하고 많은 단점을 가지고 있었다. Cephradine는 α 탄소 위치에 아미노기를, 그리고 3위치에 카르복실기를 갖고 있기 때문에 원하는 반응에 방해가 될 수 있는 작용기를 보호해야 하였다. 본 연구에서는 아미노기와 poly(N-acryloyxsuccinimide)과 poly(N-methacryloyxsuccinimide)을 반응시켜서 생성물을 얻는 것이 목적이었으므로, cephradine의 카르복실기를 triethylamine과 먼저 반응시켜 염을 만든 후 원하는 반응을 시도하여 68.94%와 78.57%의 수득률을 얻었고, 중합체약의 최종 생성물은 pH 5.5~6 사이에서 안정하기 때문에 이 범위를 벗어나지 않도록 반응시켰다.

Polyacryloylcephradine 중합체약에 대한 IR 스펙트라에서 β -락탐 고리의 카르보닐기는 β -락탐 구조의 독특한 특징인데, 이 카르보닐기의 흡수띠는 보통 ester나 amide보다 높은 영역인 1775 cm^{-1} 에서 신축 진동에 의한 흡수띠가 관찰되었고, 1736 cm^{-1} 과 1657 cm^{-1} 에서 각각 COOH와 CONH의 카르보닐기의 신축진동에 의한 흡수띠를 볼 수 있었다. 그리고 $1770\sim1730\text{ cm}^{-1}$ 부근에서 C=O 결가지를 가지는 카르보닐기의 신축 진동에 의한 특성 흡수띠를 확인할 수 있었다. Polymethacryloylcephradine 중합체약에 대한 IR 스펙트라에서 β -락탐 고리의 카르보닐기는 신축진동에 의한 흡수띠가 1775



Scheme 1

Table 1. MICs ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of synthetic compound and commercial antibiotics against representative microorganisms

Strains	Sample	Ceftizoxime	Cephradine	PAC ^a	PMAC ^b
<i>Escherichia coli</i> BE 1186(-)		0.16'	1.28	40	40
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119(-)		0.08<	20	20	40
<i>Alcaligenes faecalis</i> (-)		2.56	40	>80	>80
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(+) ^d		2.56	2.56	40	80
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P(+)		2.56	10	40	40
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633(+)		0.16	0.32	40	40
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(+)		40	0.64	80	>80
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		>80	>80	>80	>80

^aPolyacryloylcephradine, ^bPolymethacryloylcephradine, ^cGram negative, ^dGram positive, ^eMIC(minimum inhibitory concentration); $\mu\text{g}/\text{ml}$.

cm^{-1} 에서 확인되었고, 1739 cm^{-1} 과 1660 cm^{-1} 에서 각각 COOH와 CONH의 카르보닐기의 신축진동에 의한 흡수띠를 볼 수 있었다. 그리고 $1773\sim1730 \text{ cm}^{-1}$ 부근에서 $\text{C}=\text{O}$ 결가지를 가지는 카르보닐기의 신축진동에 의한 특성 흡수띠를 볼 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectra에서 β -락탐계 항생제들은 유황과 질소가 결합된 C-6(cephem) 위치의 수소는 C-7 (cephem) 위치의 수소들과 -NH-와 함께 구조의

독특한 특징을 나타내는데, 중합체약에 대한 C-6 위치의 수소는 5.06 ppm 에서 관찰되었고 C-7 위치의 수소들은 5.86 ppm 에서 관찰되었다. 그리고 cephadrine의 α 탄소 위치에 있는 $-\text{NH}_2$ 가 $-\text{NH}$ 로 8.57 ppm 부근에서 proton 1개의 특성 peak가 형성된 것으로 보아 중합체약이 합성되었음을 확인할 수 있었다. 상술한 결과들로 미루어 볼 때 polyacryloyl과 polymethacryloyl 유도체의 α 탄소 위치에 있는 아미노

기와 peptide 합성반응에 널리 응용이 기대된다.

항균성. 중합체약들의 항균력을 검토하기 위하여 그램 양성균 4종, 그램 음성균 3종 및 진균 1종에 대한 MIC를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 합성한 중합체약을 대조물질로 사용한 cephalosporin계 화합물인 cephradine과 ceftizoxime에 비교하여 항균력은 일반적으로 약하게 나타났다. Polyacryloylcephradine 중합체약에 대한 MIC는 그램 양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Straphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 및 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580에 대해서는 각각 40, 40, 40 및 80 µg/ml인 것으로 보아 항균력이 대체적으로 양호함을 알 수 있었다. 그램 음성균인 *Escherichia coli* BE 1186과 *Salmonella typhimurium* TV 119에 대해서는 각각 40 및 20 µg/ml로 나타났다. 이러한 결과는 cephalosporin계의 항생제가 그램 양성균에 비하여 그램 음성균에 대한 항균력이 떨어지는 양상과 일치하였다. Polymethacryloylcephradine 중합체약에 대한 MIC는 그램 양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 대해서는 80, 40 및 40 µg/ml로 나타났으나, 그외의 균에는 항균력을 보이지 못했다. 그램 음성균인 *Escherichia coli* BE 1186과 *Salmonella typhimurium* TV 119에 대해서는 각각 40 및 20 µg/ml로 항균력을 보여주었다. 한편 cephalosporin계의 항생제가 진균류에 대해서 항균력을 보이지 않는 것처럼, 합성한 중합체약들도 진균인 *Candida albicans* ATCC 10231에 대해서는

항균력을 나타내지 않았다.

인용 문헌

- R. S. Langer and D. L. Wise, "Medical Applications of Controlled Release", Vol. 2, pp. 2-12, CRC Press, Florida, U.S.A., 1984.
- J. G. Lloyd-Jones, "Drug Delivery Systems", pp. 7~9, Ellis, Great Britain, 1987.
- J. G. Lloyd-Jones, *ibid.*, pp. 11~28.
- 竹本喜一, 田伏岩夫, "醫藥高分子" pp. 5~8, 講談社 サイエンティフィク, Japan, 1978.
- R. G. Buckles, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 109 (1983).
- E. M. Hodnett, "Polymers as Antitumor Agents", Vol. 8, pp. 323~328, Polymer News, 1983.
- U. S. Patent 3,660,353, May 2, 1972.
- R. J. Cornell and L. G. Donaruma, *J. Med. Chem.*, **8**, 388 (1965).
- R. J. Cornell and L. G. Donaruma, *J. Polym. Sci.*, **3**, 827 (1965).
- H. Smith and A. C. Marshall, *Nature*, **232**, 45 (1971).
- F. Ascoli, G. Casinit, M. Ferappi, and E. Tubaro, *J. Med. Chem.*, **10**, 97 (1967).
- E. R. Blout and R. H. Karlson, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 941 (1956).
- P. Ferruti, A. Bettelli, and A. Fere, *Polymer*, **13**, 462 (1972).
- Y. S. Kim, O. H. Ko, and H. R. Kang, *Yakhak Hoeji*, **34**(2), 120 (1990).