



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

분석약학 석사학위논문

High-Valence Silver Propamide  
Nanoparticle의 합성에 기초한 항균  
약물 효능 평가

Synthesis, Characterization, and  
Antibacterial Activities of  
High-Valence  
Silver Propamide Nanoparticles

2018년 2월

서울대학교 대학원  
약학대학 분석약학전공  
이진란

## 국 문 초 록

당뇨병성 족부궤양은 당뇨환자의 주요 합병증이며, 95%의 당뇨환자와 연관이 있다. 이 합병증에 의해 입원한 환자의 상태는 치명적일 뿐만 아니라 생명에 위협을 받게 된다. 말초 혈관질환과 당뇨병성 신경병증이 당뇨병성 족부궤양의 주요 원인이다. 또한, 생체 내 비정상적인 대사, 미세혈관질환, 감염에 대한 위험성, 제한된 관절유동성을 일으키는 요인이 될 수 있다.

기존 논문에서 당뇨병성 족부궤양 환자의 주요 원인균을 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*와 *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* 와 같은 그람 음성균이 당뇨병성 족부궤양의 원인임이 보고된 바 있다. 이러한 당뇨병성 족부궤양의 치료에 일반적으로 쓰이는 항균제는 퀴놀론계 항균제인 ciprofloxacin과 세팔로스포린계 항생제인 cefotaxime, ceftriaxone이 있다. 기존의 당뇨병성 족부궤양과 관련된 항균제의 경우 내성과 관련된 문제가 증가하고 있고, 이를 대체하기 위한 치료법에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

그동안 은 나노와 이와 관련된 복합체가 상처치유효과와 항균 효과의 특성으로, 국소 치료제로 널리 이용되었다. 나노 입자의 경우 병원균과 상호작용 할 수 있는 표면적 대 체적비가 상대적으로 크기 때문에 항균효과가 뛰어난 장점이 있다. 기존의 논문들의 결과를 종합해보면, low valence 은 나노 입자에 비해 high valence 은 나노 입자가 더 높은 항균효과를 보임을 알 수 있다. 따라서, High valence 은 나노 입자는 기존의 내성을 극복할 수 있는 항균제 후보물질로 주목 받고 있다.

은 나노 입자의 산화 상태에 따라 그에 결합하는 리간드가 다르기 때문에 조건에 맞는 리간드를 고려하여 복합체 합성을 기획해야 한다. Aromatic diamine 유도체인 propamidine은 항원충활성과 상처 내의 균의 증식 억제 효과가 있다. Propamidine 은 urea-type의 acetimidamide를 포함한 두개의 방향족 고리를 가지고 있기 때문에 diamidine 유도체라 볼 수 있다. Propamidine내 Imine 그룹이 은 이온에 전자를 주어 배위결합을 하는데 이상적인 리간드로 작용한다. 이러한 점을 고려하여, high valence silver 복합체를 합성하는데 있어 리간드를 propamidine으로 결정하였다.

Reverse microemulsion 기법을 통해 Ag(II)PRO 나노 입자를 합성하였으며, 항균 효과는 zero valence 은 나노 입자와 비교하여 평가하였다. 새롭게 합성된 high-valence Ag(II)PRO 나노입자의 항균효과가 은 나노 입자에 비해 상대적으로 더 높다는 결과를 얻게 됨을 통해 당뇨병성 족부궤양에 있어 새로운 치료제가 될 수 있음을 제시하였다. Ag(II)PRO 착화합물의 특성은 NMR, FT-IR, XPS, mass spectroscopy를 통해 분석하였다.

## 주요어

propamidine, 당뇨병성 족부궤양, antibacterial test, high valence silver nanoparticles, 최소억제농도, 최소살균농도, 전자투과현미경, X선 광전자 분광법

학번: 2016-21840

## 목 차

국문초록 .....	2
목차 .....	4
List of Figures .....	5
List of Tables .....	6
I. 서론 .....	7
II. 실험 .....	9
2-1 Ag(II)PRO 복합체 합성 .....	9
2-2 X선 광전자 분광법을 통한 Ag(II)PRO 분석 .....	9
2-3 Ag(II)PRO 나노복합체 합성 .....	9
2-4 전자투과 현미경(Transmission Electron Microscope)을 통한 분석 .....	10
2-5 미생물 배양 조건 .....	10
2-6 최소 억제 농도와 최소 살균 농도의 결정 .....	10
III. 결과와 고찰 .....	12
3-1 은나노와 실버프로파딘 나노의 합성.....	12
3-2 실버프로파미딘 나노 입자와 은나노 입자의 미생물 실험 .....	17
IV. 결론 .....	19
V. 참고문헌 .....	20
Abstract .....	24

## List of figures

<b>Figure 1.</b> Synthetic scheme for the preparation of silver(II) propamide complex. ....	15
<b>Figure 2.</b> Schematic representation of the synthesis of silver(II) propamide nanoparticles by reverse microemulsion .....	15
<b>Figure 3.</b> XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) spectrum of the high-valence Ag(II)PRO complex. ....	16
<b>Figure 4.</b> UV - Vis absorption spectra and particle size distribution of Ag(II)PRO nanoparticle (a,b) and AgNPs (c,d). ....	16

## List of Tables

<b>Table 1.</b> MICs (minimal inhibitory concentrations) and MBCs (minimum bacterial concentrations) of synthesized high-valence Ag(II)PRO nanoparticles and AgNPs in broth dilution method.....	18
--	----

## I. 서론

당뇨병성 족부궤양은 당뇨병환자들에 있어 주요한 합병증에 해당하며, 사망률을 증가하게 하는 원인이다. 많은 환자들이 당뇨병성 족부궤양으로 인해 입원하게 되는 경우, 당뇨병성 족부궤양 감염(diabetic foot infection)으로 진행 될 수 있다. 미세혈관 질환과 당뇨병성 신경병증은 당뇨병성 족부궤양을 일으키는 주요 원인이다. 이러한 요인은 단독적으로 작용하거나 생체 내 비정상적인 대사, 미세혈관질환, 감염에 대한 위험성, 제한된 관절유동성과 동시에 작용하는 요인이 되기도 한다. 기존의 논문을 바탕으로 *Staphylococcus aureus*가 당뇨병성 족부궤양의 주요 원인 균으로 보고된 바 있다. 또한 *Pseudomonas.aeruginosa*와 *Acinetobacter*와 같은 그람 음성균이 당뇨병성 족부궤양의 주요 원인 균임이 최근에 보고 되었다.

은 나노 입자와 금속 복합체(metal complex)의 경우에 항균제로 널리 이용되어 왔으며, 높은 항균효과 활성을 바탕으로 한 상처 치유 효과로 오랜 시간 동안 이용되었다. 이러한 질산은 나노 입자와 복합체의 살균 효과 특성은 국소 치료제 (topical agents)로 이용되기에 주요한 장점이 될 수 있다. 다양한 상처 치료 국소 치료제인 클로로헥시딘 수용액(chlorhexidine aqueous) 그리고 은 설파디아진(silver sulfadiazine)의 경우에는 현재에도 상처 치유에 사용된다. 그람 음성균과 은 나노 입자가 항균효과 작용을 하기 위해서는 은 나노 입자의 크기와 모양이 항균효과를 결정 짓는 요인이 된다는 사실이 기존 논문을 통해 알려져있다. 나노 입자는 상대적으로 넓은 표면 대 부피 비율이 넓은 표면적을 갖고 있기 때문에 균과의 상호작용을 하는데 영향을 미친다. 은 나노 입자와 관련된 논문을 통해 백혈병을 포함한 암 치료 가능성이 있음이 보고된 바 있다. 많은 당뇨병환자의 경우 항균 치료에 있어, 내성문제로 인해 적절한 치료가 이루어 지지 않는 경향이 있다. 당뇨병성 족부궤양의 경우에는 퀴놀론계 항균제(quinolone계)인 시프로플록사신과 3세대 세팔로스포린 항생제인 세포타심(cefotaxime)과 세프트리악손(ceftriaxone)이 치료에 이용되는데, 최근 내성에 대한 문제가 증가하고 있다. 이러한 점에서 새로운 항균제에 대한 연구 필요성이 증가하고 있다.

은 나노 입자의 경우, low valence 은 나노 입자에 비해 high valence 은 나노 입자가 미생물 실험을 통해 상대적으로 더 높은 항균효과를 보인다는 것이 보고된 바 있다. 이러한 결과를 종합하여 고려 해볼 때, high valence 은 나노 입자 복합체가 이러한 당뇨병성 치료에 사용되는 항균제의 다제내성(multidrug resistance)을 극복할 수 있는 새로운 대안이 될 수 있다. 최근 논문을 통해 high valence silver salt bis(hydrogen periodato)argentite(III) 복합체를 합성하여 *S.aureus*, *P.aeruginosa*에 대한 항균효과와 상처 치유효과를 연구한 바 있다. 또한 은 입자의 경우에는 +1,



+2, +3 세 가지 산화 상태(oxidation state)가 존재하며, 이는 다른 리간드와 복합체를 이루기에 적절하다. 이 논문에서 나노 크기의 high valence 실버프로파미딘인 Ag(II)PRO 복합체를 합성하였다. 은 나노 입자와 새롭게 합성된 실버프로파미딘 모두 비슷한 크기로 합성하여 미생물 실험을 진행하였고, 이를 통해 항균효과를 비교하였다.

방향족성 다이아미딘(aromatic diamidine)의 한 종류인 프로파미딘은 항원충기능이 있으며, 항균기능을 통해 상처를 치유하는 특성이 있음이 보고된 바 있다. 프로파미딘의 항균 활성의 경우 처음으로 알려진 것은 1943년도 W.R.Thrower et al.에 의해 가시아메바각막염 (Acanthamoeba keratitis)을 포함한 다른 각막 감염 치료에 이용될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 은과 복합체를 이룬 폴리다이구아나이드(polydiguanide) 분자는 새로운 국소 항균치료제가 될 수 있으며 이 중에서도 상처 감염과 화상치료에 유용하게 사용된다. 폴리다이구아나이드는 단일결합과 이중결합이 컨쥬게이트 되어있는 시스템이고, p-type 비편재화 오비탈이 채워져 있다는 점은 high valence 은과 복합체를 이루기에 적절하다. 다이아미딘과 구아니딘 구조를 포함하는 화합물인 broline과 클로로헥시딘 의 경우에는 오랜 시간 동안 항균제와 항원충제로 사용되어왔다. 폴리헥사메틸렌 구아니딘 (polyhexamethylene)은 독성이 없는 소독제나 첨가제로 이용된다. 프로파미딘(4,4'-(propane-1,3-diylbis(oxy))dibenzimidamide)은 다이아미딘 유도체로 불리는데 그 이유는 두개의 방향족고리를 가지고 있고, urea-type의 아세트이미다민(acetimidamide)의 치환이 되어있기 때문이다. 프로파미딘 내의 이민(=NH) 그룹은 은 입자에 전자를 기여 한다는 점이 은과 복합체를 이루기에 이상적인 구조이다. 따라서 우리는 프로파미딘을 킬레이트 리간드로 결정하였고, NMR, FT-IR, XPS와 질량분석기를 통해 실버프로파미딘 특성을 분석하였다. 실버프로파미딘은 reverse microemulsion 방법을 통해 합성되었다. 또한 새롭게 합성된 실버프로파미딘은 은 나노 입자와 미생물실험을 통해 항균효과를 비교하는 방법으로 진행되었다. 당뇨병성 족부궤양과 관련이 있는 그람양성균과 그람 음성균을 대상으로 항균효과를 비교하였다. 나노 크기의 실버프로파미딘은 같은 크기의 은 나노입자와 비교했을 때, 최소억제농도인 (Minimum inhibitory concentration)와 최소살균농도(Minimum bactericidal concentraion) 모두 더 낮은 농도에서 결과를 나타냄을 통해 더 높은 항균효과를 가진다는 것을 알게 되었다. 따라서 실버프로파미딘 나노 입자는 뛰어난 항균효과와 상처치유의 특성을 바탕으로 당뇨병성 족부궤양의 국소적인 항균제로 사용되기에 적절한 제안이 될 수 있다.

## II. 실험방법

### 2-1 Ag(II)PRO 복합체 합성

실버프로파미딘 복합체의 합성은 메탄올:증류수(3:1) 혼합 용매에서 진행되었다. 2mmol의 프로파미딘을 먼저 혼합 용매에 녹이고, 1mmol 질산을 수용액을 가한다. 그 후 상온에서 20분 동안 반응을 진행한다. pH를 조정하기 위해 트리에틸아민을 가한다. 그 후 반응을 3시간동안 진행하면 고체 상을 얻을 수 있다. 이러한 고체 상을 필터에 거르고 헥세인:메탄올(1:1) 용액으로 세척하면 목표하였던 실버프로파미딘을 얻을 수 있다. 마지막으로 이 복합체를 건조시킨 후  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR, XPS (Sigma Probe, Thermo-VG, London, UK) 그리고 질량분석기를 통해 분석한다.

### 2-2 X선 광전자 분광법을 통한 Ag(II)PRO 분석

#### (X-ray Photoelectron Spectroscopy )

High valence 실버프로파미딘 복합체합성을 확인하기위해 a monochromatic Al Ka (15 kV, 100 W, 400 micrometer) X-ray source을 포함한, XPS spectrum (Sigma Probe, Thermo-VG, London, UK) 기기로 확인하였다. 광전자 분광법 결과는 20 eV 투과에너지와 점차적으로 0.1 eV간격으로 좁은 범위 간격으로 스캔하는 방법으로 결과를 얻었다.

### 2-3 Ag(II)PRO 나노복합체 합성

실버프로파미딘 나노입자는 water in oil 마이크로에멀전 방법으로 합성하였다. 그 과정은 다음과 같다. 디옥틸 설포씩시네이트(dioctyl sulfosuccinate) 0.1M을 유기 용매인 헵테인(heptane) 10ml에 넣어 균질한 상태가 되도록 한다. 연속적으로 90 $\mu\text{l}$  수용액 상태의 프로파미딘을 가한다. 프로파미딘의 용해도가 좋지 않기 때문에 이를 극복하기 위해 희석한 황산을 가한다. 그 다음 90 $\mu\text{l}$  질산은을 가한 다음 high valence상태로 만들어 주기 위해 산화제인 소듐퍼옥시다이설페이트( sodium peroxydisulfate) 90 $\mu\text{l}$ 를 가하여 준다. 합성 단계 모두 상온에서 진행되며 15분간 균질한 상태가 되도록 기다려준다. 그 다음 좀 더 안정한 상태에서 마이크로에멀전 상태가 되도록 pH를 중성인 7로 맞추어 주는데 이때 트리에틸아민을 이용한다. 합성 과정에서 질산은, 프로파미딘, 소듐퍼옥시다이설페이트 몰비는 1:2:2이다. 이후

한 시간이 지나면 마이크로에멀션 색이 갈색으로 변하게 되는 것을 볼 수 있는데 이것은 은이 산화한 상태로 존재한다는 것을 보여주는 지표가 될 수 있다. 색이 변한 이후, 다시 반응을 24시간 동안 진행한다. 24시간이 지난 후 원하는 나노 입자를 얻기 위해 에탄올을 이용해 10,000 rpm, 20분간 원심 분리한다. 원심 분리 후 디에틸에터(diethylether)를 이용하여 반응하지 않은 출발 물질을 제거해주는 과정을 진행한다. 그 결과 진공상태에서 건조 시키고 실버프로파미딘 나노 입자를 최종적으로 얻는다.

#### 2-4 전자투과 현미경(Transmission Electron Microscope)을 통한 분석

실버프로파미딘과 은 나노 입자의 크기와 형태를 관찰하기 위해 전자투과 현미경을 이용하였다. (JEM 3010 and JEM 1010, Jeol, Tokyo). 전자투과 현미경에 적용하기 위해 200-mesh copper grids에 시료를 준비하였다.

#### 2-5 미생물 배양 조건

당뇨병성 족부궤양과 대표적으로 연관성이 있는 그람 양성균 3가지인 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis*(ATCC 29212), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386)와 그람 음성균 3가지인 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 10031), *Acinetobacter calcoaceticus* (ATCC 2305)를 대상으로 실험하였다. 모든 균은 한국 미생물 보존센터에서 분양 받았으며, National Committee for Clinical Laboratory Standard 가이드라인을 준수하였다. 모든 균은 37 °C, Muller Hinton broth or agar (MH, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 조건에서 배양하여 실험을 진행하였다.

#### 2-6 최소 억제 농도와 최소 살균 농도의 결정

최소 억제 농도는 broth dilution 방법을 적용해 muller hinton broth 에서 실험하였다. Muller hinton broth는 최소억제 농도를 결정하는데 사용되는 배지이다. 미생물 실험은 96 well plate에서 실험이 진행하였다. 최소 억제 농도를 결정하기 위해 시료의 다양한 농도의 범위를 대상으로 실험하였다. 최소억제농도란 항균제 처리 후 16-20시간이 지났을 때 시각적으로 더 이상 자라지 않는 농도를 의미한다. 이 실험에서 우리는 multiplate reader에서 600nm의 흡광도를 측정하여 이를 확인하였다. 최소살균농도를 판단하기 위해 agar dilution method를 채택하였고, muller hinton agar에 항균제를 처리한 시료를 재접종 후 콜로니가 더 이상 자라지 않는 농도를

확인하는 방법으로 진행하였다.

### III. 결과와 고찰

#### 3-1 은나노와 실버프로파딘 나노의 합성

기존의 논문들의 결과를 통해 high valence 은 나노 복합체의 경우가 low valence 은 나노 복합체에 비해 더 나은 항균효과를 나타낸 것을 확인하였다. 폴리다이구나이드 계열의 물질인 클로로헥시딘은 두개의 이온화 가능한 구아니딘이 있기 때문에 high valence 은 나노 복합체를 만드는데 안정한 상태를 이룰 수 있다. 이 과정에서 질산은과 클로로헥시딘의 몰비(molar ratio)은 1:1 이었다. 이것은 리간드인 클로로헥시딘의 네개의 니트로젠 공여원자가 두개의 구아니딘을 이루기 때문에 이러한 비율로 합성됨을 설명할 수 있다.

프로파미딘은 다이아미딘 계열 물질로 구아니딘 물질과 구조적으로 유사한 점이 있다. 프로파미딘과 은은 2:1 몰비로 합성되었는데 이는 은에 전자를 줄 수 있는 리간드인 imine group이 한 분자 당 2개씩 가지고 있기 때문에 이러한 몰비를 설명할 수 있다.

Figure 1은 high valence 실버프로파미딘이 합성되는 기본 개요를 설명한 것이다. 실버프로파미딘은 서로 다른 용매를 혼합한 혼합용매 조건에 용해된 상태를 실험에 이용하였다. 다이메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide), 증류수, 메탄올을 반응 조건에 적절한 상태로 혼합해준다. 결론적으로 다양한 시도를 통해 메탄올:증류수의 비율 3:1 조건을 얻게 되었고, 이를 적용하여 실험하였다.

실버프로파미딘의 합성을 NMR, FT-IR, XPS 스펙트럼, 질량 분석기를 통해 확인하였다. Figure 2는 마이크로에멀전 방법을 통한 전반적인 실버프로파미딘 나노입자의 합성의 개요를 나타내었다.

마이크로에멀전은 균질하고, 열역학적으로 안정한 액체상과 계면활성제의 혼합 상태를 의미한다. 계면활성제는 친수성 잔기와 친유성 잔기가 동시에 있는 특성을 나타낸다. 실버프로파미딘의 합성에 있어 3가지의 주요한 반응 과정이 있다. 첫 번째로, 프로파미딘의 친수성을 높이기 위한 노력이 필요하다. 헵테인-증류수 조건에서 제대로 용해하지 않았기 때문에 이를 극복하기 위해 희석한 황산을 가하였다. 두 번째로는 은을 산화제를 통해 high valence 상태로 되는 단계이다. 마지막으로 트리에틸아민을 통해 중성상태의 균질한 마이크로에멀전 조건으로 만들어주는 단계이다. 이러한 과정이 있기 때문에 24시간동안 열역학적으로 안정한 상태가 유지될 수 있었으며, 균질한 크기의 나노 입자를 만드는데 기여하였다.  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR,

그리고 Q-TOF 질량분석기 결과를 통해 실버프로파미딘의 합성을 확인하였다. 좀 더 자세히 설명하자면 -NH 결합이 IR결과에서 사라짐을 확인 할 수 있었고 NMR 결과를 통해서 imine protons이 사라지는 것을 확인함을 통해 프로파미딘이 은과 결합 한 것을 확실하게 알 수 있는 결과를 보였다.

XPS는 X선 광전자 분광법이라고도 하는데, surface analysis 방법이며 새롭게 합성 된 물질의 분자의 valence state를 확인하는데 사용되는 기기이다. X선이 물질에 입사하여 흡수되면 그 에너지에 의해서 정해진 내각전자로부터 가전자까지 여기되어 원자는 이온화한다. 광전자의 에너지에 의해 원소분석이 가능함과 동시에 내각 전자 준위는 원자의 화학결합 상태에 의해서 변화하고, 광전자 방출에 수반하여 전자 및 원자의 재배열에 의한 광전자 에너지의 변화도 있기 때문에, 이를 통해 광전자 스펙트럼에 화학 시프트가 발생한다. 이를 바탕으로 화학결합 상태의 분석이 가능하다. Figure 3은 합성된 실버프로파미딘의 XPS결과이다. Ag 3d3/2 와 Ag 3d5/2 피크가 각각 373.40 eV 와 367.90 eV에서 관찰되었다. 이 결과는 기존 논문을 통해 알려진 Ag<sup>2+</sup> 와 피크 값이 일치한 것을 알 수 있다. 이를 통해 high valence 상태로 실버프로파미딘이 합성 된 것을 확인 할 수 있다.

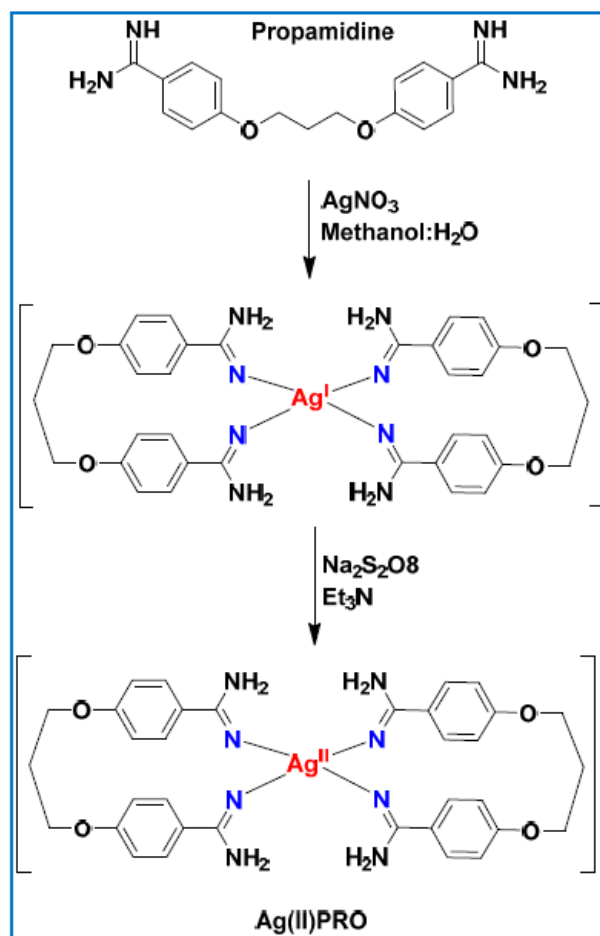
이 실험에서 water/surfactant 물 비율(R)을 최적화하는 과정을 통해 20nm에 해당하는 실버프로파미딘 나노 입자를 합성하였다. 마이크로에멀전은 3가지 상이 함께 존재한다. 이 3가지에 해당하는 것으로는 water/AOT/heptane이다. 이 때, R값이 10인 조건에서 water/AOT/heptane의 질량 비율은 2.4/6.0/91.6이다.

Figure 4에서 a는 프로파미딘과 실버프로파미딘의 자외선/가시광선 분광광도계를 통해 얻은 결과이며, b는 실버프로파미딘의 나노입자 크기 분포를 나타낸 것이며, c는 은 나노 입자의 자외선/가시광선 분광광도계를 통해 얻은 스펙트럼 결과이다. 마지막으로 d는 은 나노 입자의 나노입자 크기 분포를 나타낸 결과이다.

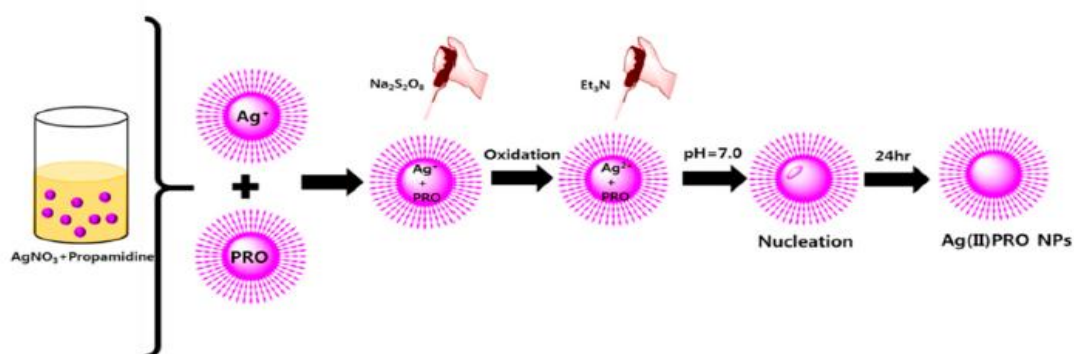
a의 결과는 새롭게 합성된 실버프로파미딘은 270nm 피크를 나타낸 것을 확인 할 수 있었으며, 기존에 프로파미딘의 결과에는 없었던 300nm이상에서의 absorbance를 나타내는 경향을 확인 할 수 있다. 이를 통해 실버프로파미딘의 나노입자와 출발물질인 프로파미딘의 패턴이 다름을 확인하였다. 새롭게 합성된 실버프로파미딘 나노 입자와 1달 동안 상온에 보관되었던 실버프로파미딘 나노입자의 자외선/가시광선 분광광도계 결과는 차이가 거의 없는 것을 바탕으로 1달 동안의 안정성을 확인하였다.

실버프로파미딘 나노입자와 은 나노 입자의 항균효과를 비교 하기 위해 20nm의 크기 범위로 은 나노 입자를 합성하였다. 이때 합성된 은 나노 입자는 co-reduction방법으로 합성하였다. co-reduction 방법에는 두 가지의 환원제가

필요한데, 한 가지는 sodium borohydrate이며 두 번째는 trisodium citrate이다. 이 두 가지 환원제에 의해 나노입자가 안정성을 갖게 된다. 환원과정은 두 가지 다른 온도조건에서 진행하였다. 한가지의 방법은 sodium borohydrate, trisodium citrate를 플라스크에서 60 °C 에서 30분 동안 균일하게 만들어준 다음 수용액 상태의 질산은을 drop 하는 방식으로 균질한 용액에 가한다. 그 후 온도는 90 °C가 된다. pH를 10.5로 맞춰 주기 위해 sodium hydroxide를 이용해 적정한다. 용액의 색이 노란색이 되는 시점까지 반응을 진행한다. 색이 노란색이 되었다는 것은 은 나노 입자가 형성되었음을 보여주는 근거가 된다. Figure 4c를 보면 은 나노 입자의 스펙트럼 결과를 보면, 398nm에서 피크를 나타내는 것을 확인 할 수 있다. 또한 figure 4d를 통해 합성된 은 나노 입자는 평균적으로 20nm정도로 합성 된 것을 확인 할 수 있다. 이 실험에서 합성된 실버프로파미딘과의 항균효과를 비교하기 위해 20nm대의 은 나노 입자와 비교실험을 통해 미생물실험을 진행하였다.

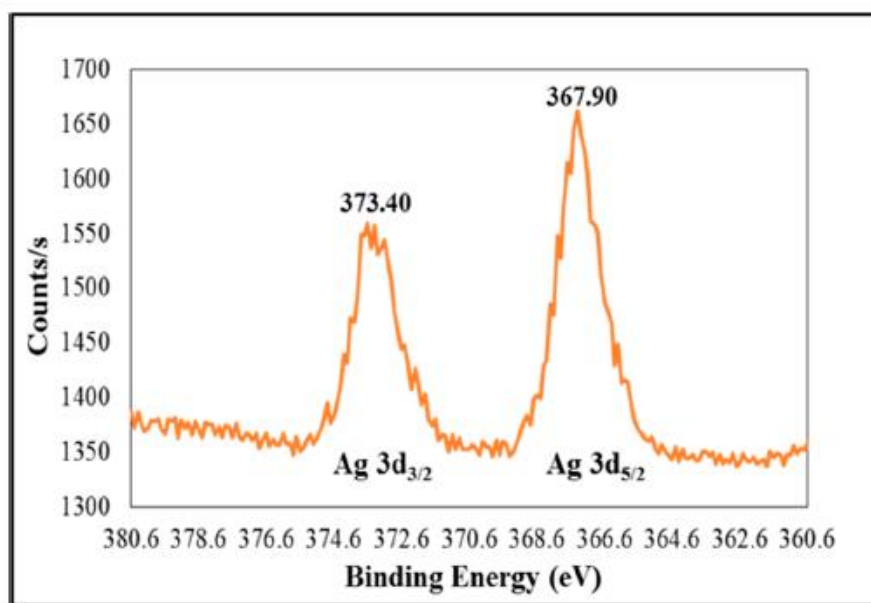


**Figure 1.** Synthetic scheme for the preparation of silver(II) propamidine complex.

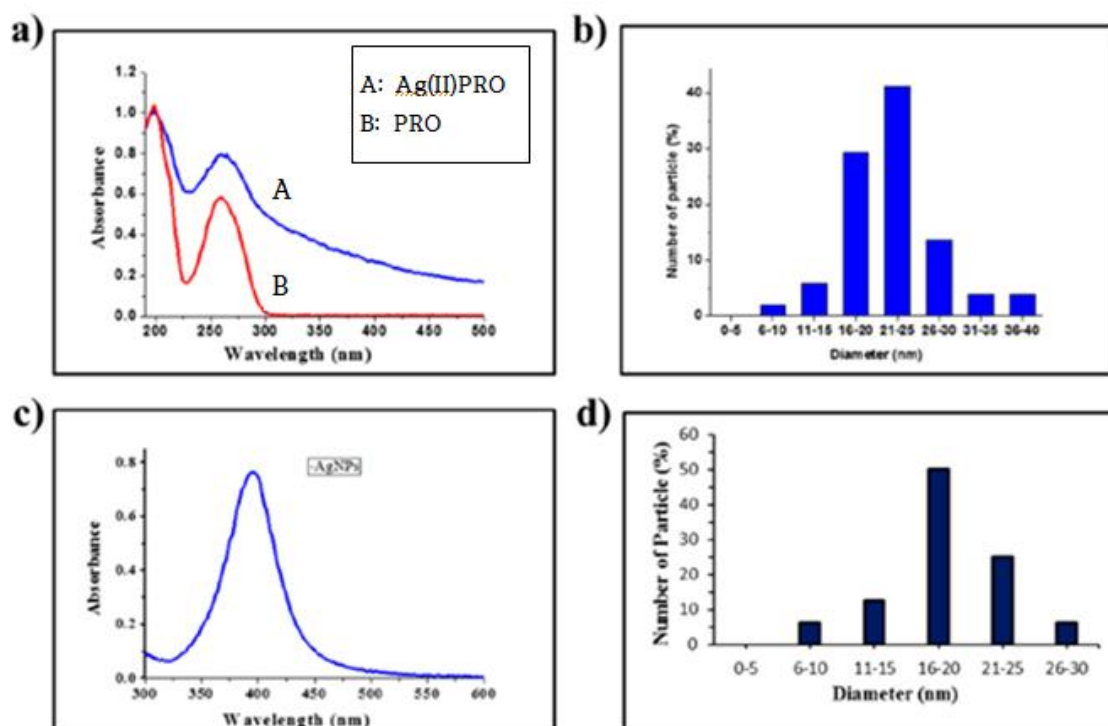


**Figure 2.** Schematic representation of the synthesis of silver(II) propamidine nanoparticles by reverse microemulsion technique.





**Figure 3.** XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) spectrum of the high-valence Ag(II)PRO complex.



**Figure 4.** UV - Vis absorption spectra and particle size distribution of Ag(II)PRO nanoparticle (a,b) and AgNPs (c,d).

### 3-2 실버프로파미딘 나노 입자와 은나노 입자의 미생물 실험

은 나노 입자의 항균 활성은 은 이온의 valence 상태와 관계가 있다. 이 실험에서 전자 투과 현미경을 이용해 실버프로파미딘 나노입자와 은 나노 입자의 크기를 확인하고 같은 범위의 크기인 입자를 대상으로 당뇨병성 족부궤양과 관련된 그람 양성균과 그람 음성균에 적용하여 실험하였다.

항균 활성은 나노입자의 크기와 모양에 영향을 받는다. 기존의 연구를 통해 나노입자의 경우 더 작은 크기 일수록 미생물 세포벽에 작용하기 쉽고, 미생물 생체 대사를 방해하는데 영향이 있다는 것이 보고 된 바 있다. 실버프로파미딘 나노입자의 정균작용(bacteriostatic activity)을 확인하기 위해 최소 억제 농도를 측정하는 실험을 하였다. 최소억제농도를 결정하기 위해 broth dilution 방법을 채택하였고, 최소살균농도를 결정하기 위해 agar dilution 방법을 채택하였다. Table1에 실버프로파미딘 나노 입자와 은 나노 입자의 미생물 종류별 최소 억제 농도와 최소 살균 농도를 정리하였다. 실버프로파미딘 나노 입자는 6.25 $\mu$ M 의 최소 억제농도를 나타내었으며, 최소살균농도의 경우에는 *P.aeruginosa*를 제외하고 6.25 $\mu$ M 결과를 보였다. 실버프로파미딘는 은 나노 입자에 비해 상대적으로 낮은 농도에서 항균 효과를 보임을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 우수한 항균효과를 가지고 있다는 것을 확인 할 수 있다. 이 실험의 그람 양성균은 *S.aureus*, *S.galactiae*, *E.faecalis*가 해당하고 *K.pneumonia*, *A.calcoaceticus*, *P.aeruginosa* 는 그람 음성균에 해당한다. 그람 양성균과 그람 음성균 간의 최소억제농도는 차이가 없는 것을 관찰하였다. 전반적인 결과를 분석한 것을 바탕으로 은 나노 입자에 비해 6배 정도 항균효과가 뛰어남을 확인하였다.

**Table 1.** MICs (minimal inhibitory concentrations) and MBCs (minimum bacterial concentrations) of synthesized high-valence Ag(II)PRO nanoparticles and AgNPs in broth dilution method.

Bacterial Strains	AgNPs		Ag(II)PRO NPs	
	MIC ( $\mu\text{M}$ )	MBC ( $\mu\text{M}$ )	MIC ( $\mu\text{M}$ )	MBC ( $\mu\text{M}$ )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	60	6.25	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	80	6.25	6.25
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	40	80	6.25	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	60	6.25	6.25
<i>Klebsiella pneumonia</i>	20	60	6.25	6.25
<i>Streptococcus agalactiae</i>	40	60	6.25	6.25

## IV. 결론

High valence 실버프로파미딘 나노 입자와 상대적인 비교를 하기 위해 합성된 은 나노 입자는 비슷한 크기로 합성 되었다는 것을 분광학적인 방법을 통해 확인하였다. 족부궤양의 원인이 되는 대표 그람 양성균 3가지와 그람 음성균 3가지를 대상으로 미생물 실험한 결과를 통해, 더 낮은 최소억제농도를 보인 high valence 실버프로파미딘이 은 나노 입자에 비해 상대적으로 우수한 항균활성이 있음을 알아 내었다. 실버프로파미딘 나노 입자의 자체의 열역학적 안정성, 뛰어난 항균효과특성을 바탕으로 당뇨병성 족부궤양의 국소 치료제로 기존 항균제의 내성을 극복할 수 있는 새로운 대안이 될 수 있음을 확인하였다.

## V. 참고문헌

1. Gariani, K.; Ugkay, I.; Lipsky, B.A. Managing diabetic foot infections: A review of the new guidelines. *ActaChir. Belg.* 2014, 114, 7 - 16.
2. Sinwar, P.D. The diabetic foot management—Recent advance. *Int. J. Surg.* 2015, 15, 27 - 30.
3. Lipsky, B.A.; Berendt, A.R.; Cornia, P.B.; Pile, J.C.; Peters, E.J.; Armstrong, D.G.; Deery, H.G.; Embil, J.M.; Joseph, W.S.; Karchmer, A.W.; et al. Infectious diseases society of america clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin. Infect. Dis.* 2012, 54, 132 - 173.
4. Lipsky, B.A. Treating diabetic foot osteomyelitis primarily with surgery or antibiotics: Have we answered the question? *Diabetes Care* 2014, 37, 593 - 595.
5. Citron, D.M.; Goldstein, E.J.; Merriam, C.V.; Lipsky, B.A.; Abramson, M.A. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2819 - 2828.
6. Rastogi, A.; Sukumar, S.; Hajela, A.; Mukherjee, S.; Dutta, P.; Bhadada, S.K.; Bhansali, A. The microbiology of diabetic foot infections in patients recently treated with antibiotic therapy: A prospective study from India. *J. Diabetes Its Complicat.* 2017, 31, 407 - 412.
7. Shankar, E.M.; Mohan, V.; Premalatha, G.; Srinivasan, R.S.; Usha, A.R. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *Eur. J. Intern. Med.* 2005, 16, 567 - 570.
8. Viswanathan, V.; Jasmine, J.J.; Snehalatha, C.; Ramachandran, A. Prevalence of pathogens in diabetic foot infection in South Indian type 2 diabetic patients. *J. Assoc. Physicians India* 2002, 50, 1013 - 1016.
9. Atiyeh, B.S.; Costagliola, M.; Hayek, S.N.; Dibo, S.A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns* 2007, 33, 139 - 148.
10. Marx, D.E.; Barillo, D.J. Silver in medicine: The basic science. *Burns* 2014,

40, 9 - 18.

11. Xiu, Z.M.; Zhang, Q.B.; Puppala, H.L.; Colvin, V.L.; Alvarez, P.J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.* 2012, 8, 4271 - 4275.

12. Franci, G.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Palomba, L.; Rai, M.; Morelli, G.; Galdiero, M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* 2015, 20, 8856 - 8874.

13. Pham, X.H.; Shim, S.; Kim, T.H.; Hahm, E.; Kim, H.M.; Rho, W.Y.; Jeong, D.H.; Lee, Y.S.; Jun, B.H. Glucose detection using 4-mercaptophenyl boronic acid-incorporated silver nanoparticles-embedded silica-coated graphene oxide as a SERS substrate. *BioChip J.* 2017, 11, 46 - 56.

14. Zhu, L.; Guo, D.; Sun, L.; Huang, Z.; Zhang, X.; Ma, W.; Wu, J.; Xiao, L.; Zhao, Y.; Gu, N. Activation of autophagy by elevated reactive oxygen species rather than released silver ions promotes cytotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in hematopoietic cells. *Nanoscale* 2017, 9, 5489 - 5498.

15. Shahi, S.K.; Kumar, A. Isolation and genetic analysis of multidrug resistant bacteria from diabetic foot ulcers. *Front. Microbiol.* 2015, 6, doi:10.3389/fmicb.2015.01464.

16. Rai, M.K.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gade, A.K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 112, 841 - 852.

17. Kim, K.S.; Lee, J.Y.; Kwon, S.Y.; Yang, H.J.; Choi, E.K.; Shin, M.H.; Ahn, K.S.; Um, J.Y.; Lee, J.H.; Jang, H.J.

Comparative transcriptomic analysis of the multi-targeted effects of the herbal extracts against *Escherichia coli* O157:H7. *BioChip J.* 2012, 6, 379 - 390.

18. Yang, K.; Liu, J.; Shi, H.G.; Zhang, W.; Qu, W.; Wang, G.X.; Wang, P.L.; Ji, J.H. Electron transfer driven highly valent silver for chronic wound treatment. *J. Mater. Chem. B* 2016, 4, 5729 - 5736.

19. Dellasega, D.; Facibeni, A.; Di Fonzo, F.; Bogana, M.; Polissi, A.; Conti, C.; Ducati, C.; Casari, C.S.; Bassi,

- A.L.; Bottani, C.E. Nanostructured Ag<sub>4</sub>O<sub>4</sub> films with enhanced antibacterial activity. *Nanotechnology* 2008, 19, doi:10.1088/0957-4484/19/47/475602.
20. Zhao, J.; Zhang, W.; Wang, G. Inorganic Antibacterial Agents Containing High Valent Silver and Preparation Method Thereof. US Patent Application US 10/578,532, 27 October 2004.
21. Pal, S.; Yoon, E.J.; Tak, Y.K.; Choi, E.C.; Song, J.M. Synthesis of highly antibacterial nanocrystalline trivalent silver polydiguanide. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16147 - 16155.
22. Rangasamy, S.; Tak, Y.K.; Kim, S.; Paul, A.; Song, J.M. Bifunctional therapeutic high-valence silverpyridoxine nanoparticles with proliferative and antibacterial wound-healing activities. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2016, 12, 182 - 196.
23. Thrower, W.R.; Valentine, F.C. Propamidine in chronic wound sepsis: An experimental and clinical study. *Lancet* 1943, 241, 133 - 136.
24. Wien, R.; Harrison, J.; Freeman, W.A. Diamidines as antibacterial compounds. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1948, 3, 211 - 218.
25. Bell, C.A.; Hall, J.E.; Kyle, D.E.; Grogl, M.; Ohemeng, K.A.; Allen, M.A.; Tidwell, R.R. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against plasmodium falciparum and leishmania mexicana amazonensis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34, 1381 - 1386.
26. Donkor, I.O.; Clark, A.M. In vitro antimicrobial activity of aromatic diamidines and diimidazolines related to pentamidine. *Eur. J. Med. Chem.* 1999, 34, 639 - 643.
27. Werbovetz, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2006, 2, 147 - 157.
28. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5 - 100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 2014, 4, 3974 - 3983.
29. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the

gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 1712 - 1720.



## Abstract

### Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of High-Valence Silver Propamidine Nanoparticles

Jinran Lee

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis

The Graduate School

Seoul National University

Diabetic foot ulcer (DFU) is becoming more serious concern as it affects 95% of diabetic patients worldwide. It has been shown that the *Staphylococcus aureus* and other Gram-negative microorganisms are the main reasons behind this disease. Though many antibiotics are presently used to treat the DFU, due to increased bacterial resistance, new alternative therapies are always welcome. To address this alarming issue, we have designed and synthesized the high-valence silver propamidine (Ag(II)PRO) complex as well as nanoparticles and characterized both by usual spectroscopic methods. The reverse microemulsion technique has been applied to synthesize Ag(II)PRO nanoparticles and its antibacterial activity has been compared with zero-valence silver nanoparticles (AgNPs) with similar size. The antibacterial efficacies of Ag(II)PRO nanoparticles and AgNPs were tested against Gram-negative and Gram-positive organisms responsible for DFU. The newly synthesized high-valence Ag(II)PRO nanoparticles showed higher antibacterial activity compared to silver-only nanoparticles (AgNPs). This study concludes that the high-valence Ag(II)PRO nanoparticles show better antibacterial activity than AgNPs and they may serve as the next generation therapeutic agent for the diabetic wound care.

**Keyword**

propamidine, diabetic foot ulcer, antibacterial test, high valence silver nanoparticles, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentraion), Transmission Electron Microscope, XPS

**Student Number:** 2016-21840