

## 산소 존재하에서 UVB 에 의한 페플록사신의 광화학적 반응의 특성

최윤수<sup>#</sup> · 이경선<sup>\*</sup>

대구효성가톨릭대학교 약학대학, \*영남대학교 약학대학

(Received October 21, 1999)

## Characteristics of Photochemical Reaction of Pefloxacin Irradiated by UVB in an Aerobic Condition

Yoon-Soo Choi<sup>#</sup> and Kyung-Seon Lee<sup>\*</sup>

College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyongsan, 712-702

\*College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749

**Abstract** — The photodegradation of pefloxacin, photolabile fluoroquinolone antibacterial agent, was studied. In the presence of N<sub>2</sub>, photodegradation of pefloxacin was suppressed. The singlet oxygen and free radical generated in the reaction media proceeded photochemical reaction. The photodegradation of pefloxacin was sensitized by benzophenone, a triplet state sensitizer.

**Keywords** □ UVB, pefloxacin, photodegradation

Pefloxacin은 fluoroquinolone계 광범위 항균제<sup>1)</sup>로서 약물을 투여한 환자가 빛에 노출되었을 때 광민감성 반응을 일으키며<sup>2,6)</sup> *in vivo* 및 *in vitro*에서 광감수성이 있어 photohemolysis<sup>1,7-10)</sup> 및 photoallergy와 같은 광독성을 유발한다.<sup>5)</sup> Nalidixic acid와 다른 많은 quinolone계 약물들이 빛에 대해 불안정하여 광분해되거나<sup>11-13)</sup> photosensitizer<sup>14)</sup>로 작용하여 다른 물질의 광반응을 유도하기도 한다. 또한 빛에 의해 광분해되고 생성된 광분해산물이 광독성을 일으키거나<sup>15)</sup> 광반응이 진행되는 동안에 생성된 활성 산소종<sup>16)</sup>에 의해 광독성이 일어나기도 한다. UVA(320~400 nm)에 불안정한 pefloxacin이 산소가 존재하는 조건에서 보다 강한 에너지를 가진 UVB(290~320 nm)영역의 빛을 조사할 경우에 나타나는 광화학 반응의 특성을 밝히고자 하였다.

### 실험방법

#### 시약 및 기기

Pefloxacin methane sulfonate는 국제약품에서 기증하였고, sodium azide, deuterium oxide(isotopic purity 99.8%), benzophenone, 1,3-diphenylisobenzofuran(DPBF)은 Sigma제를, tetrabutyl ammonium hydrogensulfate 등은 Aldrich제를 사용하였으며, L-cysteine, cystine 등은 Wako 및 Junsei제 특급품을 사용하였다. 그 외 ethanol, methanol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 등은 특급품을, HPLC 이동상으로 사용된 methanol은 HPLC용 용매를 사용하였고 초순수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 UV spectrophotometer(Shimadzu UV-160A), FT-IR spectrophotometer(Mattson Polaris FT-IR), HPLC system(Tosoh SC-8010 system with UV detector(UV-8010))이다. 실험 전반에 Rayonet RMR-600 model의 photoreactor를 사용하였으며 merry-ground와 8

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 053-850-3616 (팩스) 053-850-3602

개의 RMR-3000Å 광원이 설치되어 있다. 반응용기는 15×110 mm의 quartz tube를 사용하였으며 반응시 merry-go-round의 rotation speed는 5rpm이었다.

#### Pefloxacin의 여기상태의 multiplicity

Pefloxacin methane sulfonate 용액( $5.0 \times 10^{-4}$  M in ethanol)을 광분해를 방지하기 위해 갈색병에 넣어 암소에 보관하고 있는 stock solution 1 ml와 삼중항 증감제인 2% benzophenone(in ethanol)용액 1.25 ml를 혼합한 후 ethanol을 가해 25 ml로 한 시험액과 benzophenone을 가하지 않은 동일 농도의 pefloxacin 시험액을 Rayonet photoreactor에 넣어 일정한 시간 동안 광을 조사시켜 광반응을 진행시킨 광분해액의 UV spectrum을 측정하여 두 시료의 spectrum을 비교하였다.

#### 산소 존재하에서 pefloxacin의 광분해도 측정

$2.0 \times 10^{-5}$  M의 pefloxacin 수용액에 질소 gas를 5분간 bubbling하여 용액 중의 산소를 제거시킨 시험액과, 산소를 제거시키지 않은 시험액을 photoreactor에 넣어 10분 간격으로 UVB를 조사한 후 275 nm에서 흡광도를 측정하여 광을 조사하지 않은 pefloxacin수용액의 흡광도를 100%로 하고 UVB에 노출시킨 후 측정된 흡광도를 광분해되지 않은 pefloxacin의 양으로 하고 %로 나타내어 pefloxacin 광분해에 대한 산소의 영향을 검토하였다.

#### Pefloxacin에 의한 singlet oxygen의 생성

1,3-Diphenylisobenzofurane의 photobleaching - Phosphate buffer(0.067 M, pH 7.4)에 녹인  $5.0 \times 10^{-4}$  M pefloxacin용액 2ml 및 methanol에 녹인  $1.5 \times 10^{-4}$  M의 1,3-diphenylisobenzofurane(DPBF)용액 5 ml를 혼합한 용액에 phosphate buffer 13 ml와 methanol을 가하여 전량이 50 ml가 되도록 하였다. 물 대신 D2O가 15v/v% 되도록 조제한 시험액과 singlet oxygen quencher인 sodium azide<sup>17)</sup>  $1.0 \times 10^{-3}$  M을 함유하는 시료를 각각 5 ml씩 취하여 photoreactor에서 2분간격으로 UVB를 조사시킨 후 411nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료조건에서 DPBF의 photobleaching<sup>18)</sup> 현상을 측정하였다.

D<sub>2</sub>O 첨가 효과 -  $5.0 \times 10^{-4}$  M의 pefloxacin 수용액의 stock solution을  $5.0 \times 10^{-5}$  M로 만들 때 단일항

산소의 수명을 연장시키는 D<sub>2</sub>O가 0, 25, 50, 75, 95 v/v% 함유되도록 만든 시료를 photoreactor에 넣어 30분간 광을 조사시킨 후 275 nm에서 흡광도를 측정하여 광분해 정도를 비교하였다.

#### Cysteine의 광산화

Pefloxacin( $5.0 \times 10^{-4}$  M) methanol용액과 L-cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O 354.3 mg을 물 10 ml에 녹인 액을 1:1로 혼합한 후 photoreactor에서 24시간동안 광을 조사시키고 이 광분해액을 냉암소에 하루밤 방치하여 얻은 침전을 dry oven에서 100°C로 1시간동안 건조한 다음 KBr법으로 IR을 측정하여 spectra를 얻었다.

### 실험결과 및 고찰

#### Pefloxacin의 여기 상태의 multiplicity

Pefloxacin이 UVA 및 UVB에 대해 광감수성을 지닌 화합물로서 UVB를 흡수하여 도달하는 여기상태의 multiplicity를 알아보기 위해 triplet sensitizer인 benzophenone을 pefloxacin용액에 첨가하여 빛을 조사한 뒤에 얻은 UV 흡수 spectrum과 triplet sensitizer가 없는 광분해액의 spectrum을 비교해 보았다(Fig. 1). Benzophenone이 첨가된 시료(B)에서 pefloxacin의 330 nm 부근의 흡광도 변화는 나타나지 않으나 275 nm의 흡광도는 benzophenone이 첨가되지 않은 시료(A)의 흡광도보다 낮게 나타났다. 이는 pefloxacin의 275 nm 흡수체가 benzophenone의 삼중항 광증감효과를 받는 것을 알 수 있다. 즉, 시험액에 조사한 UVB 에너지를 benzophenone이 흡수하여 단일항 상

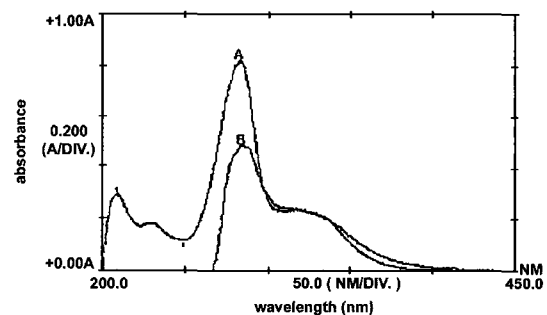


Fig. 1 - Sensitizing effect of benzophenone on photodegradation of pefloxacin ( $2.0 \times 10^{-5}$  M) in ethanol. A : without benzophenone, B : with 0.1 w/v% benzophenone

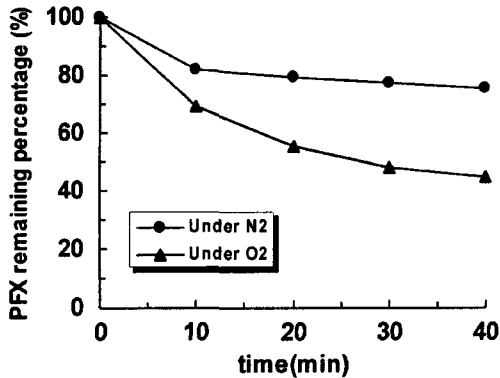


Fig. 2 - Effects of O<sub>2</sub> on the photodegradation rate of pefloxacin ( $2.0 \times 10^{-5}$  M) in pH 7.4 phosphate buffer solution. All experiments were performed in triplicate. A: replaced with N<sub>2</sub> gas, B: not replaced

태로 여기된 후 계간교차를 통해 삼중항상태에 도달하고 삼중항상태 에너지가 pefloxacin분자에 전이되어 275 nm 흡수체의 분해를 촉진시키므로 pefloxacin의 광분해는 삼중항상태를 통해 일어남을 알 수 있었다.

#### Pefloxacin의 광분해과정에서 산소의 영향

Pefloxacin이 광감수성 화합물로서 광분해 과정에 산소가 관여하는지를 알아 보기 위하여 질소 gas로 치환시킨 시험액과 치환시키지 않은 시험액을 UVB에 노출시킨 후 275 nm에서의 UV흡광도의 변화를 측정하였다(Fig. 2). 광분해 전과정을 비교할 때, 산소가 존재하는 광반응액에서 광을 조사하는 시간이 증가함에 따라 275 nm에서의 흡광도가 지속적으로 감소되었다. 질소 gas로 치환된 광분해액에서는 광을 조사 10분 후에 흡광도가 비교적 많이 감소되고 시간이 경과함에 따라 pefloxacin의 흡광도 감소가 점차 줄었다. 이것은 광조사 직전에 시험액에 남아 있던 산소에 의해 광분해가 촉진되었으나 이후에 광반응계 내에 소량 남아 있던 산소가 소모된 후에 pefloxacin의 광분해가 억제된 것으로 생각된다. 그러므로 pefloxacin의 광분해는 산소가 존재할 경우 촉진되며 이는 단일항 상태의 산소에 의한 직접적인 광산화가 일어나거나 또는 다른 활성 산소종에 의한 radical성 광화학 반응을 통해 광분해 될 것으로 예상된다.

#### Singlet oxygen의 생성 : Type II

산소가 pefloxacin의 광분해에 영향을 주는 것으로 나타났으므로 광분해과정에 관여하는 산소의 mul-

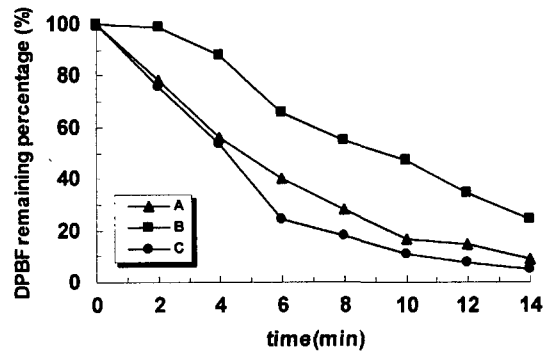


Fig. 3 - Effect of pefloxacin ( $2.0 \times 10^{-5}$  M)(A), sodium azide ( $1.0 \times 10^{-3}$  M)(B) and 15 v/v% D<sub>2</sub>O(C) on photobleaching of DPBF ( $1.5 \times 10^{-5}$  M). All experiments were performed in triplicate.

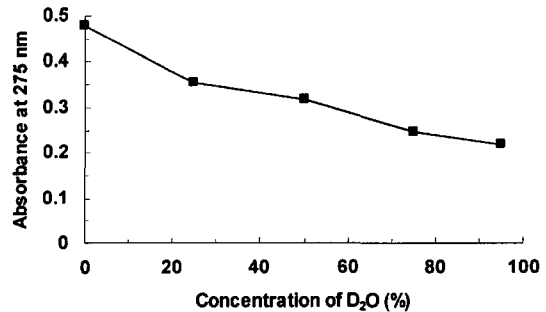


Fig. 4 - Effects of D<sub>2</sub>O on photodegradation of pefloxacin ( $2.0 \times 10^{-5}$  M) irradiated by UVB for 30 min. in pH 7.4 phosphate buffer solution. All experiments were performed in triplicate, 1: no D<sub>2</sub>O, 2: 25 v/v% D<sub>2</sub>O, 3: 50 v/v% D<sub>2</sub>O, 4: 75 v/v% D<sub>2</sub>O, 5: 95 v/v% D<sub>2</sub>O

tiplicity를 알아 보기 위해 singlet oxygen과 반응하여 무색의 화합물을 생성하는 DPBF<sup>18)</sup>의 photobleaching 현상을 측정하여 단일항 산소의 생성여부를 확인하였고 singlet oxygen의 수명을 연장시키는 D<sub>2</sub>O<sup>18,19)</sup>의 첨가 농도 변화에 따른 영향을 검토하였다(Fig. 3, 4). DPBF methanol용액은 UV 및 VIS 영역에 걸쳐 4개의 흡수대를 가지나 본 실험에서는 pefloxacin의 흡수에 의해 영향을 받지 않는 411 nm에서 DPBF의 흡광도 변화를 측정하여 pefloxacin이 singlet oxygen을 생성시키는지 확인하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 D<sub>2</sub>O가 함유된 시료에서는 pefloxacin만 포함된 시료에서 보다 411 nm의 흡광도 감소가 더 크게 나타났으며 singlet oxygen quencher인 sodium azide를 첨가한 반응액에서는 DPBF의 photobleaching이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. D<sub>2</sub>O가 존재하는 반응액

에서는 산소의 단일항 수명을 연장시키므로 DPBF의 photobleaching 현상이 보다 크게 나타나고 singlet oxygen quencher인 sodium azide가 첨가된 반응액에서는 sodium azide가 단일항 산소 소거작용을 통하여 DPBF의 photobleaching을 억제시켰다. 한편, 시험액에 반응성이 큰 단일항 산소의 수명을 연장시키는 D2O의 첨가량이 증가함에 따라 pefloxacin의 광분해가 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 pefloxacin이 UVB를 흡수하여 단일항 상태로 여기된 후 계간교차를 통해 삼중항 여기상태에 도달한 후에 계내의 산소에 삼중항상태 에너지를 기저상태의 산소에 전이시켜 singlet oxygen을 생성시키는 것으로 생각된다. (type II process). 그러므로 pefloxacin은 광감수성이 없는 화합물과 공존할 때 광증감제로 작용할 수 있는 동시에, 생성된 singlet oxygen이 pefloxacin 분자 내

에 직접 incorporation되어 광산화 반응을 일으키는 것으로 생각된다.

**Free radical의 생성 : Type I**

Pefloxacin이 UVB를 흡수하여 광화학 반응이 진행되는 과정에 hydrogen atom 또는 electron transfer 과정(type D)을 통해 free radical이 생성되는 지를 확인하기 위해 free radical scavenger인 L-cysteine<sup>20)</sup>을 pefloxacin용액에 첨가하여 UVB를 조사한 시험액에서 백색 침전을 얻었다. 얻어진 침전이 pefloxacin의 광분해산물인지, 반응액에 첨가한 L-cysteine에서 유래한 화합물인지를 확인하기 위해 IR spectrum을 측정하였다(Fig. 5). Cysteine의 S-H 결합에 의한 특징적인 2530 cm<sup>-1</sup>부근의 흡수 peak(A)가 광화학반응 산물에서는 나타나지 않았으며(B), cystine의 IR spectrum(C)과 정확히 일치하는 것으로 보아 광반응액에서 얻어진 백색 침전은 cysteine이 산화되어 생성된 cystine임을 확인할 수 있었다. 따라서 pefloxacin은 UVB를 흡수하여 삼중항상태로 된 후에 pefloxacin분자 자체를 기질로 하여 hydrogen atom 또는 electron transfer process(type I reaction or radical process)를 통해서 또는 계내의 산소를 이용하여 활성 산소종을 생성하여 cysteine의 광산화반응을 유발하는 것으로 생각된다.

**결 론**

유산소 조건에서 pefloxacin용액에 UVB를 조사하면 삼중항 증감제인 benzophenone에 의해 pefloxacin의 광분해가 촉진되므로 pefloxacin은 단일항 여기상태에서 계간 교차를 통해 삼중항 여기상태가 된다. 그러므로 pefloxacin이 광에 대한 감수성이 없는 화합물과 공존할 경우 광증감제로 작용할 수 있을 것이다. 또한 삼중항 상태의 에너지를 계내의 산소에 그 에너지를 전이시켜 반응성이 강한 단일항 산소를 생성할 뿐만 아니라 광화학 반응과정에서 free radical을 생성하므로 pefloxacin의 광화학 반응 및 광분해는 산소 존재 하에서 Type I(singlet oxygen pathway) 및 II(free radical pathway)를 통해 일어나는 것으로 생각된다.

**문 헌**

- 1) Ferguson, J. : Fluoroquinolone photosensitization: A

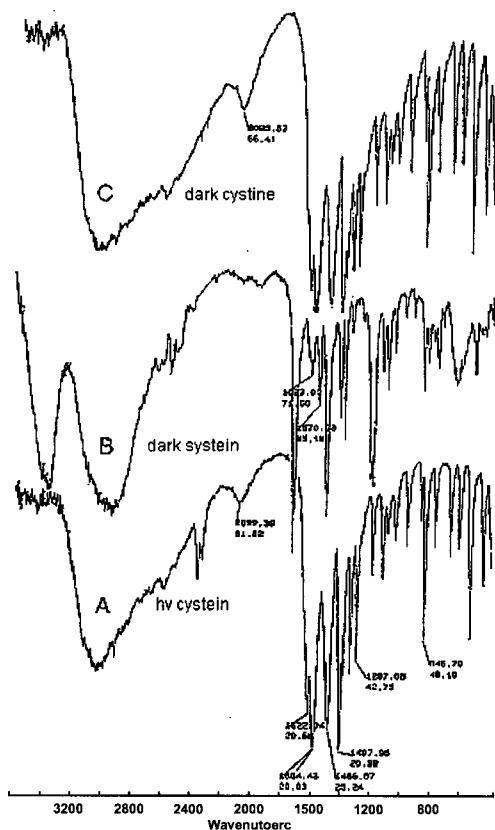


Fig. 5 - IR spectra of photo-product(A) obtained from pefloxacin methanol solution ( $2.5 \times 10^{-4}$  M), in the ratio 1:1, irradiated by UVB for 24hr and L-cysteine(B) and cystine(C) placed in the dark area for 24 hr.

- review of clinical and laboratory studies, *Photochem. Photobiol.*, **62**(6), 954(1995).
- 2) Epstein, J. and Wintroub, B. : Photosensitivity due to drugs, *Drugs*, **30**, 42 (1985).
  - 3) Christ, W., Lehnert, T. and Ulbrich, B. : Session 12. Specific toxicologic aspects of the quinolones, *Rev. Infec. Diseases*, **10**(suppl.1) : s141 (1988).
  - 4) Ferguson, J. and Johnson, B. : Clinical and laboratory studies of the photosensitizing potential of norfloxacin, a 4-quinolone broad-spectrum antibiotic, *British J. Dermatol.*, **128**, 285 (1993).
  - 5) Kawabe, Y., Mizuno, N. and Sakakibara, S. : Photoallergic reaction caused by enoxacin, *Photodermatology*, **6**, 57 (1989).
  - 6) Lopitiaux, R., Hermet, R., Sirot, J., Filiu, P. and Terver, S. : Tolerance of pefloxacin in the treatment of thirty six bone and joint infections, *Therapie*, **40**, 349 (1985).
  - 7) Fernandez, E., Cardenas, A. M. and Mart nez, G. : Phototoxicity from nalidixic acid : oxygen dependent photohemolysis, *Il Farmaco*, **42**, 681 (1987).
  - 8) Przybilla, B., Georgii, A., Bergner, T. and Ring, J. : Demonstration of quinolone phototoxicity in vitro, *Dermatologica*, **181**, 98 (1990).
  - 9) Ferguson, J. and Johnson, B. : Ciprofloxacin-induced photosensitivity : in vitro and in vivo studies, *British J. Dermatol.*, **123**, 9 (1990).
  - 10) Cardenas, A. M., Vargas, F., Fernandez, E. and Hidalgo, M. E. ; Phototoxic potential of quinolones, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **10**, 249 (1991).
  - 11) Detzer, N. and Huber, B. : Photochemie heterocyclischer enone Photolyse und themolyse von nalidixinsäure, *Tetrahedron*, **31**, 1937 (1975).
  - 12) Fernandez, E., Pena, W., Vinet, R. and Hidalgo, M. E. : Kinetics of photodegradation of nalidixic acid, *Analea de Quimica*, **82**, 96 (1986).
  - 13) Tiefenbacher, E., Haen, E., Przybilla, B. and Kurz, H. : Photodegradation of some quinolone used as antimicrobial therapeutics, *J. Pharm. Sci.*, **83**(4), 463 (1994).
  - 14) Moore, D. E., Hemmeus, V. and Yip, H. : Photosensitization of drugs : nalidixic acid and oxolinic acid, *Photochem. Photobiol.*, **39**, 57 (1984).
  - 15) Fernandez, E. and Cardenas, A. : The mechanism of photohaemolysis by photoproducts of nalidixic acid, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **4**, 329 (1990).
  - 16) Wagai, N. and Tawara, K. : Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent-induced cutaneous phototoxicity in mice, *Arch. Toxicol.*, **65**, 495 (1991).
  - 17) Costanzo, L., De Guidorell, G., Cambria, A. and Fama, M. : Molecular mechanism of drug photosensitization-II. Photohemolysis sensitized by ketoprofen, *Photochem. Photobiol.*, **50**(3), 359 (1989).
  - 18) Merkel, P. B., Nilsson, R. and Kearns, R. : Deuterium effects on singlet oxygen life-times in solutions. A new test of singlet oxygen reactions, *J. A C. S.*, **94**(3), 1030 (1972).
  - 19) Kendric, C. S. : The Science of Photobiology, Plenum Press, New York, pp 88-92 (1977).
  - 20) Vargas, F., Rivas, C. and Machado, R. : Photodegradation of nifedipine under aerobic conditions: Evidence of formation of singlet oxygen and radical intermediate, *J. Pharm. Sci.*, **81**(4), 399 (1992).