

## UVB 조사에 의한 페플록사신의 광독성 유발 기전

최윤수\* · 이경선\*

대구효성가톨릭대학교 약학대학, \*영남대학교 약학대학  
(Received October 21, 1999)

### Phototoxic Potential Mechanism of Pefloxacin Irradiated by UVB

Yoon-Soo Choi and Kyung-Seon Lee\*

College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyongsan, 712-702  
\*College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749

**Abstract** — The effect of antioxidants on photochemical reaction of pefloxacin by UVB (290~320 nm) was investigated and the possible mechanism of phototoxicity on the skin was also studied. The photo-degradation of pefloxacin by UVB was suppressed by cysteine, reduced glutathione and ascorbic acid, but was promoted by  $\alpha$ -tocopherol. Squalene, accounts for more than 10% of skin surface lipids, was peroxidized by pefloxacin through both radical and singlet oxygen mechanism.

**Keywords** □ UVB, phototoxicity, pefloxacin.

Quinolone계 약물인 pefloxacin(PFX, 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid)은 각종 감염성 질환에 경구로 투여하는 광범위 항균제이며 본 약물을 투여한 환자가 빛에 노출될 경우 피부에 대한 부작용이 높게 나타나는 약물로서 UVB에 의해 type I, II의 광반응을 일으키는 것으로 전보에서 보고하였다.<sup>1)</sup> Matsu-moto 등<sup>2)</sup>이 몇가지 fluoroquinolone계 화합물의 UVA에 대한 안정성을 검토한 결과에 따르면 8-위치에 치환기가 없는 화합물이 광에 노출되었을 때 가장 불안정하다고 보고하였으므로 이러한 계열에 속하는 pefloxacin 역시 UVB에 불안정할 것으로 생각되며 전보<sup>1)</sup>에서 밝힌대로 pefloxacin에 UVB(290~320 nm)를 조사하는 경우, 단일항 산소를 생성하며 동시에 free radical도 생성하므로 광독성을 유발하는 것으로 생각된다. 임상에서 소양성 홍반, 소양증을 동반한 홍반성 발진, photoonycholysis와 같은 광독성<sup>3)</sup> 또는

광알러지를 유발한다는 보고가 있어 체내에서 공존 가능성이 있는 항산화성 물질이 pefloxacin의 광화학 반응계에 공존할 경우 미치는 영향과 임상에서 나타난 피부에 대한 부작용이 일어나는 기전을 *in vitro*에서 검토하였다.

### 실험방법

**시약 및 기기** — Pefloxacin methane sulfonate는 국 제약품에서 기증하였고, squalene, dl- $\alpha$ -tocopherol, sodium azide는 Sigma제를, reduced glutathione, tetrabutylammonium hydrogensulfate 등은 Aldrich제를 사용하였으며, L-cysteine, L-ascorbic acid, 2-thio-barbituric acid, cystine 등은 Wako 및 Junsei제 특급품을 사용하였다. 그 외 ethanol, methanol,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  등은 특급품을, HPLC 이동상으로 사용된 methanol은 HPLC용 용매를 사용하였고 물은 초순수를 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 UV spectrophotometer (Shimadzu UV-160A), HPLC system(Tosoh SC-8010

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 053-850-3616 (팩스) 053-850-3602

system with UV detector(UV-8010)이며 실험 전반에 Rayonet RMR-600 model의 photoreactor를 사용하였으며 merry-go-round와 8개의 RMR-3000A 광원이 설치되어 있다. 반응용기는 15×110 mm의 quartz tube를 사용하였으며 반응시 merry-go-round의 rotation speed는 5 rpm이었다. 본 실험에 사용된 HPLC조건은 아래와 같다.

column : TSK-gel ODS-80<sup>TM</sup>(4.6 mm I.D.×150 mm)  
mobile phase : 0.067M phosphate buffer(pH 6.0)-  
methanol(50 : 50 v/v) with  
tetrabutylammonium hydrogen sulfate 2.0 g/l  
flow rate : 0.7 ml/min.  
sample injection volume : 10  $\mu$ l  
detector : UV detector(UV-8010, 275 nm)

**Pefloxacin의 광분해에 대한 cysteine 및 glutathione의 영향** - Pefloxacin methane sulfonate  $5.0 \times 10^{-4}$  M의 pefloxacin 용액(pH 7.4)과 cysteine 및 glutathione  $5.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$  및  $5.0 \times 10^{-3}$  M이 각각 포함된 pefloxacin 용액을 5 ml씩 취해서 photoreactor에 넣어 1시간 동안 UVB를 조사시킨 광분해액에 대해 상기의 조건으로 HPLC를 행하였다.

**Pefloxacin의 광분해에 대한 L-ascorbic acid의 영향** - Ascorbic acid 4.4 mg을 취해 pefloxacin 용액( $5.0 \times 10^{-4}$  M, pH 5.4) 25 ml에 녹인 액(pH 5.0)과 ascorbic acid를 가하지 않은 pefloxacin 용액(pH 5.0)을 각각 5 ml씩 취해 photoreactor에서 1시간 동안 광조사시킨 후 위와 같은 조건으로 HPLC를 행하였다.

**Pefloxacin의 광분해에 대한 d $\alpha$ -tocopherol의 영향** - Pefloxacin methanol 용액( $5.0 \times 10^{-4}$  M) 및  $\alpha$ -tocopherol이 각각  $5.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$  및  $5.0 \times 10^{-3}$  M이 포함되도록 만든 시료 용액을 5 ml씩 취하여 photoreactor에서 1시간 동안 광조사 시킨 후 앞서와 같은 조건에서 HPLC를 행하였다.

**Pefloxacin의 광화학 반응이 squalene에 미치는 영향** -  $1.0 \times 10^{-2}$  M의 squalene ethanol 용액을 희석하여  $5.0 \times 10^{-3}$  M로 만들어 대조액으로 하고, pefloxacin ethanol 용액( $6.6 \times 10^{-4}$  M)과 squalene ethanol 용액( $1.0 \times 10^{-2}$  M)을 1:1로 혼합한 액과 이 액에  $\alpha$ -tocopherol 2.2  $\mu$ l를 첨가하여  $\alpha$ -tocopherol이  $2.0 \times 10^{-4}$  M이 되도록 만든다. 이 3가지 시험액을 각 4 ml를 취해 photoreactor에서 4시간 동안 UVB를 조사시켰다. 광조사가 끝난 직후의 TBA 144.15 mg을 acetic acid

5 ml를 가하여 녹인 후 ethanol을 가해 100 ml로 하여 만든 TBA ethanol 용액( $1.0 \times 10^{-2}$  M)을 4 ml를 취해 광반응액에 가하고 열탕에서 1시간 동안 반응시킨 후<sup>4)</sup> 꺼내어 즉시 빙수중에서 반응액이 든 tube를 냉각시킨 뒤 525 nm에서 흡광도를 측정하여 squalene의 광산화 정도를 비교하였다(TBA assay).

**Singlet oxygen mechanism** - Squalene ethanol 용액( $1.0 \times 10^{-2}$  M)을  $1.0 \times 10^{-3}$  M의 농도로 만들 때, D<sub>2</sub>O<sup>5,6)</sup>와 singlet oxygen quencher인 sodium azide를 용해시키기 위해 물 일정소량을 가하고, 유화제인 sodium laurylsulfate(0.4%)를 첨가하여 squalene과 물이 잘 혼합되도록 하였다. 또한, 동일한 조건의 squalene ethanol 용액에 pefloxacin( $1.23 \times 10^{-4}$  M)의 농도가  $9.8 \times 10^{-5}$  M이 되도록 하였다. Singlet oxygen의 영향을 검토하기 위해 물을 D<sub>2</sub>O로 치환시킨 시료 및 sodium azide가 각각  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $2.0 \times 10^{-3}$  M이 되도록 반응액을 만들었다. 조제한 3종류의 시료는 앞서와 같은 방법으로 UVB를 조사한 후에 TBA assay를 행하고 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험에 사용한 모든 시약은 보관 중 빛의 영향을 배제하기 위해 갈색병에 넣어 암소에 보관하였으며 필요시 희석하여 사용하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 항산화성 화합물의 영향

Pefloxacin이 체내에 흡수된 후, 광에 노출되었을 때 생체내에 공존 가능한 항산화성 화합물이 pefloxacin의 광분해에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 cysteine, glutathione, ascorbic acid 및  $\alpha$ -tocopherol 등으로 실험하여 얻은 결과를 Fig. 1, 2, 3 및 4에 나타내었다. Pefloxacin수용액에 첨가하는 cysteine의 농도가 pefloxacin의 농도의 10배에 해당하는  $5.0 \times 10^{-3}$  M에서 유의성 있게 pefloxacin의 광분해가 억제되었다(Fig. 1). Glutathione은 4개의 proton binding site가 있고 수용액의 pH에 따라 non-enzymatic decomposition rate가 다르게 나타난다<sup>7)</sup>고 알려져 있어 그 중 glutathione의 분해가 가장 느린 중성영역(pH 7.4)에서 glutathione의 농도를 증가시킴에 따라 pefloxacin의 광분해가 억제되었으나, glutathione 역시 pefloxacin보다 10배나 높은 농도에서 유의성 있는 억제 효과를 나타내고 있었다(Fig. 2). Glutathione이 cy-

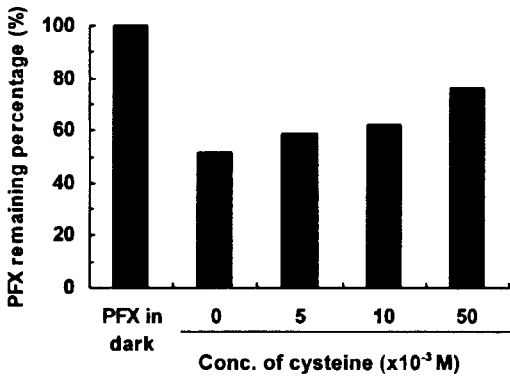


Fig. 1 – Effect of L-cysteine on photodegradation of pefloxacin ( $5.0 \times 10^{-4}$  M) irradiated by UVB for 1hr in pH7.4 phosphate buffer solution. All experiments were performed in triplicate.

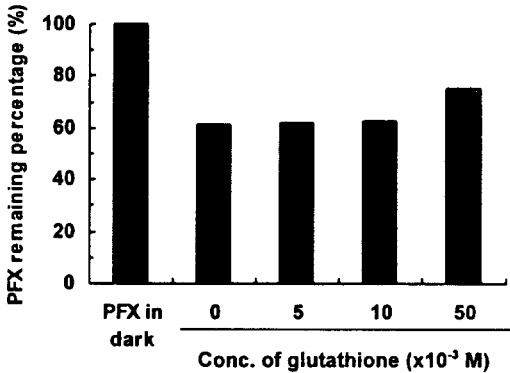


Fig. 2 – Effect of reduced-glutathione on photodegradation of pefloxacin ( $5.0 \times 10^{-4}$  M) irradiated by UVB for 1 hr in pH7.4 phosphate buffer solution. All experiments were performed in triplicate.

steine과 같이 radical scavenging action을 통해 항산화 효과를 나타내지만<sup>7-9)</sup> 본 실험조건에서 pefloxacin의 광분해에 대한 항산화력은 cysteine에 비해 낮은 것으로 나타났다. Cysteine과 glutathione의 항산화작용은 hydrogen atom transfer<sup>7,10)</sup>를 통해 pefloxacin의 radical 생성을 억제하여 일어난 것으로 생각된다. 이는 cysteine이 cystine으로 산화된 것과 같이 환원형 glutathione이 산화형 glutathione으로 산화된 것으로 추정된다. 한편 ascorbic acid는 일반적으로 pH 5 부근에서 항산화력이 최대인 것으로 알려져 있다. Ascorbic acid가 산으로 작용하므로 농도가 다를 경우 액의 pH의 변화가 초래되고 pefloxacin의 광분해 경향도 pH의 영향을 받으므로 ascorbic acid는  $1.0 \times 10^{-3}$

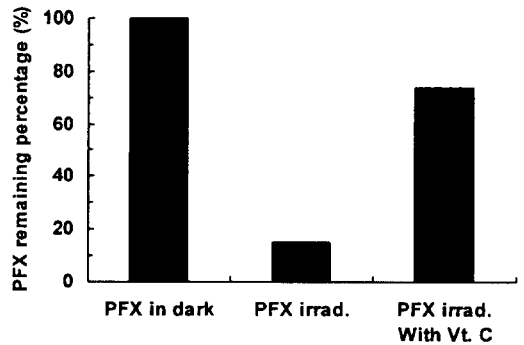


Fig. 3 – Effect of L-ascorbic acid ( $1.0 \times 10^{-3}$  M) on photodegradation of pefloxacin ( $5.0 \times 10^{-4}$  M), irradiated by UVB for 1hr in pH 5.0 phosphate buffer solution. All experiments were performed in triplicate.

M의 농도에서 완충용액을 써서 pH가 5.0이 되도록 하여, 동일한 pH 조건의 pefloxacin용액과 같은 조건으로 UVB를 조사하였다(Fig. 3). Pefloxacin의 광분해는 ascorbic acid에 의해 억제되었으며 이러한 억제 효과는 ascorbic acid가 electron transfer과정을 통해<sup>7,11,12)</sup> 계내에 free radical의 생성을 억제하여 항산화효과를 발휘하기 때문인 것으로 생각된다. Pefloxacin이 체내에 흡수될 경우 공존 가능성이 높은 cysteine, glutathione, ascorbic acid와의 반응 결과, pefloxacin의 광분해가 억제되었으므로 pefloxacin의 광분해과정에는 free radical이 개입하며, hydrogen atom transfer 또는 electron transfer 작용을 지닌 화합물이 공존할 경우 광분해가 억제될 수 있을 것으로 예상된다. 각 실험조건이 같지 않으므로 직접적인 비교는 어려우나 본 실험에서 사용한 농도 조건인  $1.0 \times 10^{-3}$  M에서는 ascorbic acid가 pefloxacin의 광분해에 대한 억제효과가 가장 큰 것으로 나타났다.  $\alpha$ -Tocopherol의 농도를  $5.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$  및  $5.0 \times 10^{-3}$  M로 달리한 시험액 중  $1 \times 10^{-3}$  M 이상의 농도에서  $\alpha$ -tocopherol이 pefloxacin의 광분해를 촉진시켰으며, 농도가 높은 시료에서 광분해가 더욱 현저히 촉진되었다(Fig. 4). 일반적으로  $\alpha$ -tocopherol은 free radical scavenger로 작용하여 항산화력을 나타내는 것으로 알려져 있으나<sup>11-15)</sup>  $\alpha$ -tocopherol의 농도가 높을 때는 항산화작용을 나타내지 않고 오히려  $\alpha$ -tocopherol로부터 생성된 chromoxy radical이 methyl linolate의 자동산화를 촉진시키거나<sup>16)</sup> LDL의 산화를 촉진시킨다<sup>17)</sup>는 보고가 있다.

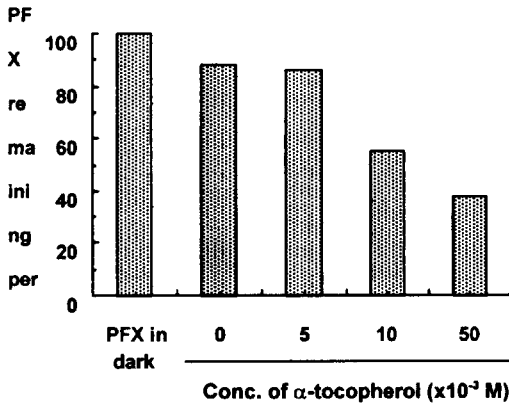


Fig. 4 - Effect of  $\alpha$ -tocopherol on photodegradation of pefloxacin ( $5.0 \times 10^{-4}$  M) irradiated by UVB for 1hr in ethanol. All experiments were performed in triplicate.

본 실험 조건에서 사용한 농도의  $\alpha$ -tocopherol이 pefloxacin의 광분해를 촉진시키는 것은 pefloxacin이 UVB를 흡수하여 생성된 radical에 의해  $\alpha$ -tocopherol이 chromanoxo radical( $\alpha$ -Toc $\cdot$ )로 전환되며 이것이 radical propagation을 이끌어 이차적으로 pefloxacin의 광분해를 촉진시키는 것으로 생각된다.

**Pefloxacin의 광화학 반응이 squalene에 미치는 영향**

Pefloxacin ethanol용액에 squalene을 첨가하고 4시간동안 광조사시킨 뒤 TBA를 가해 1시간동안 열탕에서 가열하는 동안 무색 투명한 액은 서서히 다홍색을 띄었다. Squalene만 있는 대조액은 UVB에 의해 약간의 광산화가 일어났으나, pefloxacin이 공존하는 시험액에서는 squalene의 광산화가 더욱 촉진되었다(Fig. 5). TBA assay가 진행되는 동안에 생성되는 다홍색 물질은 squalene이 광산화되어 생성된 reactive carbonyl substances와 TBA가 반응하여 TBA dimer를 형성한 것으로<sup>9,18-20</sup> 생각된다.

한편,  $2.0 \times 10^{-4}$  M의  $\alpha$ -tocopherol을 첨가한 광분해액에서는 squalene의 광산화가 더욱 촉진되었으며 이는  $\alpha$ -tocopherol의 chromanoxo radical이 직접 TBA에 작용하여 dimer 생성을 촉진시켰거나 chromanoxo radical이 squalene 분자 또는 pefloxacin분자의 radical 생성을 유도하여 TBA dimer의 생성을 촉진시킨 것으로 생각된다.

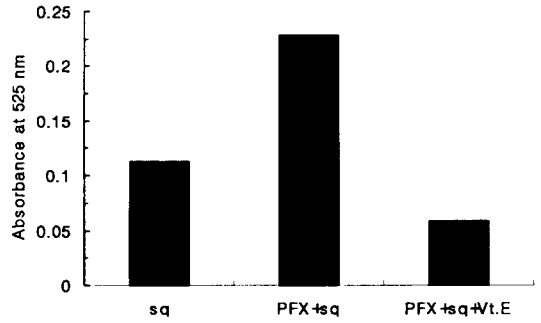


Fig. 5 - Formation of TBA dimer in squalene solution sensitized by UVB irradiation in the presence of pefloxacin. All experiments were performed in triplicate.

**Singlet oxygen mechanism**

Pefloxacin의 광증감작용에 의해 squalene이 광산화될 때 산소가 직접 관여하는지 여부를 알아보기 위해 singlet oxygen quencher인 sodium azide를 첨가한 시료와 계내의 물을 D<sub>2</sub>O로 치환시킨 시료에 광을 조사하고 TBA assay를 행하여 525 nm에서 흡광도를 측정한 결과(Fig. 6), sodium azide를 각각  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $2.0 \times 10^{-3}$  M씩 첨가한 시료에서 sodim azide의 농도가 높은 광반응액에서 TBA dimer의 형성이 보다 억제되었다. 한편, 단일항 산소의 수명을 연장하는 D<sub>2</sub>O가 첨가된 시료에서는 squalene 광산화가 현저히 촉진됨을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 pefloxacin에 의한 squalene의 광산화는 pefloxacin의 광증감작용에 의해 기저상태의 삼중항 산소가 단일항 상태로 여기된 후에 squalene의 광산화에 관여함을 시사한다.

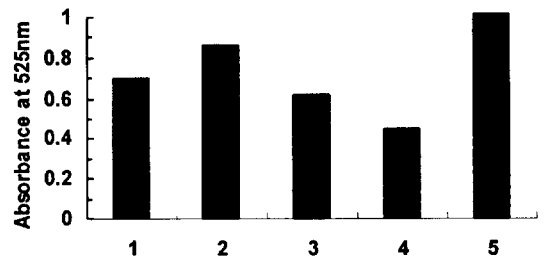


Fig. 6 - Formation of TBA dimer in squalene solution sensitized by UVB irradiation in the presence of pefloxacin. 1: squalene ( $1.0 \times 10^{-3}$  M), 2: squalene+PFX ( $9.8 \times 10^{-5}$  M), 3: squalene+PFX+NaN<sub>3</sub> ( $1.0 \times 10^{-3}$  M), 4: squalene+PFX+NaN<sub>3</sub> ( $2.0 \times 10^{-3}$  M), 5: squalene+PFX+D<sub>2</sub>O (10 v/v%).

Squalene은 피부 표면을 구성하는 지질중 10%이상을 차지하는 불포화 지질로서 UVA에 의해 몇가지 quinolone화합물의 광증감작용에 의해 광산화되어 malonaldehyde의 수종의 reactive carbonyl species를 생성한다.<sup>18)</sup> 지질이 광산화될 때 생성되는 주산물인 malonaldehyde로 bacterial assay를 해 본 결과로 mutagen임이 밝혀져 있다.<sup>19)</sup> Squalene 단독으로 존재할 때 UVA에 의해 거의 광산화되지 않으나 thiazide계 이뇨제 및 chlorpromazine이 존재하면 광증감작용을 받아 광산화된다.<sup>20)</sup> UVB에 의해서는 squalene이 단시간에 상당한 양의 malonaldehyde를 생성한다는 보고<sup>21)</sup>와 더불어 본 실험에서도 squalene 단독으로 존재할 때 UVB에 의해 광산화 됨을 알 수 있고 pefloxacin이 공존하는 경우 squalene의 광산화가 더욱 촉진되었다. 그러므로 pefloxacin의 피부에 대한 임상적 부작용은 UVA 뿐만 아니라 UVB에 의해서도 일어남을 예상할 수 있었다. 특히 UVB에 의해 squalene이 직접적으로 광분해될 뿐만 아니라 pefloxacin에 의해서도 광산화가 촉진되어 피부를 구성하는 지질의 과산화가 증강되어 피부에 대한 광독성을 유발할 수 있는 것으로 생각된다.

## 결 론

항산화제로 사용되는  $5.0 \times 10^{-3}$  M의 cysteine 및 glutathione에 의해 pefloxacin의 광분해가 유의성 있게 억제되었으며,  $5.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$  및  $5.0 \times 10^{-3}$  M 농도의  $\alpha$ -tocopherol에 의해서는 오히려 pefloxacin의 광분해가 촉진되었다. 피부를 구성하는 지질성분의 하나인 squalene은 pefloxacin의 광증감작용을 받아 광산화가 증가되어 pefloxacin에 의해 광독성이 일어날 가능성이 있는 것으로 나타났다. Squalene의 광산화는 sodium azide에 의해서는 억제되었으며 단일항 산소의 수명을 증가시키는  $D_2O$ 에 의해서는 광산화가 현저히 촉진되었다.

## 문 헌

- 1) Choi, Y. and Lee, K.: Studies on the photodegradation of pefloxacin II-Discussion on the kinetics of the photodegradation of Pefloxacin, Research Bulletins of Catholic University of Taegu-Hyosung, **51**, 439 (1995).
- 2) Matsumoto, M., et al.; Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation, *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**(8), 1715 (1992).
- 3) 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).
- 4) Buege, J. A. and Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, vol. LII, Biomembranes C. Edited by Fleischer S. and Packer L., New York, Academic Press, pp 302 (1978).
- 5) Kendric, C. S.: *The Science of Photobiology*, Plenum Press, New York, pp 88 (1977).
- 6) 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).
- 7) Forni, L. G., M nig, J., Mora-arellano, V. O. and Willson, R. L.: Thiyl free radicals: Direct observation of electron transfer reactions with phenothiazines and ascorbate, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 961 (1983).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) Foote, C. S.: Mechanisms of photosensitized oxidation, *Science*, **162**, 963 (1968).
- 11) Wefers, H. and Sies, H.: The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E, *Eur. J. Biochem.*, **174**, 353 (1988).
- 12) Nanni, Jr. E. J., Stallings, M.D. and Sawyer, D.T.: Does superoxide ion oxidize catechol,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbic acid by direct electron transfer?, *J. A. C. S.*, **102**(13), 4481 (1980).
- 13) Halliwell, B.: Antioxidant characterization, *Biochem. Pharmacol.*, **49**(10), 1341 (1995).
- 14) Frei, B., Stocker, K. and Ames, B. N.: Antioxidant

- defenses and lipid peroxidation in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 9748 (1988).
- 15) Fukuzawa, K. and Gebicki, J. M. : Oxidation of  $\alpha$ -tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals, *Arch. Biochem. Biophys.* **226**(1), 242 (1983).
- 16) Terao, J. and Matsushita, S. : The peroxidizing effect of  $\alpha$ -tocopherol on autoxidation of methyl linolate in bulk phase, *Lipids*, **21**(4), 255 (1986).
- 17) Bowry, V. W. and Stocker, R. : Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein, *J. A. C. S.*, **115**, 6029 (1993).
- 18) Fujita, H. and Matsuo, I. : *In vitro* phototoxic activities of new quinolone antibacterial agents : lipid peroxidative potentials, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **10**, 202 (1994).
- 19) Dennis, K. J. and Shibamoto, T. : Production of malonaldehyde from squalene, a major skin surface lipid, during UV-irradiation, *Photochem. Photobiol.*, **49**(5), 711 (1989).
- 20) Matsuo, I., Fujita, H., Hayakawa, K. and Ohkido, M. : Lipid peroxidative potency of photosensitized thiazide diuretics, *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 637 (1986).
- 21) Fujita, H., Matsuo, I., Okazaki, M., Yoshino, K. and Ohkido, M. : Chlorpromazine-sensitized photooxidation of squalene, *Arch. Dermatol. Res.*, **278**, 224 (1986).