

알파 리포산의 개환 및 중합

박철호 · 김애란 · 윤혜리 · 이종휘[†]

중앙대학교 화학공학과

(2006년 5월 12일 접수, 2006년 6월 20일 채택)

Ring Opening and Polymerization of Alpha-Lipoic Acid

Chul Ho Park, Ae Ran Kim, Hye Lee Yun, and Jonghwi Lee[†]

Department of Chemical Engineering and Materials Science, Chung-Ang University,

221, Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

(Received May 12, 2006; accepted June 20, 2006)

초록 : 생체 내에서 생성되는 알파 리포산은 산화방지, 혈당량 조절뿐만 아니라 식욕 억제, 비만 억제 효과 등을 가지고 있다. 약물로도 이용되고 있는 이 물질은 두 개의 황을 함유하고 있는 오각형 고리구조를 가지고 있어, 열과 자외선에 의해서 쉽게 개환되고 나아가 고분자로 중합될 수 있어서 약물로서 투여했을 경우 생체 이용률이 낮아지는 문제가 보고되어 있다. 본 연구는 개환에 따른 고분자화를 위한 다양한 조건을 조사하였다. 리포산은 녹는 점이 지나야만 개환이 발생하였지만 그 이상의 온도에서는 온도의존성이 없었다. 70 °C에서 개환율은 시간에 비례하였고 농도에 반비례하였다. 1시간 동안, 70 °C 아세트산에서 자외선과 함께 개환된 경우 개환율은 가장 높은 70%였다. 이렇게 개환된 알파 리포산들은 대부분이 이황 고분자로 변했고, 개환율이 커질수록 고분자의 분자량도 증가하였다.

Abstract : Alpha-lipoic acid (ALA) synthesized in the body has virtues such as anti-oxidation, blood sugar regulation, appetite suppression, and anti-obesity, etc. ALA, which is also used as a drug, has a five-membered ring including disulfide and so easily losses bioavailability due to ring opening and subsequent polymerization by heat or ultraviolet. This report studies various conditions for ring opening polymerization. The ring opening starts above the melting point of ALA, but there was no temperature dependence above it. At 70 °C, the degree of ring opening was proportional to reaction time and inversely proportional concentration. The degree of ring opening in acetic acid with UV for 1 hour reached the maximum conversion (70%). Most cleaved ALA changed into disulfide polymers, and the molecular weight of the polymers increased as the amount of ring opening increased.

Keywords : alpha-lipoic acid, cleavage, disulfide polymer.

서 론

알파 리포산(alpha-lipoic acid)은 전통적으로 1,2-시오틱 산(1,2-thiolic acid)으로 불려졌다. 현재는 알파 리포산(ALA)으로 더 널리 불려지고 있고, 유화성과 산성의 능력을 동시에 보유하고 있는 물질로 알려져 있다. 알파 리포산은 모든 세포 내에서 자연적으로 생합성되지만 대개 순수한 리포산으로 존재하지 않고 합동 효소로 존재한다. 현재 인체 내에서 발견된 효소로는 피루브산 탈수효소(pyruvate dehydrogenase complex)가 있지만, 아직도 이에 대한 연구는 계속 진행이 되고 있다.^{1,2}

약 10년 전부터, 알파 리포산은 약물로서 능력을 가지고 있는 물질로 인식되어지기 시작했다. 지금까지 밝혀진 약효로는 후천성 면역결핍증(acquired immune deficiency syndrome, AIDS), 신

경성 관절염(Diseases of joints), 신경 퇴화(degenerative processes in neurons), 아테롬 성 동맥 경화증(atherosclerosis), 혈당량 조절(blood sugar regulation), 식욕 억제(appetite suppression), 비만 억제 효과(anti-obesity) 등이 있다.³⁻⁵ 하지만 현재 가장 주목을 받고 있는 약효는 산화방지제이다.^{6,7} 왜냐하면 알파 리포산은 물뿐만 아니라 지방에도 용해가 가능하고 낮은 환원 포텐셜을 가지고 있기 때문이다. 유럽이나 미국에서는 뛰어난 산화방지제로 판매가 되고 있지만 국내에서는 아직 비타민 C 같은 산화방지제로 사용되지 않고 있으며 신경성 관절염 약으로만 이용되고 있다.

알파 리포산은 Figure 1과 같이 세 번째 탄소 원자에 카이랄 중심을 가지고 있어 광학 이성질체 특성을 보이지만, 자연적으로 발생하는 형태는 R 형태이다. 하지만 일반적으로 이황(S-S) 결합은 불안정하여 열에 의해 쉽게 결합이 깨져 자유 라디칼을 형성한다. 특히 알파 리포산은 광학 이성질체의 특성에 상관없이 오각

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: jong@cau.ac.kr

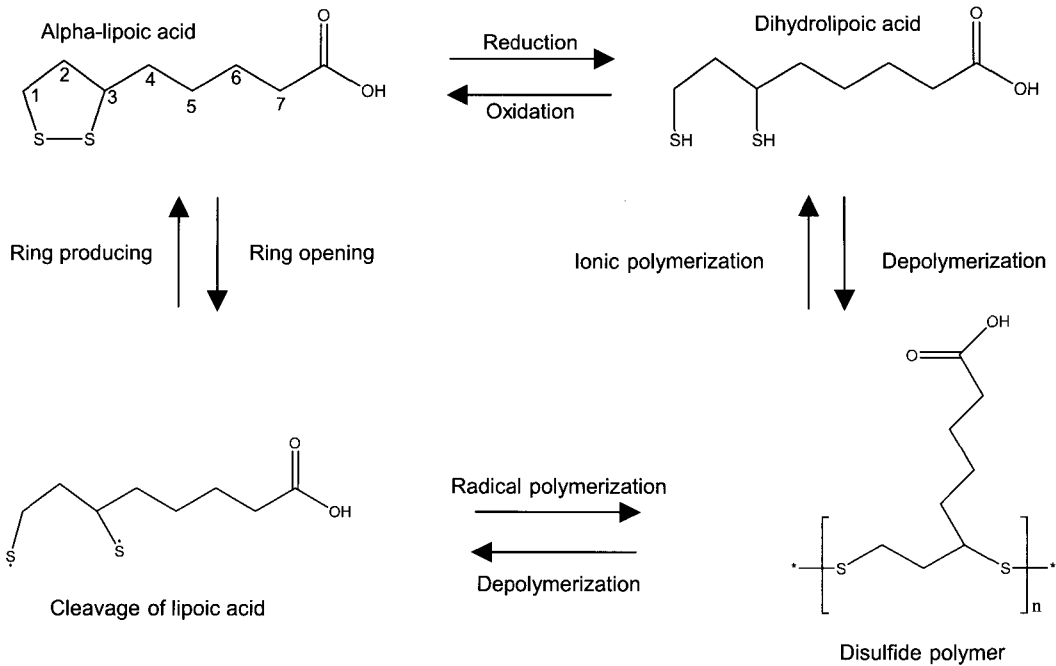


Figure 1. Chemical reactivity of alpha-lipoic acid.

형 고리구조(5환)으로 되어 있어 입체적으로도 불안정하다.^{8,9} 이러한 에너지적 불안전성 때문에 자외선 및 열에 의해 쉽게 5환이 깨지는 결과를 초래한다. 개환에 따른 이러한 생성물들 중에는 라디칼이나 환원에 따른 다이하이드로 리포산(dihydrolipoic acid)이 있다. 이들은 또한 이들 자체로 있기 보다는 고분자로 형성이 되기도 한다.¹⁰⁻¹³ 하지만 약제학적 관점에서 볼때 이들 생성은 곧 알파 리포산의 약효를 저해하는 것으로 볼 수 있다.

이런 이전의 연구들은 약물로서 사용시 그 생물학적 영향에 대한 연구가 중심임으로 국소적인 고분자 생성 및 환원 조건에 대해서만 조사되었다. 본 연구에서는 어떤 조건에서 개환이 발생한 후 고분자로 변화하는지에 대해 처음으로 체계적인 조사를 하여 알파 리포산을 단량체로 이용하여 생체 고분자를 얻어낼 수 있는지에 대한 가능성을 탐색해 보고자 한다. 얻어질 고분자물질은 분해시 생체 내 안전한 생체 활성물질인 리포산으로 돌아가게 되어 있어 새로운 생체 고분자 물질을 얻어 낼 수 있을 가능성이 높은 것으로 보인다.³

실 험

알파 리포산은 Antibiotics(Starada Rivoltana, Italy)에서, 아세트산(acetic acid), 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 사이클로헥산(cyclohexane), 벤젠(benzen)은 덕산 약품(Gyeonggi-do, South Korea)에서, 그리고 자외선 분광 측정용을 위해 사용된 디메틸 설펍사이드(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)는 Sigma-aldrich Co.(Missouri, USA)에서 구매하였다. 물은 일차 증류수를 사용하였다.

개환 실험.

온도 : 알파 리포산 0.1 g을 바이알에 넣고, 물 중탕 하에서 실험

을 진행하였다. 시간은 중탕에 들어가는 시점에서 꺼낼 때까지를 측정되었고, 시간적 오차는 ± 5 초였다. 먼저 온도에 따른 의존성을 알아 보기 위해서 열 시차 분석기를 이용하여 알파 리포산의 녹는점이 63 °C로 측정되었다. 이를 바탕으로 50~85 °C까지 다양한 조건에서 실험을 진행하였다. 시간에 따른 변화는 녹는점 이후에 온도 증가에 대한 의존성이 거의 없어 70 °C에서 10, 30, 60, 120분으로 수행되었다. 이후 샘플들은 상온에서 1시간 동안 자연 냉각 후 개환 정도를 측정하기 위해서 0.05 M 농도로 DMSO에 24시간 동안 녹였다.

용매 : 용매들은 열적 평형을 고려하여 70 °C에서 1시간 동안 미리 준비해 놓았다. 알파 리포산을 비커에 넣고 열적 평형에 있는 아세트산, 메탄올, 에탄올, *m*-프로판올, 벤젠에 넣어 개환을 시작하였다. 이때 용매 대 알파 리포산의 무게비율이 각각 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 5:1이 되도록 하였다. 개환은 1시간, 70 °C에서 수행된 후 1시간 동안 상온에서 자연냉각 후 잔존 용매를 제거하기 위해서 진공 오븐에 넣은 후 상온에서 48시간 이상 건조하였다. 개환 정도는 온도에 따른 실험 조건과 동일하게 수행했다.

기타 : 빛의 보조적인 효과를 확인하기 위하여 상온에서 24, 48시간 동안 자외선(365 nm, 80 W/cm²)을 쬐어주었다. 이 후 개환 정도는 위와 동일하게 실험하였다. 압력에 대한 실험은 100, 200, 300 kg · f/cm², 30분간 압축 후 얻은 펠렛을 바탕으로 개환율을 측정하였다. 위의 실험들의 결과를 바탕으로 개환에 중요한 온도, 용매, UV의 조합(70 °C, 1시간, UV, 아세트산(1:1wt)) 조건에서 최종적으로 측정되었다. 이후 진공 오븐에서 아세트산을 제거한 후 개환을 실험은 위와 동일했다.

분석.

열 시차 분석(DSC) : 분석 기기는 TA instrument사의 DSC2920 (Delaware, USA)인 제품을 사용하였다. 알파 리포산의 녹는점

및 열적 변형을 확인하기 위해 측정 범위는 -50~80 °C까지, 속도는 5 °C/min, 유지시간은 -50 °C와 80 °C에서 각각 30분이었다. 고분자의 열적 특성은 순수 고분자만 얻은 물질을 가지고 위와 동일 조건에서 측정되었다.

자외선/가시광선 광학 측정(UV/VIS Spectroscopy) : 분석 기기는 JASCO사의 V-500(Japan, Tokyo) 모델이다. 측정 온도는 모두 상온에서 수행되었다. 알파 리포산의 5환 내 이황(S-S) 결합의 흡수영역은 340 nm에서 나타나고, 개환시 이 흡수피크의 변화를 이용하여 개환 정도를 측정하였다. 모든 실험의 농도는 0.05 M 농도로 고정을 하였다. 또한 잔존 자유 라디칼을 고려하여 모든 샘플들은 개환 후 48시간 후에 측정되었고, 오차는 ±30분이었다. 정량화는 순수 알파 리포산의 0.05 M 흡광도에서 다양한 조건에서 개환된 샘플의 흡광도를 뺀 후 잔존 알파 리포산의 물수를 바탕으로 개환율을 계산하였다.

분자량 측정 : 개환된 샘플들은 DMSO에 용해를 시킨 후 Ubbelohde viscometer를 이용하여 30 °C에서 측정되었다. 개환이 일어남에 따라서 리포산은 점도가 증가했다. 점도 증가원인이 고분자화에 의한 영향임을 확인하기 위해서 젤 투과 크로마토그래피(GPC, Waters, Milford, USA)를 사용하였다. GPC 측정 조건은 30 °C, 용매는 다이메틸 퓨란(DMF, Sigma-Aldrich, Milford Massachusetts, USA), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA)를 기준물로 하여 분자량을 비교하였다.

결과 및 토론

개환. 순수 알파 리포산의 녹는점은 63 °C로 측정이 되었다. 개환 정도는 Figure 2에서 보여주는 것처럼 340 nm 부근의 최대 흡수광량이 개환후 감소하는 것을 바탕으로 측정되었다. 녹는점을 기점으로 하여 이점 이하의 온도에서는 개환이 발생하지 않음을 Table 1에서 보여주고 있다. 녹는점 이상의 온도에서 개환이 발생하지만 온도 증가 영향을 거의 볼 수 없었으며, 최대 개환율은 60%였음을 알 수 있다. 녹는점 이상의 온도에서는 반응 시간에 따른 영향이 온도보다 더 분명하였는데, 개환율에 커다란 영향을 주는 인자로 시간에 따른 영향을 Figure 3에 나타내었다. 70 °C에서 분당 변환율이 거의 선형적으로 변화를 하다가 60분 이후에는 최고의 개환율인 약 60% 근처에 도달함을 알

수 있다.

다양한 용매 내에 용해된 알파 리포산의 개환도 녹는점 이상의 온도에서만 개환이 발생하였다(Table 1). 하지만 개환율은 선택하는 용매에 크게 의존함을 Table 1에서와 같이 알 수 있다. 먼저 아세트산의 경우에는 개환율이 60%였지만 메탄올, 에탄올 경우에는 급격히 감소함을 알 수 있다. 반면 DMSO나 벤젠의 경우에는 변화량이 거의 미미하다는 것을 알 수 있다. 이 결과로 Ka 값이 작아질수록 개환율이 감소함을 추측할 수 있고,

Table 1. Viscosity and Amount of Lipoic Acid Cleaved at Various Conditions

Temperature (°C)	Time (min)	Solvent	Weight ratio (ALA:Solvent)	Amount of cleaved LA (mol%)	Intrinsic viscosity (ln(η _{sp} /c))
50	60			3±2	X
60	60			4±2	X
80	60			59±3	2.8±0.4
90	60			58±3	2.8±0.4
70	10			10±3	1.2±0.2
70	30			33±3	2.2±0.3
70	60			57±4	2.8±0.4
70	120			60±4	2.8±0.4
70	60	Acetic acid	1:1	60±8	2.8±0.4
70	60	Methanol	1:1	24±4	1.9±0.2
70	60	Ethanol	1:1	18±3	1.6±0.2
70	60	DMSO	1:1	12±3	1.3±0.2
70	60	Benzene	1:1	10±3	1.1±0.2
70	60	Distilled water	1:1	37±7	2.2±0.4
70	60	Cyclohexane	1:1	17±5	1.2±0.2
70	60	Acetic acid	1:0.5	62±3	2.9±0.4
70	60	Acetic acid	1:2	50±2	2.6±0.3
70	60	Acetic acid	1:3	44±2	2.5±0.4
70	60	Acetic acid	1:5	41±2	2.5±0.4
70	60	Methanol	1:0.5	24±4	1.6±0.3
70	60	Methanol	1:2	19±5	1.5±0.3
70	60	Methanol	1:3	14±3	1.2±0.3
70	60	Methanol	1:5	10±4	1.1±0.3
70	60	Acetic acid	1:1 with UV	70±5	3.2±0.1

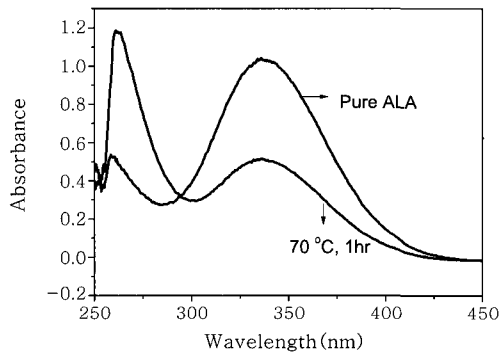


Figure 2. UV-Vis spectra of ALA before and after polymerization(70 °C, 1 hr).

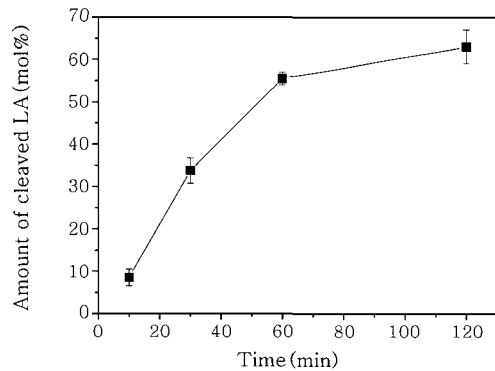


Figure 3. Amount of cleaved lipoic acid(LA) as a function of time. The temperature was 70 °C.

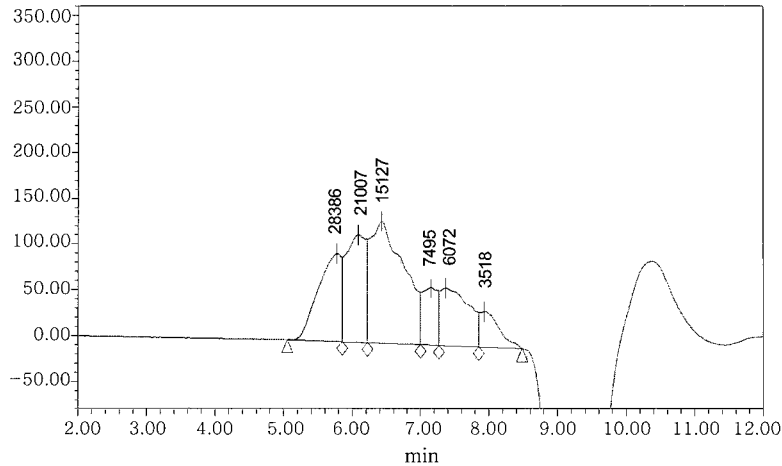


Figure 4. GPC chromatogram of disulfide polymer polymerized at 70 °C for 1 hour. The molecular weight data inside the figure are the values of M_p (GPC calibrant: PMMA).

그 이유는 수소 이온농도가 개환에 상당한 영향을 줄 수 있기 때문이라고 사료된다.

반면 알파 리포산을 녹이지 못하는 증류수의 경우 개환율은 37% 정도인 반면 시클로 헥산은 17%였다(Table 1). 이 두 가지의 비용매에서 개환율의 차이는 아마도 물 내에서 존재하는 수소이온과 온도가 증가함에 따라서 알파 리포산이 물에 녹아 들어가는 양이 시클로 헥산보다 크기 때문일 것으로 생각된다.

아세트산과 메탄올의 농도에 따른 변화 실험에서도 역시 수소 이온의 농도에 따른 변화성 및 알파 리포산의 농도에 따른 의존성을 동시에 관찰할 수 있다(Table 1). 본 실험에서 농도가 낮아진다는 것은 분자간의 충돌의 확률이 떨어지게 되고, 이는 개환율에 직접적으로 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 반면 아세트산이 메탄올보다 수소이온 농도가 더 높기 때문에 개환율이 크다는 것을 알 수 있다.

기타 다른 조건 중, 압력 증가 및 압력을 가한 시간에 대한 의존성은 개환에 거의 영향을 주지 않았고, 순수 자외선에 의한 영향은 주는 시간에 따라서 노란색의 알파 리포산이 갈색으로 변화를 하지만 UV/VIS 분광 측정시에는 개환율이 거의 측정이 되지 않았다. 아마 이 경우는 자외선에 의해 알파 리포산의 결정 표면에서만 산화가 일어나고, 결정 내부는 변화를 하지 않아, 전체적인 변화량은 매우 적어 측정되지 않았을 것으로 판단된다. 반면 70 °C, 한시간 동안 아세트산에 녹아 있는 알파 리포산에 자외선을 쬐어 주게 되면 개환율은 최고 70%까지 올라가게 된다. 이는 UV 조사가 없었던 경우의 60% 개환율보다 크다. 이러한 결과는 자외선에 의해 형성되는 자유 라디칼의 개수가 증가해서 나오는 결과일 것이라고 생각된다.

고분자 형성. 고분자 분자량 확인은 70 °C에서 1시간 동안 놓아둔 샘플을 아세트산에 녹인 후 벤젠에 침전시켜 고분자를 회수한 후 GPC를 통해서 측정을 하였다. Figure 4에서 사용된 샘플의 전환율은 60%였고, 실제 얻어진 고분자의 무게는 전체 무게의 $55 \pm 10\%$ 였다. 이는 실험적 오차를 생각해 봤을 경우 전환율과 고분자 수율이 거의 동일함을 알 수 있다. 또한 DSC 분석 결과 10 °C의 유리전이온도가 측정되었다. 이 결과들을 바탕으로 개환이 일어

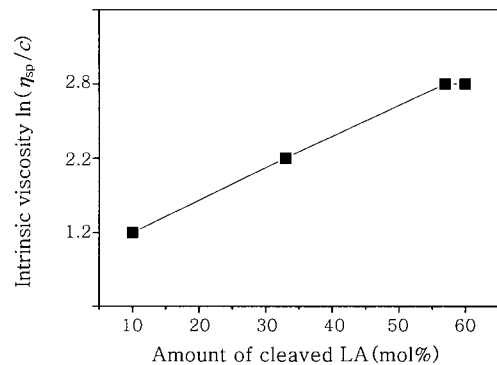


Figure 5. The relationship between the intrinsic viscosity and the amount of lipoic acid(LA) cleaved at 70 °C for 10, 30, 60, and 120 min.

나게 되면 대부분은 비결정성 고분자로 변화한다는 것을 알 수 있다.

Figure 4에서는 고분자 분자량 분포를 보여주고 있는데, 그 분포가 상대적으로 넓은 것을 확인할 수 있다. 분자량 분포가 매우 넓은 이유는 두 가지로 유추해 볼 수 있다. 첫 번째로 중합된 고분자 내에 선형 이황 결합(S-S)은 온도에 의해서 다시 붕괴되어 거대 분자가 작은 분자로 형성될 수 있다는 것, 두 번째는 고분자화가 진행됨에 따라서 점도가 증가하였고, 이는 미반응 알파 리포산과 결합을 하기 위한 충돌을 저해하여 거대 분자로 자랄 수 없다는 것으로 생각할 수 있다.

점도의 변화와 개환율과의 상관관계를 조사하여 Figure 5에 나타내었다. 넓은 영역에서 개환율과 점도는 거의 선형 비례를 보이고 있다. 이는 개환되는 양이 많으면 많을수록 거대분자가 형성된다는 것을 의미한다. 분자량 확인을 위한 점도측정 결과는 Table 1에 나타내었다. 점도 결과로 보아 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다. 먼저 70 °C에서 실시한 시간에 따른 개환율 실험에서 시간 경과에 따라 고분자 사슬 길이는 증가하지만 60분 후에는 고분자 분자량이 크게 변화하지 않음을 알 수 있다. 용매에 녹아 있는 경우, 아세트산은 거대분자를 형성하도록 도와주지만, 다

른 유기 용매는 분자량이 증가하는 것을 방해하고 있다. 반면 비용매인 물에서의 점도가 DMSO나, 벤젠의 경우보다 큰 이유는 아마 물에 녹지 않은 알파 리포산의 분자간 거리가 DMSO나 벤젠보다 가까워 충돌할 수 있는 알파 리포산이 주위에 많은 탓으로 사료된다. 아세트산(1:1wt)에 녹아 있는 알파 리포산에 자외선을 가하게 되면 더욱 더 긴 분자가 형성이 됨을 알 수 있다. 이는 자외선의 흡수 순서가 5환 내 이황 결합(S-S)이 가장 우선시 되기 때문일 것이다. 5환의 개환 후 생성된 자유 라디칼들은 개시제 역할을 하여 남아 있는 알파 리포산과 반응하여 고분자를 형성할 수도 있으며, 또는 어느 정도 결합된 고분자 말단에 있는 라디칼과 반응하여 리포산 단량체가 하나 더 추가될 수도 있을 것이다.

이상의 결과들을 바탕으로, 알파 리포산을 단량체로 이용한 생체 고분자 물질의 중합이 가능하다는 것을 알 수 있으며, 특히 충분한 온도와 시간 조건에서 적절한 용매의 선택을 통해 손쉽게 고분자 물질을 얻어 낼 수 있음을 알 수 있다. 다만, 고분자의 분자량 분포가 넓은 특징은 약물 전달체나 생체 재료 이용시 단점으로 작용할 가능성이 높아 향후 개선해야 할 부분으로 사료된다. 분자량 분포가 넓은 것은 중합된 고분자의 생 분해성과 연결되는 특징일 수도 있어 향후 연구가 필요한 부분이다.

결 론

알파 리포산의 개환은 여러 변수가 중요하였으나, 그 중 자외선, 압력, 수분보다는 온도에 가장 민감하게 반응함을 알 수 있었다. 개환율은 열에너지가 가하였을 경우에는 60%를 넘지 않았다. 자외선은 개환에 미미한 효과를 주는 것으로 확인되었고, 고체상의 알파 리포산에서는 결정 표면에만 효과를 주는 것으로 판단된다. 하지만 알파 리포산이 녹아있는 환경이 수소 농도가 높고, 녹는 점 이상의 조건에서 자외선을 가해지게 되면 알파 리포산의 고리는 더욱 많이 파괴됨을 알 수 있었다. 고분자 수율 측정 및 점도 측정의 결과 개환은 바로 고분자로 이어지는 것으로 보이며, 또한 개환율이 커짐에 따라서 분자량 또한 증가함을 알 수 있었다. 하지만 이들 분자량 분포는 매우 넓음이 확인되었다. 60%의 개환율을 보인 결정성 고분자의 유리전이온도는 10 °C였다. 이들 결과들은 약물로 사용되었던 알파 리포산을 단량체로 이용하여 추후 생체 적합성 연구결과가 이뤄지게 되면 새로운 생체 고분자 물질을 합성하는 것이 가능하다는 것을 보여준다.

감사의 글 : 이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다. 또한 박철호는 서울특별시에서 제공한 서울과학장학금에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. R. M. Cicchillo and S. J. Booker, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2860 (2005).
2. S. J. Booker, *Chemistry & Biology*, **11**, 10 (2004).
3. J. Fuches, L. Parker, and G. Zimmer, *Lipoic Acid in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997.
4. A. Bilska and L. Wlodek, *Pharmacological Reports*, **57**, 570 (2005).
5. M.-S. Kim, J.-Y. Park, C. Namkoong, P.-G. Jang, J.-W. Ryu, H.-S. Song, J.-Y. Yun, I.-S. Namgoong, J. Ha, I.-S. Park, I.-K. Lee, B. Viollet, J. H. Youn, H.-K. Lee, and K.-U. Lee, *Nature Medicine*, **10**, 727 (2004).
6. G. Ph. Biowenga, G. R. M. M. Haenen, and A. Bast, *Gen. Pharmac.*, **29**, 315 (1997).
7. S. Roy and L. Parker, *Biofactors*, **8**, 17 (1998).
8. S. M. Bachrach, J. T. Woody, and D. C. Mulhearn, *J. Org. Chem.*, **67**, 8983 (2002).
9. R. Singh and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6304 (1990).
10. J. A. Barltrop, P. M. Hayes, and M. Calvin, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4348 (1954).
11. Y. Nambu, M. H. Acar, T. Suzuki, and T. Endo, *Makromol. Chem.*, **189**, 495 (1988).
12. R. C. Thomas and L. J. Reed, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6148 (1956).
13. J. Houk and G. M. Whitesides, *Tetrahedron*, **45**, 91 (1989).