

Ascorbic Acid 가 Carboxyhemoglobin 의 解離速度恒數에 미치는 影響

沈 吉 淳*

(Received September 1, 1964)

Kil Soon Sim: Influence of Ascorbic Acid on Velocity Constant
of Carboxyhemoglobin Dissociation.

Author has determined the dissociation velocity constant of carboxyhemoglobin in cattle blood solution by addition of ascorbic acid at 36~38°. It was found that these kinetic data are concordant with Roughton's equation $\frac{d[\text{COHb}]}{dt} = \frac{m'[\text{CO}][\text{O}_2\text{Hb}]}{[\text{O}_2]} - m[\text{COHb}]$ and that the dissociation velocity constant of carboxyhemoglobin was accelerated by the presence of ascorbic acid from 0.119 to 0.135

우리나라에 있어서 最近 家庭, 事務所, 工場, 學校 等 熱源으로 煉炭의 使用이 必要不可缺한 實情에 놓여 있다.

이 境遇에 副生하는 一酸化炭素에 依한 中毒으로 말미아마 數많은 人命이 被害를 입어 왔으며, 이에 關하여 많은 研究 檢討가 加하여져 왔다.

一酸化炭素에 依한 中毒에 關한 研究에 있어서 그 豫防措置 및 除毒方法은 從來 다음과 같이 三大別할 수 있다. 卽

1) 煉炭燃燒時 一酸化炭素의 發生을 完全히 抑制하거나 또는 化學的으로 酸化促進劑를 添加하여 一酸化炭素發生을 可及的으로 減少시키는 方法.

2) 暖爐의 構造改造나 或은 環境衛生的인 條件을 室內에 具備하는 等 一酸化炭素가 發生하여도 室內逸散 또는 潛入을 防止하여 人體內의 吸入을 防止하는 方法.

3) 人體內에 吸入되었을 境遇, 이를 迅速히 解毒시키는 方法, 卽 藥劑의 投與에 依하거나 또는 高壓酸素吸入等을 들 수 있다.

Breckenrigde¹⁾, Fruton²⁾ 및 Hawk³⁾ 等의 報告에 依하면, 一酸化炭素가 酸素에 比하여 hemoglobin 과의 結合能이 約 200 倍나 強하므로 生體가 一酸化炭素를 吸入하면 急速히

* College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

carboxyhemoglobin(COHB)을 形成하여 血中酸素含量을 低下시킴으로서 所謂 isotonic anoxemia 를 誘發시킬뿐만 아니라 一酸化炭素는 electron transfer chain 系酵素의 하나인 cytochrome a₃ 分子中의 鐵과 큰 親和力을 가지고 있으므로 一酸化炭素는 cytochrome a₃ 의 還元型(Fe⁺⁺)과 結合하여 Fe⁺⁺→Fe⁺⁺⁺+e⁻의 反應過程을 抑制하게 되고 electron transfer chain(cytochrome a₃ 의 還元型이 cytochrome c의 酸化型을 還元시킴)內의 電子移動을 阻害하고 組織에 있어서의 cytochrome 이 關與하는 酸化還元系反應의 機能을 阻止하게 된다고 報告하였다.

權, 韓⁴⁾ 등은 棟炭燃焼中의 一酸化炭素 및 亞黃酸 gas 의 除去法에 關하여 報告한바 있다.

Clark^{5,6)} 및 金^{7,8)} 등은 一酸化炭素에 對한 生體耐力에 關한 研究과 急性 一酸化炭素中毒의 生理學的變化에 對하여 報告하였고, 呂^{9,10)} 는 一酸化炭素中毒의 解毒에 對한 措置로서 高壓 高濃度의 酸素吸入이 有效하다고 報告하였다.

Sendrog 및 Van Slyke¹¹⁾ 는 carboxyhemoglobin 의 結合能이 oxyhemoglobin(O₂Hb)의 結合能의 210 倍라고 報告하였다.

Roughton^{12,13)} 은 human blood 및 sheep blood 를 使用하여 CO+O₂Hb⇌O₂+COHB 反應의 kinetics 를 報告하였다. 卽 이 反應은

$$\frac{d[\text{COHB}]}{dt} = \frac{m'[\text{CO}][\text{O}_2\text{Hb}]}{[\text{O}_2]} - m[\text{COHB}] \dots \dots \dots \textcircled{1}$$

의 式에 따른다는 것을 立證하였고, 또한 結合反應의 速度恒數(m')를 測定하였으며 Sendrog 및 Van Slyke 值(M) 210 으로부터 解離速度恒數(m)를 算出하였다.

$$m = \frac{m'}{M} = \frac{21}{210} = 0.1$$

또한 Killick¹⁴⁾ 는 酸素 및 一酸化炭素의 hemoglobin 과의 結合能에 있어서 動物의 種차가 없다고 報告하였다.

Burberg¹⁵⁾ 는 光線이 carboxyhemoglobin 에 미치는 影響에 對하여 報告하였다.

그러나 現在까지 第三物質에 依한 解離에 關하여서는 別로 報告된바 없고, 特히 動力學的 見地에서의 報告는 全無하였으므로 著者は ascorbic acid 가 生體內에서 酸化還元에 關與한다는 點에 着眼하여 ascorbic acid 가 CO+O₂Hb⇌O₂+COHB 反應의 kinetics 에 미치는 影響을 究明코져 本研究에 着手하여 新知見을 얻었기에 이에 報告한다.

實 驗

實驗方法

1. Hemoglobin 源. — a) Cattle blood: 新鮮한 cattle blood(凝固防止劑로서 sodium citrate 5%添加)를 使用하였음.

b) Cattle hemoglobin: Difco Laboratory 製品

2. Ascorbic acid. — E. Merck 社製品

3. 一酸化炭素生成. — 100° 로 加熱한 攪拌裝置에서 黃酸과 蟻酸을 反應시켜서 만들었다.

4. Carboxyhemoglobin 生成. — Hartridge Roughton's apparatus^{12,13)} 를 使用하였다(Fig.1).

두 反應液 卽 一酸化炭素로 飽和된 Ringer solution 을 硝子瓶 A(2.5J)에 넣고, cattle blood solution(또는 cattle hemoglobin solution)을 硝子瓶 B(2.5J)에 넣고, 두 구멍을 뚫은 고무栓

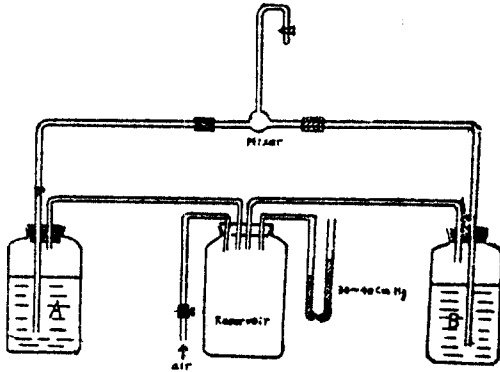


Fig. 1.—Hartridge Roughton's Apparatus

後 5 分間 振盪하여 一酸化炭素를 飽和시킨다.

ii. Cattle blood solution 및 cattle hemoglobin solution 의 調製. — Cattle blood solution 은, 잘 乾燥한 瓶B 에 2,000 ml 의 溫蒸溜水를 加하고 5 分間 36~38° 의 恒溫下에서 振盪하면서 酸素를 飽和시킨後 30~50 ml 의 cattle blood 를 加하여 잘 混合한다. cattle hemoglobin solution 도 同一한 方法으로 cattle hemoglobin 0.144 mM 濃度로 하였다.

iii. 各 溶液中의 酸素 및 一酸化炭素含量. — 檢液 5 ml 에 對하여 Van-Slyke manometric blood gas apparatus¹⁷⁾ 에 依하여 測定하였다.

iv. Blood solution 中의 hemoglobin 濃度. — Sahli¹⁸⁾ 法에 依하여 測定하였다.

5. Carboxyhemoglobin 의 解離速度測定. — i. (4)의 carboxyhemoglobin 生成液(cattle blood solution 또는 cattle hemoglobin solution)에 一定時間酸素(30~40cm 水銀壓을 利用)를 注入시킨後 spectrophotometer(Beckman D.U.)로 最大吸收波長 420 mμ 에서 殘存 carboxyhemoglobin 量을 測定하였다.

이 測定을 各各 20 回式 實施하여 그 平均値를 取한다.

ii. 한편 各種濃度의 ascorbic acid²⁰⁾(0.4mg/dl, 0.8mg/dl, 1.2mg/dl, 2.0mg/dl)가 含有된 carboxyhemoglobin 生成液(cattle blood solution)에 對하여서도 同一한 方法으로 測定하였다.

iii. ascorbic acid 0.4 mg/dl, 1.2 mg/dl 가 各各 含有된 cattle hemoglobin solution 의 carboxyhemoglobin 生成液에 對해서도 同一한 方法으로 測定하였다.

本實驗은 全部 36~38° 에서 行하였고 모든 裝置와 觀察은 이 溫度를 維持하는 溫室¹⁵⁾에서 行하였다.

算出方法

i. CO + O₂Hb → O₂ + COHb 反應의 kinetics. — Roughton 의 式 ①에서 m[COHb]는 negligible 임으로 다음式이 된다.

$$\frac{d[\text{COHb}]}{dt} = \frac{m'[\text{CO}][\text{O}_2\text{Hb}]}{[\text{O}_2]} \dots\dots\dots ②$$

따라서

$$\frac{dY}{dt} = \frac{m'[\alpha - Y][\beta - Y]}{\gamma + Y - \beta} \quad \text{③}$$

但 α : 溶液中의 一酸化炭素의 全濃度(mM) 卽 $[\text{CO}] + [\text{COHb}]$

β : 溶液中의 모든 形態의 hemoglobin 濃度(mM) 卽 $[\text{COHb}] + [\text{O}_2\text{Hb}]$

γ : 溶液中의 酸素의 全濃度(mM) 卽 $[\text{O}_2] + [\text{O}_2\text{Hb}]$

Y : carboxyhemoglobin 濃度(mM) 卽 $[\text{COHb}]$

③式을 時間 t 로 積分하면

$$m'(t_1 - t_2) = \frac{\beta - \alpha - \gamma}{\alpha - \beta} \ln \frac{\alpha - Y_1}{\alpha - Y_2} + \frac{\gamma}{\alpha - \beta} \ln \frac{\beta - Y_1}{\beta - Y_2} \quad \text{④}$$

但 t_1 : 初時刻 t_2 : 終時刻

Y_1, Y_2 는 各各 t_1, t_2 때의 carboxyhemoglobin 의 濃度

ii. 逆反應 $\text{O}_2 + \text{COHb} \rightarrow \text{CO} + \text{O}_2\text{Hb}$ 의 Kinetics. — 이 反應은 ①式에 依하여 다음式으로 表示된다.

$$\frac{d[\text{COHb}]}{dt} = -m[\text{COHb}] \quad \text{⑤}$$

⑤式을 時間 t 로 積分하면

$$m(t_2 - t_1) = \ln \frac{[\text{COHb}]_1}{[\text{COHb}]_2} \quad \text{⑥}$$

但 $[\text{COHb}]_1, [\text{COHb}]_2$ 는 各各 t_1, t_2 때의 carboxyhemoglobin 의 濃度

$$\therefore m(t_2 - t_1) = 2.303 \log \frac{[\text{COHb}]_1}{[\text{COHb}]_2} \quad \text{⑦}$$

$$\therefore m = \frac{2.303}{t_2 - t_1} \log \frac{[\text{COHb}]_1}{[\text{COHb}]_2} \quad \text{⑧}$$

實驗成績 및 考察

cattle blood solution 및 ascorbic acid 0.4 mg/dl, 0.8 mg/dl, 1.2 mg/dl, 2.0 mg/dl 를 各各 添加한 cattle blood solution 의 m 를 ⑧式에 依하여 算出하여 Table I 및 Fig.2 에 表示했다.

TABLE I. — Velocity Constants of Carboxyhemoglobin Dissociation in Cattle Blood solution
 $\alpha = 0.126mM, \beta = 0.072mM, \gamma = 0.742mM$ (36~38°)

Reaction Time (sec.)	0		0.4		0.8		1.2		2.0	
	COHb (%)	m	COHb (%)	m	COHb (%)	m	COHb (%)	m	COHb (%)	m
0	99.5		99.5		99.5		99.5		99.5	
5	55.1	0.118	49.9	0.138	50.7	0.135	50.4	0.136	51.4	0.132
10	31.8	0.110	25.8	0.132	25.2	0.140	26.7	0.127	25.6	0.139
15	16.8	0.128	12.8	0.140	13.0	0.132	12.9	0.146	12.4	0.145
20	9.2	0.120	6.8	0.125	6.6	0.136	6.5	0.137	6.6	0.126
25	5.0	0.122	3.4	0.139	3.3	0.139	3.4	0.129	3.3	0.139
30	2.8	0.116	1.7	0.138	1.7	0.132	1.7	0.138	1.7	0.132
M	.	0.119		0.135		0.135		0.135		0.135
S.D.	.	0.0055		0.0053		0.0032		0.0063		0.0062

α : Total concentration of CO

β : Total concentration of hemoglobin

γ : Total concentration of O_2

M: Mean value

S.D.: Standard Deviation

cattle hemoglobin solution 및 ascorbic acid 0.4 mg/dl, 1.2 mg/dl 를 각각 含有하는 cattle hemoglobin solution 의 m 은 Table I 및 Fig. 3에 表示되었다.

本實驗의 data(Table I, II)는 모두 ⑤式과 ⑧式을 滿足시킨다는 것을 立證하고 있다.

cattle blood solution(ascorbic acid 不添加)에 있어서의 carboxyhemoglobin 解離速度恒數 m 의 平均値는 0.119(Table I)이다.

ascorbic acid 0.4mg/dl, 0.8mg/dl, 1.2mg/dl, 2.0mg/dl 를 각각 添加한 cattle blood solution 에서의 解離速度恒數는 ascorbic acid 添加量에 關係없이 거의 一定하며 그의 平均値는 0.135 (Table I)이다.

TABLE II.—Velocity Constants of Carboxyhemoglobin Dissociation in Cattle Hemoglobin Solution
 $\alpha=0.126mM$, $\beta=0.072mM$, $\gamma=0.742mM$ (36~38°)

Addition of ascorbic acid (mg/dl)	0		0.4		1.2	
	COHb(%)	m	COHb(%)	m	COHb(%)	m
Reaction Time (sec.)						
0	99.5		99.5		99.5	
5	56.5	0.113	56.8	0.112	56.5	0.113
10	32.1	0.113	32.0	0.115	32.0	0.114
15	17.8	0.118	17.8	0.117	17.8	0.117
20	10.1	0.113	10.0	0.115	10.1	0.113
25	5.7	0.114	5.6	0.116	5.7	0.114
M		0.114		0.115		0.114
S.D.		0.0019		0.0017		0.0015

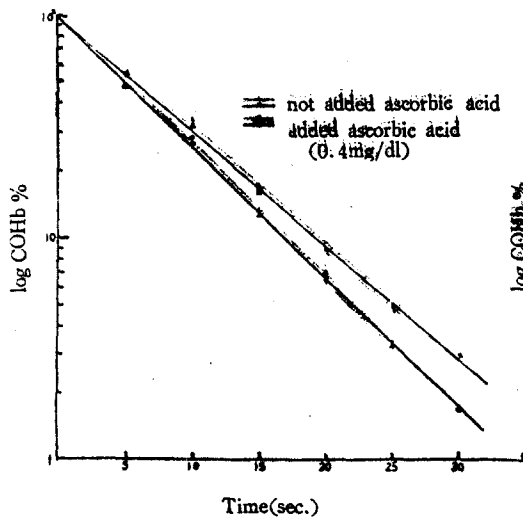


Fig. 2. Relation Between Time and Dissociation Rate of COHb in Cattle Blood Solution

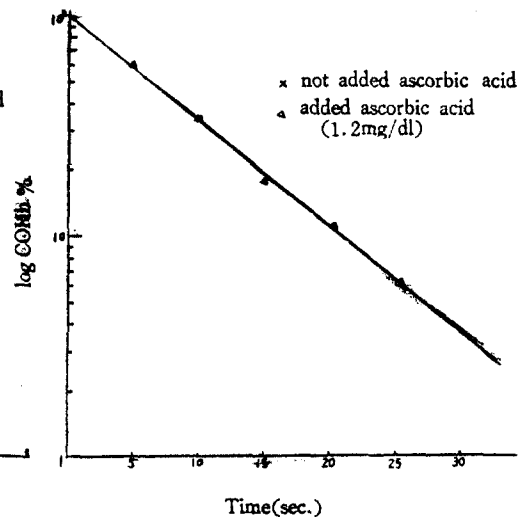


Fig. 3. Relation Between Time and Dissociation Rate of COHb in Cattle Hemoglobin Solution

carboxyhemoglobin 解離速度恒數의 ascorbic acid 不添加時平均値와 添加群의 平均値 사이에 統計的으로 有意한 差가 있음을 알았다. 이것은 ascorbic acid 濃度에 關係없이 carboxyhemoglobin 의 解離를 促進시킨다는 것을 立證하고 있다.

cattle hemoglobin solution (ascorbic acid 不添加)에 있어서의 m 의 平均値는 0.114이고(Table II), ascorbic acid 0.4 mg/dl, 1.2 mg/dl를 各各 含有하는 cattle hemoglobin solution 의 m 의 平均値는 各各 0.115, 0.114이다(Table II).

이들의 m 의 值(0.114, 0.115, 0.114)間에는 有意한 差를 認定할 수 없다. 卽 이것은 ascorbic acid 가 hemoglobin 以外의 血液成分을 含有치 않는系에서는 carboxyhemoglobin 의 解離反應에 關與하지 않는다는 것을 示唆하고 있다.

cattle blood solution 의 m 의 值, 卽 0.119와 cattle hemoglobin solution 의 m 의 值, 卽 0.114 間에는 有意한 差가 있다. 卽 이와 같은 差는 cattle blood 中에 있는 各種 enzyme 等の factor 에 依한다고 思料된다.

cattle blood solution 및 cattle hemoglobin solution(carboxyhemoglobin 不含有)에 ascorbic acid 0.4 mg/dl, 0.8 mg/dl, 1.2 mg/dl 2.0 mg/dl를 各各 添加하여 spectrophotometer 로 測定한 結果, 吸光度에는 아무런 變動이 없었으므로 本實驗에 있어서는 ascorbic acid 가 cattle blood solution 에 아무런 影響을 끼치지 않았다.

이와 같이 ascorbic acid 는 cattle hemoglobin solution 에는 何等의 作用이 없고, cattle blood solution 에 있어서의 carboxyhemoglobin 의 解離反應에 作用한다는 것은 cattle blood 中에 있는 各種 enzyme 等の factor 에 對하여 ascorbic acid 가 그 活性度를 높여 주는 것으로 思料된다.

結 論

1. 牛血液 中에서의 carboxyhemoglobin 解離速度恒數 및 이에 미치는 ascorbic acid 添加의 影響을 測定하였다.
2. 牛血 hemoglobin 溶液 中에서의 carboxyhemoglobin 解離速度恒數 및 이에 미치는 ascorbic acid 添加의 影響을 測定하였다.
3. 上記 1, 2, 의 解離速度는 Roughton 의 式을 滿足시킨다.
4. ascorbic acid 의 添加는 血液溶液 中에서는 解離速度에 促進시키는 影響을 주나, hemoglobin 溶液 中에서는 影響을 주지 않는다.
5. ascorbic acid 添加가 牛血液 中의 carboxyhemoglobin 解離速度에 미치는 影響은 添加量에 無關하다.
6. 以上의 知見으로 보아 ascorbic acid 의 carboxyhemoglobin 解離에 미치는 作用은 觸媒의 이며, carboxyhemoglobin 解離反應에 觸媒的으로 關與하는 hemoglobin 以外의 血液成分을 活性化시키는 것으로 思料된다.

本研究을 遂行함에 있어서 懇曲한 助言과 指導를 아끼지 않으신 서울大學校 韓龜東, 洪文和 兩教授와 延世大學校 李吉相 教授에게 深謝하며 實驗에 協助하여준 洪恩茂教授, 朴大成講師에 感謝한다.

REFERENCES

1. B. Breckenridge, *Am. J. Phy.*, 173, 61 (1953)
2. J. S. Fruton, *General Biochemistry 2nd Ed.*, 349(1959) Wiley and John Co, New York

3. P. S. Hawk, B. L. Oser and W. H. Summerson, *Practical Physiological Chemistry 13th Ed.*, 318 (1954) McGraw Hill Co, New York
4. 權利默・韓相準, 韓國文化研究院論叢, 2, 197 (1960)
5. T. Robert, and J. R. Clark, *Am. J. Phy.*, 162, 560 (1950)
6. T. Robert, and J. R. Clark, *Am. J. Phy.*, 169, 285 (1952)
7. 金玉在, 急性一酸化炭素中毒の生理學的研究 (1964)
8. 金玉在, *R.O.K.A.F., J. Aviation Med.*, 8, 1 (1960)
9. 呂卿九, 서울醫大雜誌, 4, 305 (1963)
10. 呂卿九, 서울醫大雜誌, 4, 313 (1963)
11. J. Sendrog, S. H. Liu and D. D. Van-Slyke, *Am. J. Phy.*, 90, 511 (1929)
12. F. J. W. Roughton, *Am. J. Phy.* 143, 609 (1945)
13. F. J. W. Roughton, *Proc. Roy Soc., B*, 115, 451. 464. 473 (1934)
14. E. Killick, *J. Phy.*, 127, 47 (1955)
15. R. Burberg, *Zeitschrift für Naturforschung*, 10, 503 (1955)
16. H. J. Hartridge and F. J. W. Roughton, *Proc. Roy. Soc. A*, 104, 376 (1923)
17. 氏岡正行, 日本衛生化學會誌, 10, 72 (1938)
18. 上田, 武田, 龜田, 臨床検査法, 227 (1960)
19. 松原高賢, 鐵と血色素 (1963), 南江堂, 東京
20. 日本藥學會, 衛生試驗法註解, 175 (1966) 金原出版社, 東京