

광용혈에 대한 Ketocarotenoids의 현저한 세포 보호작용에 관한 연구

朴秀男 ·李大衡 ·李泰寧

(太平洋技術研究所 · 서울大學校)

I. 서론

식물·동물·미생물계에 다양하게 분포된 카로티노이드는 그 화학적 성질이나 구조뿐 아니라 생물학적 생리학적 중요성으로 말미암아 일찍부터 많은 화학자들의 관심의 대상이 되어 왔다.(P.Karrer and E. Jucker, 1948)

이러한 카로티노이드들의 역할에 대해서는 광합성의 보조색소로서의 기능, 생물학적 기능과 카로티노이드중 일부의 것이 Vitamin A 활성을 가짐으로 인한 영양학적 면에서 주목되었다.

그러나 1955년 Stanier 등에 의해 식물 및 광합성 균류중의 광합성 조직에 카로티노이드가 널리 존재하는 것은 chlorophyll이나 bacteriochlorophyll이 촉매로 작용하여 일어나는 photodynamic destruction으로 부터 세포를 보호하기 위함이라는 가설(R.Y. Stanier et al, 1955)이 제창된 후, 카로티노이드의 생체보호작용에 대한 관심이 높아 왔다.

카로티노이드의 생체보호 메카니즘에 대해서는 삼중항 상태의 증감제에 대한 quenching, 1O_2 의 quenching, free radical reaction의 inhibition 등이 있음이 Krinsky에 의해 제안된 바 있다(N. I. Krinsky, 1982). Krinsky는 카로티노이드의 생체 보호 메카니즘을 전자전달 메카니즘인 Type I과 singlet oxygen을 생성하는 에너지 전달 메카니즘인 Type II가 관여할 가능성을 고려하여 보고하고 있다.

생체내에서 생성되는 organic free radical 및 활성 산소종인 singlet oxygen(1O_2) hydroxy radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2), superoxide anion radical($O_2^{\cdot -}$) 등은 세포막의 손상, 막지질의 peroxidation을 비롯하여 단백질, 핵산, 탄화수소등 생체 고분자 물질의 파괴에 관여하여 세포의 손상, 돌연변이 유발, 발암, 조직의 노화등의 원인이 된다고 알려져 있다(B.E. Leivovitz and B.W. Siegel, 1980; C.S. Foote, 1982; N.I. Krinsky, 1979).

또한 최근에는 여성과 화장품 메이커의 최대 고민중 하나인 안면의 이상색소 침착증, 주

를 및 각종 염증성 피부질환이 활성산소종과 밀접한 관계가 있고 또한 oxygen radical이 멜라닌 형성반응을 급속히 증가시킨다는 연구보고도 있다. (Y.Niwa, 1986)

이들 활성 산소종 1O_2 은 광합성이나 high energy 조사라는 특수한 환경아래서뿐 아니라 생체내에서 superoxide anion radical을 거쳐 효소반응으로 생성될 수 있음은 물론, 백혈구의 식균작용 (N.I.Krinsky 1982)이나 면역학적인 자극 (S.J.Klebanoff, 1980)에 의해서도 생성되어 조직의 염증, 세포막의 산화적 변질등에 관여함이 최근에 밝혀지고 있다.

한편 생체에 대한 1O_2 의 유해한 반응성이 인식되자 Foote 등은 β -carotene이 1O_2 을 효과적으로 quenching 시킴을 관찰하고 (C.S.Foote and R.W.Denny, 1968) 그 후 여러 가지 카로티노이드들이 나타내는 1O_2 에 대한 quenching rate(k_q)가 측정 보고 되고 있다. 즉, lycopene과 β -apo-8'-carotenal의 1O_2 에 대한 quenching rate(k_q)를 비롯하여 (C.S.Foote et al. 1970 a) all-trans retinal, lutein, β -carotene, synthetic C₃₀, C₃₅, C₅₀, C₆₀ 카로티노이드의 값을 구해, 이로부터 카로티노이드의 1O_2 quenching activity는 이중결합의 conjugation수와 관련이 있음이 제안된 바 있다 (C.S.Foote, Y.C.Chang and R.W.Denny, 1970 b).

본 연구실에서는 전복 (*Haliotis discus hannai*)의 내장중에서 lipoprotein과 결합하고 있는 카로티노이드는 먹이의 pattern을 반영하는 다양한 카로티노이드의 분포와는 달리 비교적 짧은 사슬의 지방산인 lauric 및 myristic acid의 lutein ester형이 많음이 관찰되고 (T.Y.Lee, D.H.Lee and S.N.Park, 1984) 이러한 lutein의 지방산 ester는 in vitro에서는 1O_2 의 quenching activity에 있어서 lutein과 큰 차가 없었으나 in vivo에서는 차이가 있을 가능성이 있다고 시사한 바가 있다. (S.N.Park, T.Y.Lee, 1984)

또한 새우 (*Trachypenaeus curvirostris*)의 껍질 carotenoid인 astaxanthin과 그 ester사이의 1O_2 quenching activity 차이도 in vitro에서는 없음을 밝힌바 있다 (S.N.Park, T.Y.Lee, 1984).

그리고 canthaxanthin과 그의 환원형인 4-hydroxy-4'-keto- β -carotene, 4,4'-dihydroxy β -carotene 사이에는 화학구조와 활성도간의 관계를 고찰할때 carbonyl기는 1O_2 의 quenching activity에 영향을 미치나 hydroxy기는 별로 관계가 없음을 보고하였다.

본 연구에서는 고추 (*Capsicum annuum*)의 특유한 카로티노이드인 capsanthin과 그 esters, 미역 (*Undaria Pinnatifida*) 등의 갈조류에 널리 분포되어 있는 fucoxanthin, 그리고 수박의 주 색소인 lycopene 등을 대상으로 1O_2 에 대한 quenching rate를 구하여 그 구조와의 관계를 검토하였고, 적혈구 세포에 대한 광용혈 정도를 측정함으로써 세포막에 대한 이들 카로티노이드들의 보호작용을 구조와 관련하여 1O_2 quenching rate constants를 비교 검토하였다.

본 연구에 사용한 카로티노이드들의 구조는 Fig.1와 같다.

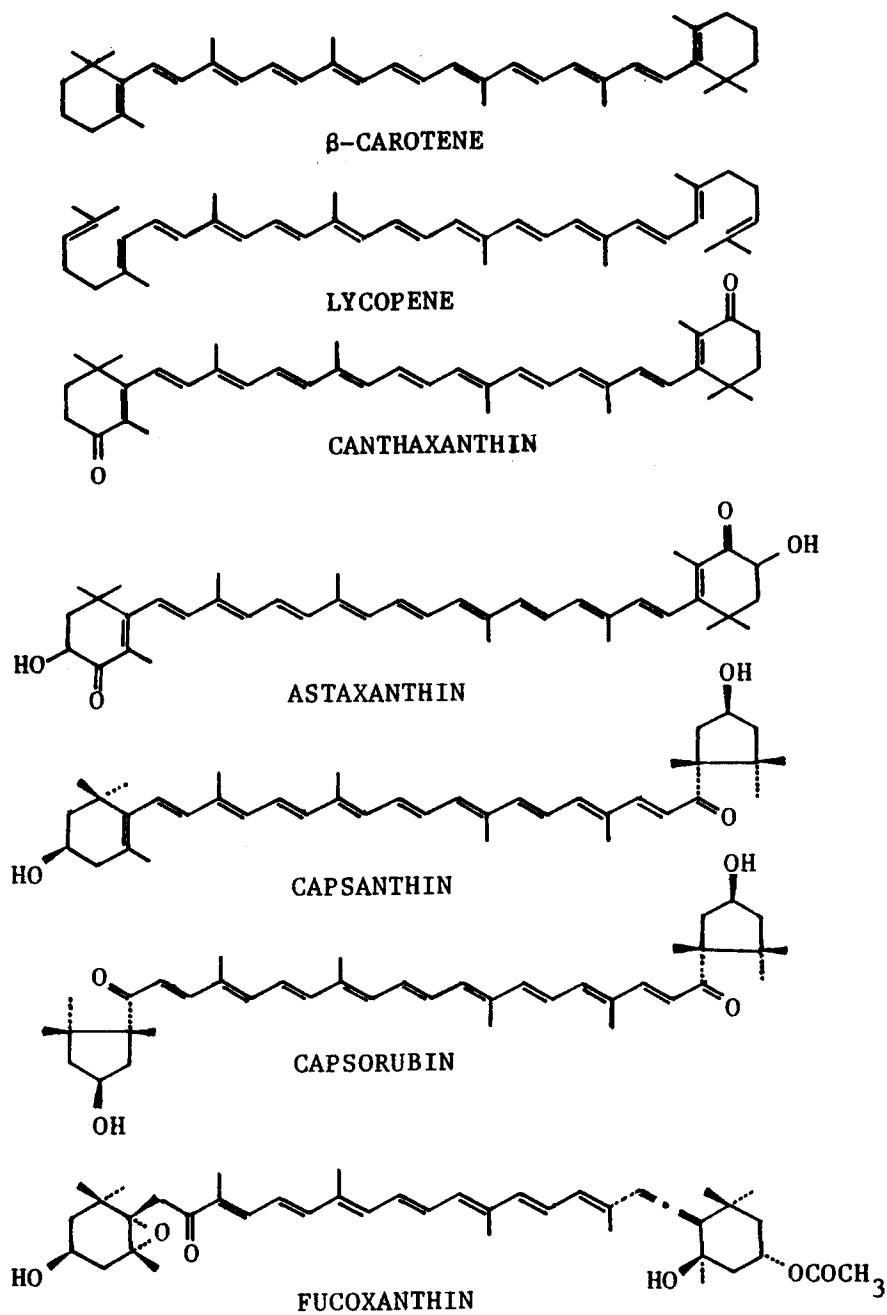


Fig. 1. Structure of carotenoid pigments used in the quenching studies of $^1\text{O}_2$.

II. 실험

1. 사용기기 및 시약

가시부 전자 흡수스펙트럼은 Varian Techtron Model 635 UV-Visible spectrophotometer를 사용하여 얻었으며 photo-oxygenation 반응시 광원은 300 W, 82 V tungsten lamp를 사용하였다. 단색광은 Bausch and Lomb사의 high intensity monochromator (1,350 grooves/mm, 300nm braze)를 통해 얻었다. 카로티노이드의 분리에 사용한 TLC판은 Merck제 silica gel G60이 0.2mm 두께로 precoat된 알루미늄판이었다. 시료의 추출 및 전개에 사용한 n-헥산, 에틸에테르, 아세톤, 디클로로메탄 등은 모두 실험에서 분별 증류를 통해 재 정제하였으며 기타 특별히 언급하지 않는한 시약은 시판 일급 시약을 그대로 사용하였다. Photo-oxygenation에 사용한 메탄올은 실험실에서 재증류하였고 벤젠은 Kanto chemical Co. 일급 시약을 P₂O₅로 처리한 후 증류하여 사용하였다. 1,3-Diphenyl isobenzofuran (DPBF)는 메탄올에서 재결정한 것을 썼으며, rose bengal은 Aldrich 제품을 그대로 사용하였다.

2. 재 료

β -carotene은 일본 Wako사 제품을 Ca(OH)₂로 충전한 column으로 분리하여 사용하였으며, capsanthin 및 그 에스터들은 1984년 9월초 시중에서 구입한 종류미상의 붉은 고추에서 추출, 정제하였다. Lycopene은 8월말 시중에서 구입한 수박에서, fucoxanthin은 10월초 시중에서 구입한 건미역에서 각각 추출하였다.

3. 실험방법

1) 카로티노이드의 분리

(1) β -Carotene : 일본 Wako chemical Co.의 특급 시약을 Ca(OH)₂로 충전한 column에서 헥산-에틸에테르(10:1) 용매계로 분리한 β -carotene획분을 다시 헥산-에틸에테르(10:1)로 전개한 TLC chromatogram은 Fig.2의 (1)과 같다.

이렇게 분리한 β -carotene 성분의 가시부 흡수 스펙트럼은 n-헥산에서 λ_{max} 가 451, 478 nm였고, 메탄올에서는 433, 451, 480 nm였다. 또한 95% 메탄올-헥산간의 분배시험(F.J.Peracek and L.Zechmeister, 1956)에서는 완전히 헥산층으로 분배하였으며, 에폭시기의 유무를 찾는 에폭시 테스트(P.Karrer and E. Jucker, 1950) 결과는 음성이었다.

(2) Capsanthin 과 그 esters : 고추 과피의 아세톤 전 추출물을 헥산-에틸에테르(2:3)을 사용하여 TLC로 분리한 크로마토그램은 Fig.2의 (2)와 같다. 이중 가시부 흡수스펙트럼에서 capsanthin과 capsorubin의 혼합물로 추측되는 색소띠 3번을 분취, 헥산-에틸에테르(1:8)로 전개하여 두 성분으로 분리하였다. (Fig.2의 (3)).

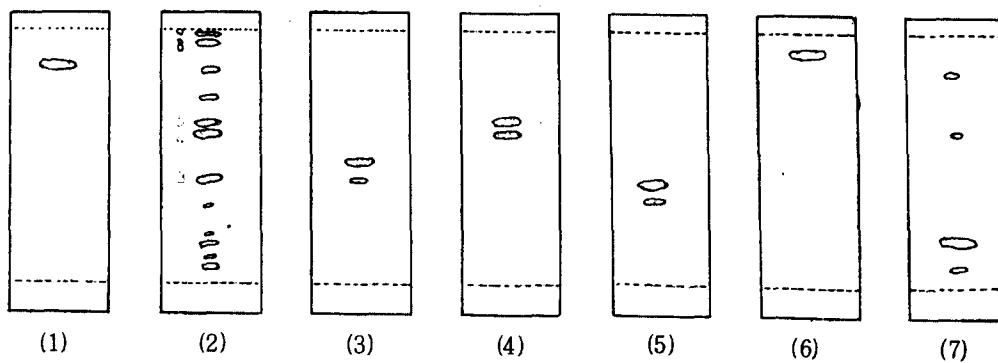


Fig. 2. Thin-layer chromatograms of various carotenoids.

- Solvent system;
- 1) n-hexane-ether = 10:1
 - 2) n-hexane-ether = 2:3
 - 3) n-hexane-ether = 1:8
 - 4) n-hexane-ether = 2:3
 - 5) n-hexane-ether = 4:1
 - 6) hexane
 - 7) methylene chloride-ethyl methyl ketone = 4:1

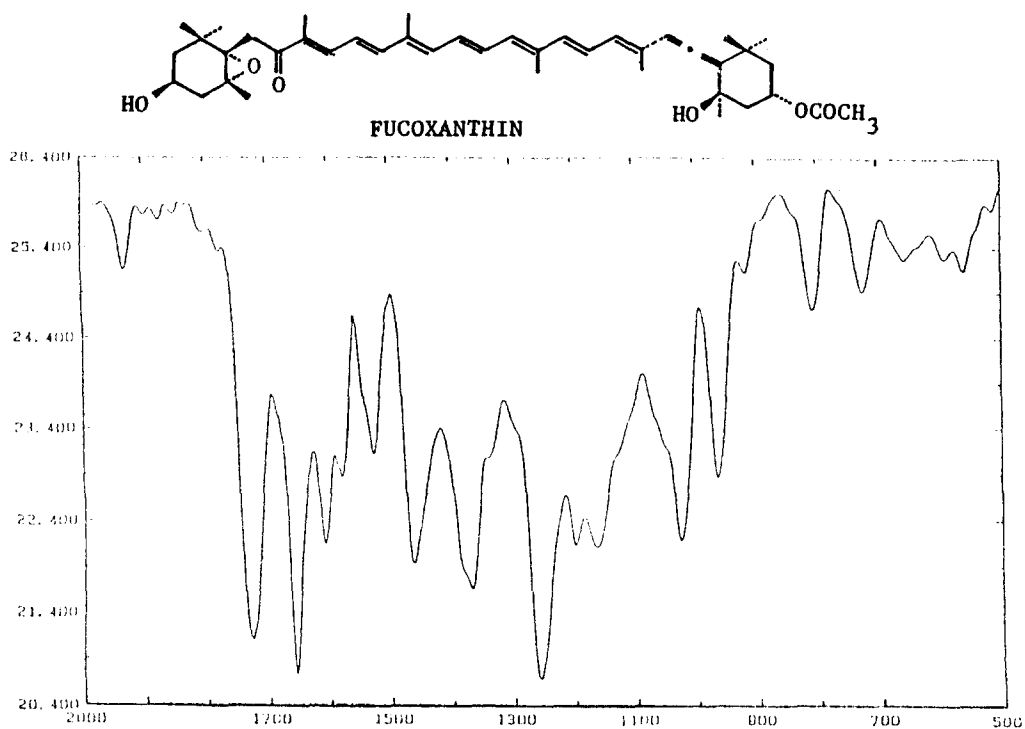


Fig. 3. IR Spectrum of Fucoxanthin Isolated from *Undaria Pinnatifida*

Fig.2의(4)는 capsanthin 과 capsorubin 의 monoester 로 추측되는 색소며 4,5 번을 헥산-에틸에테르 (2:3)으로 전개분리한 것이며, (5)는 capsanthin 과 capsorubin diester 혼합물을 헥산-에틸에테르 (4:1)로 전개한 것이다. Capsanthin 과 그 mono-, diester 는 chromophore 부분이 모두 같기 때문에 가시부 흡수스펙트럼에서 λ_{max} 는 메탄올에서 473nm, 벤젠에서는 486nm로 동일하게 나타났다. 95% 메탄올 헥산간의 분배 시험에서는 95:5의 것은 capsanthin으로, 12:88의 것은 monoester로, 10:90으로 분배된 것은 diester로 추정되었다.

(3) Lycopene :수박의 n-헥산 추출물을 n-헥산을 사용한 chromatogram은 Fig. 2의 (6)과 같다. 가시부 흡수 스펙트럼은 λ_{max} 가 벤젠용매로서는 458, 487, 521nm, n-헥산에서는 444, 472, 503 nm로 나타났으며 분배시험에서는 완전히 헥산층으로 분배되었다.

(4) Fucoxanthin :건미역의 아세톤 추출물을 농축시킨 것을 n-헥산으로 추출하여 chlorophyll을 제거하고, 용매계 methylene chloride-ethyl methyl ketone(4:1)을 사용하여 전개한 chromatogram은 Fig.2의 (7)과 같다. 가시부 흡수스펙트럼에서의 λ_{max} 는 메탄올에서 450nm, 메탄올에서 447nm, 헥산에서는 427, 450, 478 nm였다. Epoxy test 결과는 양성이었으며, 분배시험에서는 하이드록시기가 2개, 카르보닐기, 에폭시기, 에스터기가 각각 한개씩 있어 완전히 95% 메탄올 층으로 분배하였고, IR spectrum은 Fig.3과 같이 1930cm^{-1} 부근에 allene기의 특징적인 피크와 1735cm^{-1} 에 에스터, 1650cm^{-1} 에 conjugated 케톤 피크가 있다.

분리한 각 카로티노이드들의 성질을 정리하면 Table1과 같다.

2) $^1\text{O}_2$ quenching 실험

Photooxygenation의 실험장치는 광원(300W Tungsten lamp)와 monochromator (Bausch and Lomb, 1,350 grooves/nm, 300nm blaze) 및 반응용기로 구성되었다. $^1\text{O}_2$ 의 발생을 위해 광검검체로서 rose bengal을 사용하였으며, 조사광은 메탄올 용액의 경우는 556 nm, 벤젠-메탄올 용액의 경우는 559nm였다. 발생된 $^1\text{O}_2$ 의 검출은 $^1\text{O}_2$ 과 반응에 의한 DPBF의 감소율 측정으로 이루어졌다. DPBF는 $^1\text{O}_2$ 과 physical quenching 없이 정량적으로 반응하여 monomeric peroxide가 생기고 이것이 실온에서 분해하여 0-dibenzoylbenzene을 만든다고 보고되어 있다 (J.G.Calvert and J.N.Pitts Jr, 1966; A.Singh et al, 1968).

반응용기에는 기포발생기를 사용하여 공기를 통과시켰는데, 이때 공기는 반응 용액층의 증발을 보완하기 위해 미리 반응용액과 같은 용매, 즉 메탄올 혹은 벤젠-메탄올이 들어 있는 용기를 거치도록 하였다.

Photooxygenation하는 동안 DPBF의 농도 감소는 DPBF의 흡광도 변화로 관찰하였다. 조사전과 조사후 4분에 메탄올 용액에서는 410 nm, 벤젠-메탄올 용액에서는 413 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 실험에서 rose bengal의 농도는 $6.5 \times 10^{-6}\text{M}$, DPBF

Table 1. The properties of isolated carotenoids.

Pigment	Absorption maxima	Partition ratio in n-hexane-95% MeOH	Epoxy test
β -Carotene	451, 478 (n-hexane) 433, 451, 480 (MeOH)	100:0	negative
Capsanthin	486 (benzene) 473 (MeOH)	5:95	negative
Capsanthin monoester	486 (benzene) 473 (MeOH)	88:12	negative
Capsanthin diester	486 (benzene) 473 (MeOH)	90:10	negative
Lycopene	458, 487, 521 (benzene) 444, 472, 503 (n-hexane)	100:0	negative
Fucoxanthin	450 (EtOH) 427, 447 (MeOH) 450, 478 (n-hexane)	0:100	positive

는 3.25×10^{-6} , 1.95×10^{-5} , 1.3×10^{-5} , 0.65×10^{-6} M, 카로티노이드는 5.0×10^{-6} , 2.5×10^{-6} , 1.5×10^{-6} , 1×10^{-6} M 등으로 조건을 통일시켜 행하였다.

각 카로티노이드의 농도 계산에 사용한 extinction coefficient 는 Table 2 와 같다.

Table 2. Extinction coefficients used in determining pigment concentration

Pigments	Absorption maxima	Extinction coefficient	Solvent
β -Carotene	433, 451, 480	141,000	MeOH
Capsanthin	486	110,000	Benzene*
	473	113,000	MeOH
Capsanthin monoester	486	110,000	Benzene
	473	113,000	MeOH
Capsanthin diester	466	110,000	Benzene
	458, 487, 521	185,000	n-hexane
Lycopene	444, 472, 503	165,000	Benzene
	450	75,000	EtOH*
Fucoxanthin	447	80,000	MeOH

(* J.G. Grasseli, W.M. Ritchey, 1973)

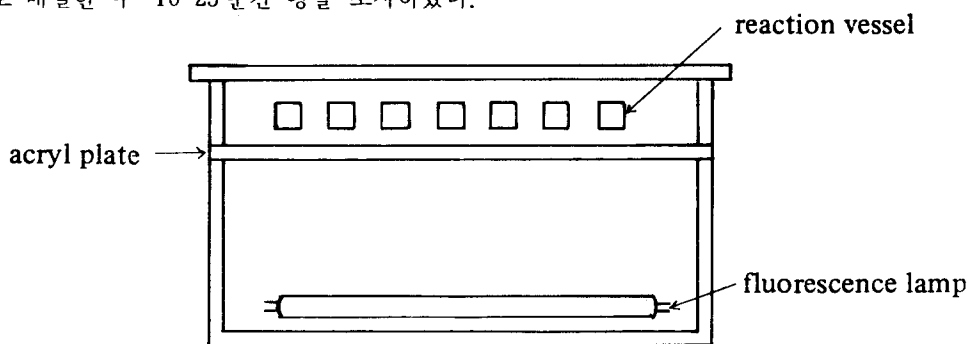
본 실험의 photooxygenation에 관여하는 반응단계는 이미 보고된 반응식을 이용하였다 (S.N.Park, T.Y.Lee, 1984). 이때 Stern-Volmer 식으로 부터 k_q/k_d 를 얻고 이미 알려진 메탄올 용액에서의 k_d 값인 $1.8 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ 을 (R.H.Young et al, 1971) 대입하면 곧 카로티노이드의 quenching rate인 k_q 값을 구할 수 있었다. $S_0/S_q = 1 + (k_q/k_d)(Q)$; Stern-Volmer 식 (“부록”참조)

3) 광용혈 실험

(1) 광조사 장치

광용혈에 사용한 실험장치는 아래 그림과 같다.

반응용기를 30 W 형광등에서 7센티미터 떨어진 아크릴판 위에 형광등과 평행이 되도록 2열로 배열한 후 10-25 분간 광을 조사하였다.



(2) 적혈구의 준비

실험에서 사용한 적혈구는 30세의 건강한 성인 남자로부터 얻었다. 채혈 즉시 EDTA를 넣은 시험관에 넣은 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고 분리한 적혈구는 냉 saline-phosphate buffer (피. 예취 7.4)로 3회 세척하여 원심분리하였다. 여러종류의 buffer 중 phosphate buffer는 oxygen radical 실험에 가장 적합한 것으로 보고되고 있다 (Murrage A. Brown, John K. Raison, 1987). 분리한 적혈구는 4 도씨의 냉장고에 보관하였다가 24 시간 이내에 실험에 사용하였다.

(3) 광용혈에 미치는 carotenoid의 영향에 관한 실험

분리한 적혈구를 0.9% saline-phosphate buffer (피. 예취 7.4) 3.5밀리리터에 현탁시킨 후 에탄올 혹은 DMSO에 녹인 각종 carotenoid를 25-50 μ i 첨가하였다. 30분간 pre-incubation한 후 광증감제인 rose bengal 용액을 0.5밀리리터를 넣고 광을 조사시켰다. 광조사가 끝난 후 post-incubation에 의한 적혈구의 파괴 속도를 15분간격으로 700 nm에서 scattering에 의한 투과광의 감소로부터 구하였다. 각 시료는 3개씩 측정하여 평균하였다.

III. 결 과

1. β -Carotene의 $^1\text{O}_2$ quenching rate

비교를 위해 사용한 β -carotene의 메탄올 용액에서 DPBF 농도에 대한 시간에 따른 DPBF 농도 감소의 그래프는 Fig.4이고, β -carotene의 농도에 대한 S_0/S_q 의 그래프는 Fig.5와 같다. Stern-Volmer 식에 의하여 구한 β -carotene의 k_q 값은 2.36×10^{10}

Table 3. K_q of β -carotene

K_q ($\times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{S}^{-1}$)	Solvent	Quencher
2.36	MeOH	DPBF
2.0	benzene	DPBF (1)
1.3	benzene	DPBF (2)
2.6	CS_2	Anthracene (3)
2.3	benzene-MeOH (3:2)	Rubrene (4)
3.0	freon-113	DPBF (5)

- 1) P.B. Merkel and D.R. Kearns, 1972
- 2) A. Farmilio and F. Wilkinson, 1973
- 3) C.S. Foote et al, 1972
- 4) M.M. Mathew-Roth et al, 1974
- 5) I.B.C. Mathenson et al, 1974

($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)로 다른 연구자들이 구한 값과 비교한 것이 Table3이다. 측정치의 차이는 사용한 quencher의 종류 용매와 원료의 순도 차이에서 유래되는 것이 그 중 큰 원인이 될 것으로 본다.

2. Capsanthin과 그 esters의 quenching rate

메탄올 용액에서 $^1\text{O}_2$ quencher의 농도를 달리했을 때 DPBF의 감소 속도에 미치는 capsanthin과 capsanthin monoester의 영향을 측정된 후, Stern-Volmer 식에 의해 구한 capsanthin의 k_q 값은 $2.29 \times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 이며 capsanthin monoester의 값은 2.23×10^{10} 였다. 모두 β -carotene에 못지 않은 큰 값의 $^1\text{O}_2$ quenching activity를 보여 주었다. 또한 두 카로티노이드의 차이점인 하이드록시 그룹과 에스터그룹 도입에 따른 $^1\text{O}_2$ quenching activity의 차이는 lutein과 그 ester, astaxanthin과 그 에스터에 있어서와 마찬가지로 거의 없음을 보여주고 있다. 벤젠-메탄올에서의 k_d 값은 메탄올 용액에서 측정된 k_d 값과 비교할 수 없다. 각 용매중에서의 $^1\text{O}_2$ life time과 diffusion rate에

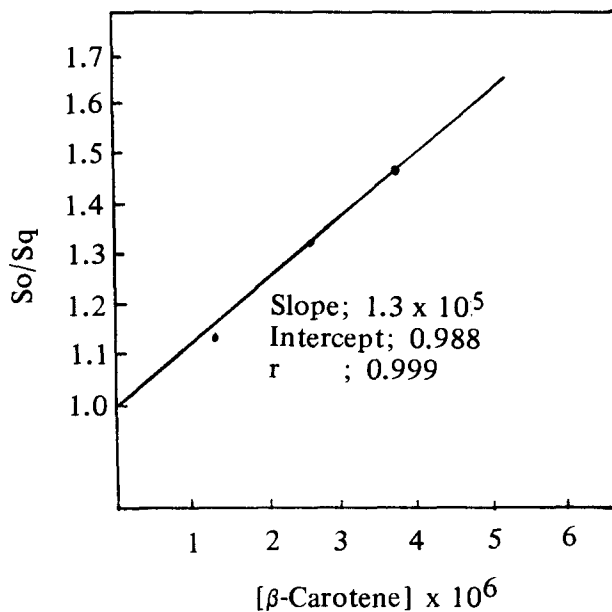


Fig. 4. Plot of S_0/S_q vs $[\beta\text{-Carotene}]$
Irradiation wavelength; 556nm
Irradiation time ; 4min
Solvent ; MeOH

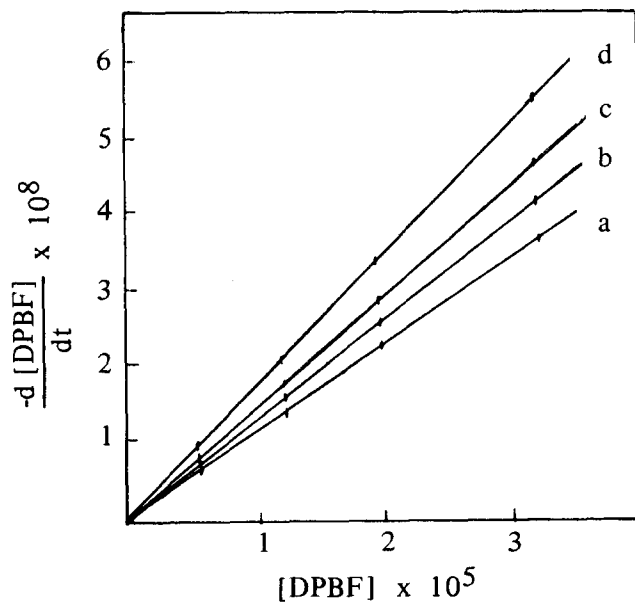


Fig. 5. Plot of $\frac{-d[\text{DPBF}]}{-dt} \times 10^8$ vs $[\text{DPBF}]$
for competitive quenching of $\beta\text{-Carotene}$ in MeOH
Irradiation wavelength; 556nm, Irradiation time; 4 minutes
 $\beta\text{-Carotene}$ concentration; (a) $1.25 \times 10^{-6}\text{M}$ (b) $2.49 \times 10^{-6}\text{M}$
(c) $3.73 \times 10^{-6}\text{M}$ (d) 0.00M; control

viscosity가 미치는 차이등 용매효과가 크게 k_d 값에 반영되기 때문이다.

그러나 k_q/k_d 값은 k_q, k_d 용매효과가 서로 상쇄된 값이므로 다른 용매계에서 측정된 값을 비교하는데 사용될 수 있는 parameter이다.

3. Lycopene의 quenching rate

벤젠-메탄올 (3:5) 용액에서 1O_2 quencher의 농도를 달리 했을 때 DPBF의 감소 속도에 미치는 lycopene의 영향을 측정한 후, Stern-Volmer식에 의해 구한 lycopene의 k_q/k_d 값은 2.06×10^5 으로 β -carotene보다도 더 좋은 1O_2 quencher임을 보여 주었다.

4. Fucoxanthin의 quenching rate

메탄올 용액에서 1O_2 quencher의 농도를 달리 했을 때 DPBF의 감소 속도에 미치는 fucoxanthin의 영향을 측정한 후 Stern-Volmer식에 의한 k_q 값은 $0.96 \times 10^{10} M^{-1} sec^{-1}$ 로 lycopene, β -carotene은 물론 capsanthin 및 그 에스터들 보다 훨씬 낮은 1O_2 quenching activity를 보여 주었다.

이상의 실험에서 구한 카로티노이드들의 1O_2 에 대한 quenching rate를 정리하면 Table 4와 같다.

Table 4. Rate constant (Kq) of singlet oxygen quenching by the carotenoids

Carotenoids	$Kq/Kd (x 10^5)$	$Kq (x 10^{10} M^{-1} S^{-1})$	Solvent
β -Carotene	1.31	2.36	MeOH
Capsanthin	1.27	2.29	MeOH
Capsanthin monoester	1.24	2.24	MeOH
	1.33	—	Benzene-MeOH (3:5)
Capsanthin diester	1.26	—	Benzene-MeOH (3:5)
Lycopene	2.06	—	Benzene-MeOH (3:5)
Fucoxanthin	0.53	0.96	MeOH

5. 적혈구의 광용혈에 대한 카로티노이드의 영향

1) 재현성이 높고 측정이 간편한 광용혈 실험

적혈구 막은 막의 생화학적 연구에 좋은 재료를 제공한다. 즉 구성 단백질 및 막지질의 구조나 생화학적 성질등이 잘 알려져 있으며 쉽게 실험재료로 사용할 수 있는 장점이 있다.

또한 적혈구의 광용혈 실험방법은 세포막의 구조, 기능, 대사에 관련된 생화학의 연구 수단으로서 뿐 아니라, 활성, 산소종이나 광독성 물질의 screening test와 같이 중요한 실험방법이며 비교적 실험을 간단하게 할 수 있는 잇점이 있어 근래 여러가지 의약품이나 화장품 첨가물들의 효능측정이나 광독성 여부를 가리기 위한 방법으로서 재현성 있는 광용혈 실험방법 개발에 관한 연구가 활발하다. 그러나 광용혈 실험이 실험대상인 적혈구의 상태, aging, 조사 광원, 광조사 시간, 광증감제의 종류와 양 등에 의해서 광용혈이 진행되는 상태가 크게 달라짐으로서 재현성 있는 결과를 기대하기가 어려운 경우가 있다.

본 실험에 사용한 광산란법은 시료를 반복하여 측정할 수 있고 적은 시료로도 연속적인 용혈의 추적이 가능했다. Fig.6은 파괴되지 않고 남은 적혈구에 대해 700nm에서 scattering O.D.를 측정할 값과 530-540nm에서 완전히 용혈 되었을 때의 absorbance와의 관계를 나타낸 것이다. 700nm에서 측정할 O.D가 0.8내지 0.2일 때는 0.99 이상의 좋은 상관관계를 보여 주었다.

따라서 광용혈 정도의 측정은 700nm에서 적당한 시간(15분 정도)간격으로 scattering O.D.를 측정하여 시간에 따른 적혈구의 파괴 그래프를 그려 50% 용혈될 때 까지의 시간을 기준에 대한 비로써 결정하는 것이 훨씬 타당하고 정량적인 수치로 나타낼 수 있다. 또한 이 방법은 용혈되는 조건, 즉 온도나 용매등에 대한 차이가 모두 보상되므로 종래 방법보다 간편하다는 잇점이 있다. 광조사 시간은 30W 형광등으로 7센티미터 거리에서 10내지 25분간 조사하는 경우가 최적이었고 광증감제로 사용한 rose-bengal의 농도는 $\sim 10^{-6}$ M 정도가 적합했다. Rose-bengal의 농도가 10^{-5} M 정도에서는 광조사중 90%이상의 적혈구가 파괴되고, 10^{-7} M 이하에서는 광조사 후 2시간이 지나도 20% 정도 밖에 파괴되지 않았다.

적혈구는 채혈 후 4도씨 냉장고에 보관하기만 하면 24시간 이내에서는 그대로 사용할 수 있었다.

2) 광용혈에 미치는 카로티노이드의 영향

Fig.7,8,9는 모두 반응액중 rose-bengal 및 카로티노이드의 농도가 각각 1.5×10^{-6} , 3.29×10^{-7} M이며 25분간 조사 시켰다. 25분간 광조사 후 즉시 반응용기를 실온(20도씨)으로 하여 암실에서 post-incubation시키면서 15분 간격으로 700nm에서 O.D를 측정하여 광용혈 정도를 그래프로 그린 것이다. 각각의 실험은 3번 이상 반복하였으며 매우 재현성이 좋은 결과가 얻어졌다.

광조사 이후 암실에서 post-incubation 시에는 계속적으로 sigmoidal time curve로 용혈이 계속됨을 알 수 있다.

Fig.7에서 보듯이 capsanthin, lutein, β -carotene 순으로 콘트롤에 비하여 광용혈을 억제함을 뚜렷이 알 수 있고, capsanthin diester, capsanthin, capsansol도 β -carotene 보다 광용혈에 대한 보호작용이 큰 것으로 Fig.8은 보여주고 있다. Fig.9에서

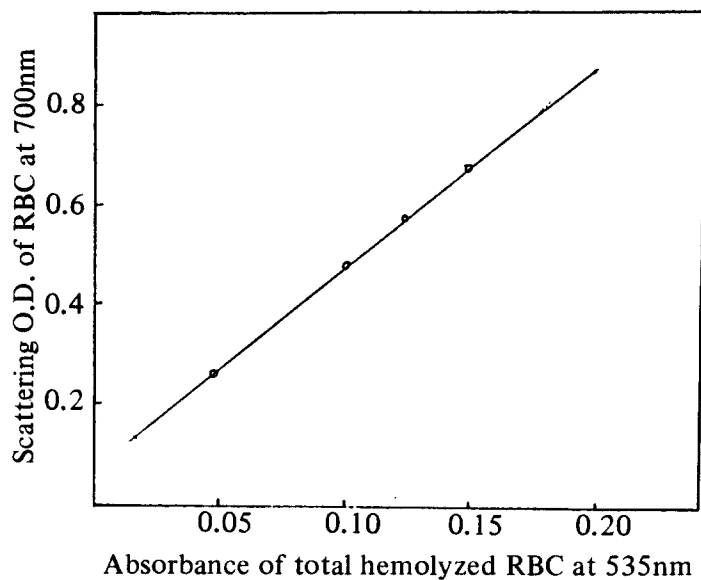


Fig. 6. Plot of Absorbance of total hemolyzed RBC at 535nm and Scattering O.D. of at 700nm

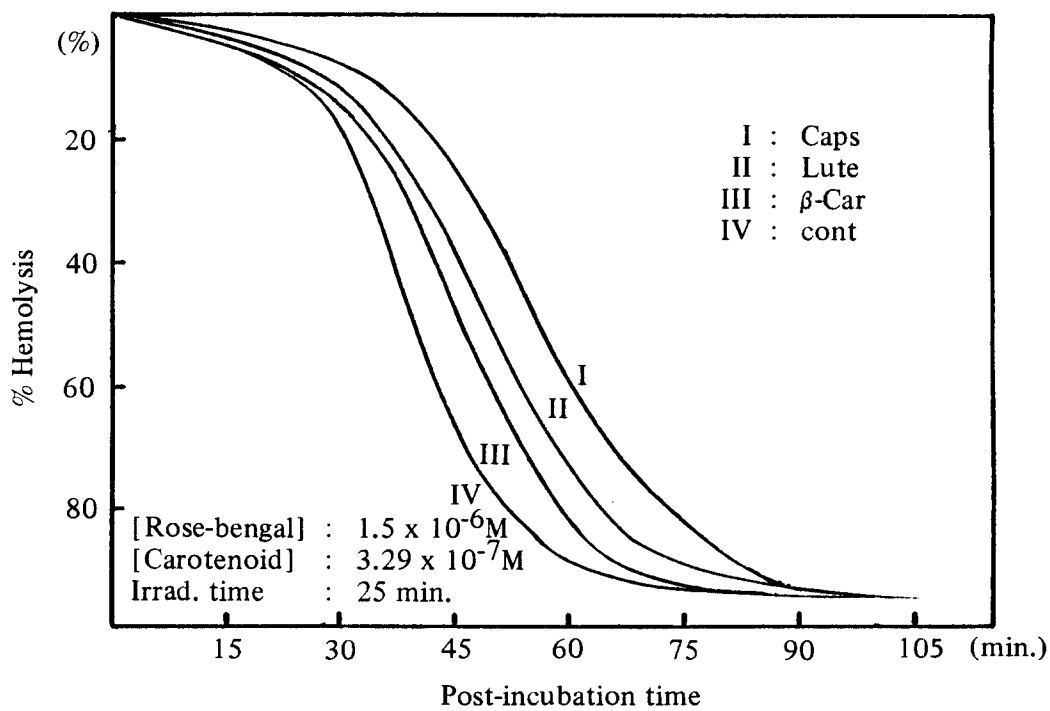


Fig. 7. Effect of Carotenoids on Photohemolysis.

는 Fig.7,8에서 보다는 β -carotene에 비하여 fucoxanthin, capsorubin, astaxanthin이 현저한 광용혈 억제효과를 나타내고 있다.

이들 카로티노이드가 적혈구 막에 대한 osmotic fragility에 영향을 줌으로 광용혈 억제효과 처럼 보이는 지를 알기 위하여 0.1% erythrocyte suspension에 fucoxanthin을 넣은 것과 넣지 않은 것을 NaCl 농도별로 체크한 결과 전혀 변화를 볼 수 없었다. 따라서 카로티노이드는 실험한 농도에서는 적혈구의 osmotic fragility에 아무런 영향이 없음을 알 수 있다.(Fig.10)

Fig.7,8,9의 시간에 따른 적혈구 파괴 그래프로 부터 50%용혈되는 τ_{50} 을 정리하면 Table5와 같다. Lutein, capsanthin, capsanthin diester, astaxanthin, capsorubin, fucoxanthin은 모두 β -carotene에 비하여 광용혈을 더욱 억제시키며 fucoxanthin은 가장 뛰어난 보호효과를 보이고 있다.

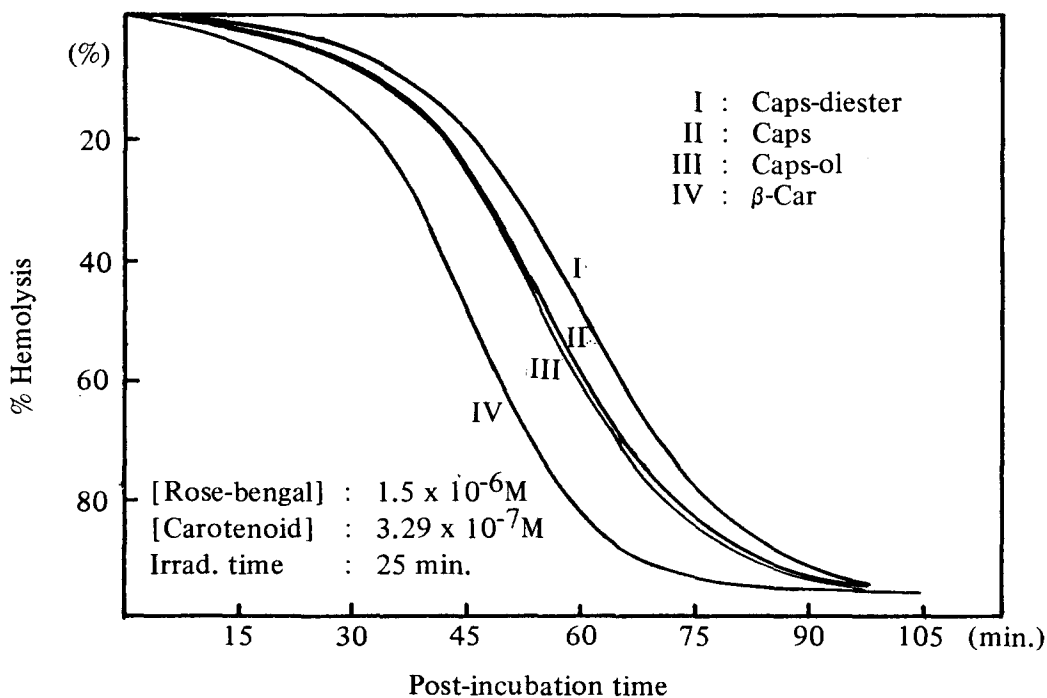


Fig. 8. Effect of Carotenoids on Photohemolysis.

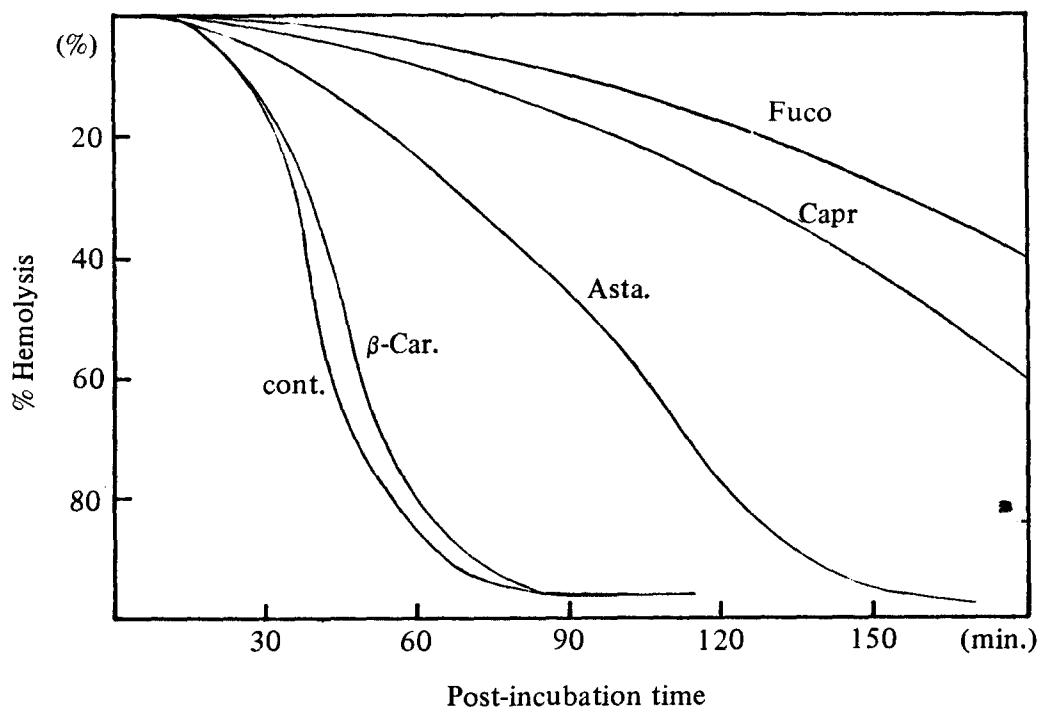


Fig. 9. Effect of Carotenoids on Photohemolysis.

Table 5. Effect of Carotenoids on Photohemolysis

Carotenoids	τ 50
CONTROL	39.1 \pm 1.1
β -CAROTENE	44.7 \pm 1.0
LUTEIN	47.9 \pm 4.5
CAPSANTHIN	55.6 \pm 3.3
-diester	62.0 \pm 1.8
ASTAXANTHIN	90.8 \pm 6.1
CAPSORUBIN	163.8 \pm 10.2
FUCOXANTHIN	243.4 \pm 13.6

3) 광용혈에 대한 Mannitol의 영향

Mannitol은 oxygen radical 중 가장 반응성이 큰 \cdot OH를 없애는 scavenger로서 널

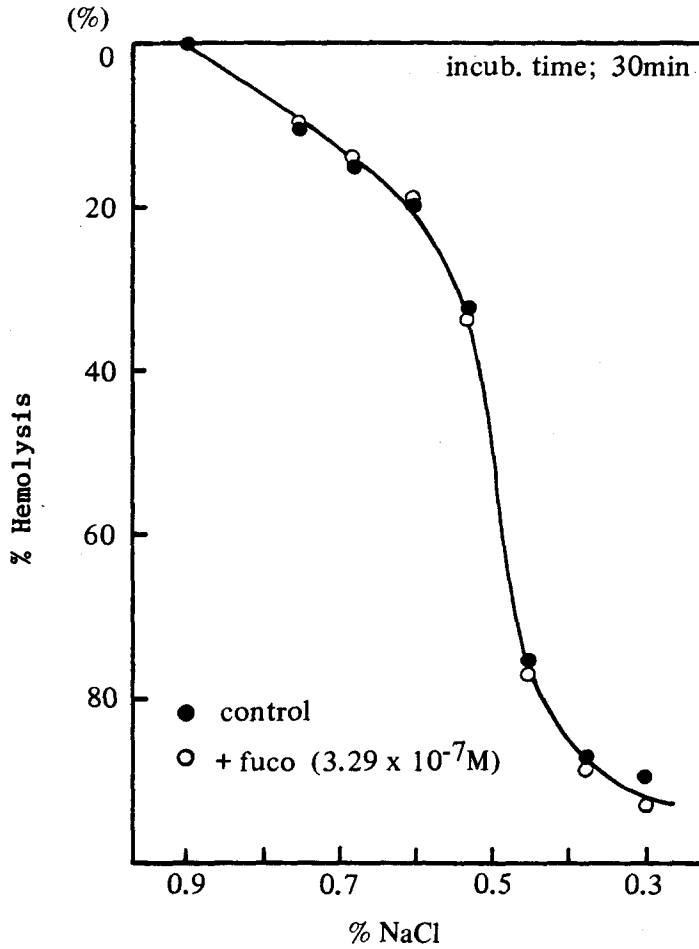


Fig. 10. Osmotic fragility curve of 0.1% erythrocyte suspension at 60 sec. after mixing

리 사용되고 있다 (J.P. Martin and N. Logsdon, 1987). Rose - bengal (1.37×10^{-6} M)을 사용한 광용혈 실험에서 광조사가 시작되기 직전에 반응용액중 mannitol의 농도가 각각 1 mM, 10 mM이 되도록 첨가하고 10분간 광조사한후 암실에서 post-incubation시킬때에 mannitol은 농도 의존적으로 적혈구의 용혈을 억제하고 있다 (Fig.11). 또한 mannitol을 적혈구에 대한 광조사가 끝난직후에 가한 실험에서도 control에 비하여 용혈작용의 저해 현상을 볼 수 있다 (Fig.12). 일반적으로 mannitol은 식물세포의 원형질을 대상으로 하는 실험에서 sorbitol 등과 함께 osmotic stabilizer로 이용되고 있다.

Fig.11,12에서와 같이 적혈구에 대한 mannitol의 용혈 억제효과가 적혈구 세포에 대한 osmotic stabilization에 기인한 것인지를 검토하기 위한 osmotic fragility 실험

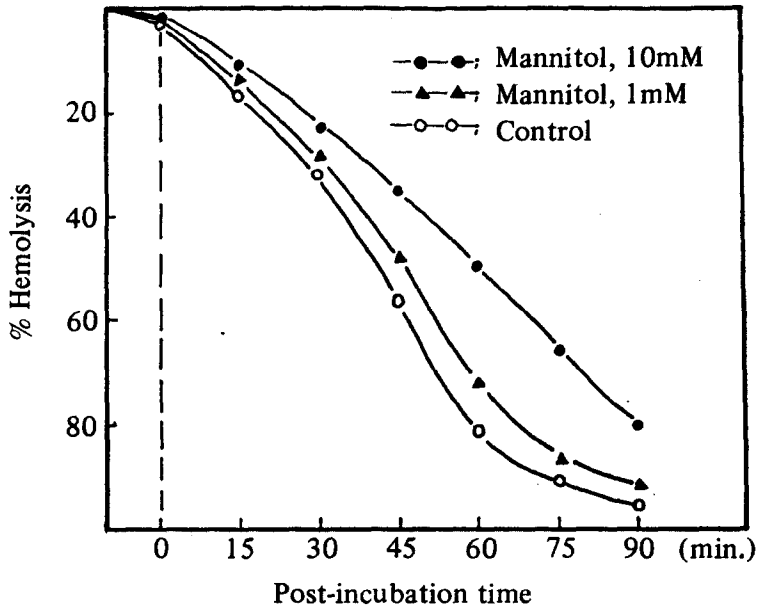


Fig. 11. Effect of Mannitol Added Before Irradiation on Photohemolysis. Irradiation Time; 10 min. Conc. of Rose bengal; $1.37 \times 10^{-6}M$

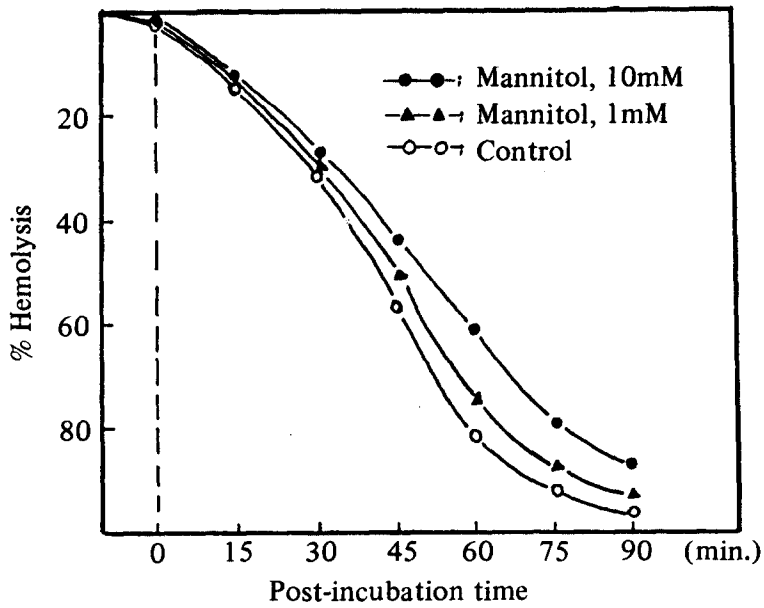


Fig. 12. Effect of Mannitol Added After Irradiation on Photohemolysis. Irradiation Time; 10 min. Conc. of Rose bengal; $1.37 \times 10^{-6}M$

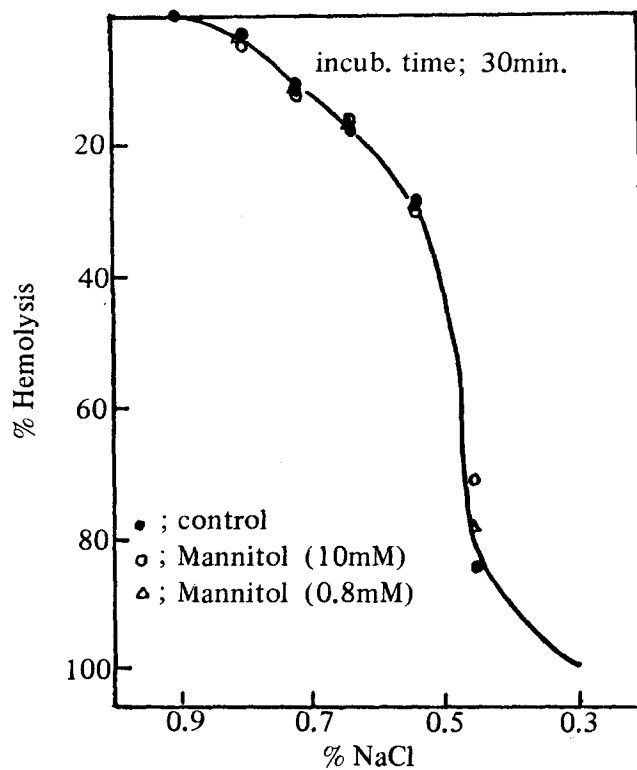


Fig. 13. Osmotic fragility curve of 0.1% erythrocyte suspension at 60 sec. after mixing.

Table 6. Effect of Mannitol on Photohemolysis

	Conc. of Mannitol Added	τ_{50} (min.)
Before irradiation	10mM	60
	1mM	46
After irradiation	10mM	50
	1mM	44
Control	0	42

형 (Fig.13)은 사용된 농도범위 (0.8 - 10 mM)에서 mannitol 이 osmotic stabilizer로 작용하지 않음을 보여주고 있다. 따라서 mannitol 은 osmotic stabilizer의 기능이 아닌 -OH의 scavenger로서의 작용이 확실히 되고 있다. 광용혈에 대한 mannitol의 용혈억제 정도를 τ_{50} 으로 표시하면 Table 6. 과 같다.

IV. 논 의

1. Singlet oxygen quenching 에 미치는 카로티노이드의 구조효과

실험에 사용한 각 카로티노이드의 이중결합 수 및 카보닐기의 수는 Table 7과 같다. 1970년 Foote 등은 all-trans retinal, lutein, β -carotene, synthetic C₃₀, C₃₅, C₅₀, C₆₀ 카로티노이드의 k_q 값을 구하여 카로티노이드의 1O_2 quenching activity는 이중결합의 수와 관련이 있으며 그 값은 이중결합수가 7개와 9개 사이에서 급격히 감소함을 보고하였다. (C.S. Foote, Y. C. Chang and R.W. Denny, 1970).

이에 대해 Mathew-Roth 등은 sarcina phytoene, sarcina phytofluene, P-422, P-438, β -carotene, isozeaxanthin 등의 k_q 를 구하여 Foote의 주장을 뒷받침하였으며, lutein 과 P-422가 2개의 하이드록시기를 갖고 있으면서 매우 좋은 1O_2 quencher 임을 이중결합 수 보다는 카로티노이드의 ionization potential 이 1O_2 의 quenching 에 더 영향을 미치기 때문이라고 제안한 바 있다 (M.M. Mathew-Roth et al., 1974).

Table 7. Number of functional group in the carotenoids under studies.

	No. of conjugated double bonds	No. of carbonyl groups	No. of hydroxy groups
β -Carotene	11	0	0
Capsanthin	11	1	2
Capsanthin monoester	11	1	1
Capsanthin diester	11	1	0
Lycopene	11	0	0
Fucoxanthin	9	1	3

β -carotene 과 lycopene 을 비교해 보면 이중결합의 conjugation 수는 모두 11개로 같다. 그러나 β -carotene 의 5 위치 메틸기의 수소는 8 위치 탄소와 결합한 수소와 van der waals 반경 이내에 있기 때문에 steric hinderance로 인해 β -ionone 고리는 conjugation 된 사슬과 동일 평면을 이루지 못하고 약 45도 각도로 뒤틀리게 된다. 즉 β -carotene 은 전자와 효과적인 overlapping 을 이루지 못하여 lycopene 보다 큰 π -ionization potential 을 갖고 덜 좋은 π -electron donor 이다. 따라서 β -carotene 의 1O_2

quenching activity는 lycopene 보다 낮다. 물론 본 실험에서 용매계의 차이로 인해 lycopene의 k_q 값을 구하지 못하였으나 다른 연구자들에 의하면 용매의 diffusion rate와 같은 3×10^{10} 정도로 알려져 있다.(C.S.Foote et al, 1970a, 1970b).

Capsanthin과 그 에스터들의 이중결합 수는 카보닐기를 포함하여 모두 11개로 β -carotene에 못지 않은 1O_2 quenching activity를 보여 주는데 이것은 이중 결합 수가 4,4'-dihydroxy- β -carotene의 결과와도 일치한다. Fucoxanthin은 conjugation수가 9개 뿐이므로 k_q 값은 급격히 감소하여 0.96×10^{10} 으로 가장 낮았는데 이 값은 이중결합 수가 같은 Foote의 C₃₀ 카로티노이드의 값과 비슷한 결과를 보여주었다. 결국 이중결합의 conjugation수는 ionization potential에 가장 큰 영향을 미치므로 conjugation수와 1O_2 quenching activity의 관계는 ionization potential로도 설명이 가능하다. Capsanthin과 그 에스터들은 하이드록시기 혹은 에스터기가 conjugation system에 영향을 미치지 않는 3,3'-위치에 있기 때문에 ionization potential에 큰 영향을 주지 못하고, 따라서 1O_2 quenching도 거의 비슷한 값을 갖는다. 이들 하이드록시 혹은 에스터기의 영향은 바로 lutein 및 그 에스터들의 경우(S.N.Park, T.Y.Lee, 1984)와도 같은 것이다.

그러나 astaxanthin과 그 에스터들간의 1O_2 quenching activity는 astaxanthin의 하이드록시기가 allylic 위치에 있기 때문에 ionization potential에 상반되는 영향을 미치는 inductive effect와 resonance effect를 갖고 있어 k_q 값은 비슷하나 resonance effect가 크게 나타났다는 보고와는 다른 경우이다.

하지만 capsanthin과 그 esters, lutein과 그 에스터들의 1O_2 quenching activity가 in vitro 메탄올 용액에서 차이가 나지 않는다 하더라도 생체내에서도 꼭 그렇다고 볼 수는 없다. 생체내에서 carotenoid는 긴 alkyl chain이 cell membrane에 삽입되어 막을 보호하고 있으므로 하이드록시기 보다는 에스터 형태의 hydrophobic한 것이 더 유리 할 수도 있기 때문이다.

2. 1O_2 에 의한 적혈구의 광용혈에 대한 ketocarotenoid의 현저한 보호효과

적혈구의 광용혈(photohemolysis)에 관한 연구는 지질과산화, 이물질대사 및 의약품이나 화장품 첨가물의 photosensitizing effect 또는 phototoxic effect들이 세포의 생체막에 미치는 영향의 평가, 혹은 적혈구 막에 대한 활성 산소나 광에 의한 용혈 메커니즘을 이해하기 위한 최근 생화학 연구의 주요 관심의 대상이 되고 있다.

광용혈에서 적혈구의 손상받는 부위 및 광용혈의 메커니즘에 대한 연구는 광증감 제인 protoporphyrin을 대상으로 1970년대에 활발하게 이루어졌다. 특히 피부 porphyrin 증은 porphyrin대사 이상으로 과량의 protoporphyrin이 적혈구에 누적됨으로서 피부가 빛을 받게 되면 대량의 활성산소종이 생산되어 용혈로 인한 피부조직장해가 생기는 국소의 수포, 케양형성을 초래하는 질환으로 잘 알려져 있다(Y.Niwa, 1986).

광용혈의 메카니즘에 있어 관심의 대상이 되고 있는 용혈을 일으키는 주 활성종은 $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ 등이며 O_2^- 은 용혈에 중요한 역할을 하지 않는다고 최근 보고되고 있다.

(A.M. Michelson, 1977; Kelvin J.A. Davies, 1987). 또한 광감작용에 의해서 손상 받는 부위로는 주로 spectrin의 cross-linking이 일어나고 (A.A. Lamola, 1980; A.W. Girotti, 1976; T.M.A.R. Dubbelman, 1978) active transport의 기능이 저하되는 반면 non-specific permeability는 증가한다고 하였다 (T.M.A.R. Dubbelman, 1980). 이어 이런 현상은 지질 과산화에 의한 것이 아닌 막 단백질의 과산화에 기인하나 막 단백질의 cross-linking과 광용혈은 연결된 과정이 아니라고 주장된 바도 있다 (A.A. Lamola, 1980). 이외에도 최근 혈구막의 음이온 교환 단백질인 Band 3가 광용혈의 target라는 보고도 있다 (J.P. Pooler, 1986).

Fig. 6,7,8에서 보여 주듯이 광조사가 끝난 이후에도 sigmoidal time curve로 적혈구의 용혈작용이 계속적으로 일어나고 있음을 알 수 있다. 이는 초기에 $^1\text{O}_2$ 에 의한 막 지질의 손상 또는 단백질 손상이 암 반응을 유발하며 또한 $^1\text{O}_2$ 이외의 어떤 인자가 용혈에 관여함을 시사하고 있다. 초기의 $^1\text{O}_2$ 에 의한 지질 과산화 및 막 단백질과 헤모글로빈이 손상되면 헤모글로빈의 경우 자동산화에 의하여 reactive oxygen species ($\cdot\text{OH}$, O_2^- , HO_2^+ , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, etc)가 계속적으로 만들어지고 이들 oxygen radical 또는 활성산소종 (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$)에 의하여 지질 과산화와 막 단백질의 분해로 인하여 용혈이 촉진될 가능성도 있다 (K.J.A. Davies, 1987). 또한 용혈이 일어나는 동안 유출된 헤모글로빈의 detergent property로 말미암아 용혈이 가속화될 수도 있다.

광용혈에서 mannitol에 의한 용혈억제 현상 (Fig. 11, 12)은 osmotic stabilization에 기인된 것이 아니고 (Fig. 13) 반응성이 가장 큰 $\cdot\text{OH}$ 의 scavenger로서의 작용에 의한 세포 보호로 간주된다. 즉 광증감제 (rose-bengal)에 의해서 $^1\text{O}_2$ 으로 개시되는 용혈실험에서 광조사전에 첨가된 mannitol에 의한 용혈억제 효과 (10mM; $\tau_{50} = 60$, 1mM; $\tau_{50} = 46$)가 광조사후 가한것 (10mM; $\tau_{50} = 50$, 1mM; $\tau_{50} = 44$)보다도 큰것은 광조사 중에도 $^1\text{O}_2$ 이외의 oxygen radical (특히 $\cdot\text{OH}$) 들이 생성될 수 있음을 암시한다. 광조사가 끝난 직후 반응액중에 가해진 mannitol도 계속적으로 용혈을 억제하는 것은 mannitol이 $^1\text{O}_2$ 이 아닌 $\cdot\text{OH}$ 의 좋은 scavenger라는 사실과 잘 일치한다.

본 연구에서 실험에 사용된 rose-bengal은 $^1\text{O}_2$ 에 의한 초기 세포손상을 일으키고 이로 인하여 광이 없는 상태에서도 적혈구 세포내에 $\cdot\text{OH}$ 등의 활성산소종의 생성을 자극하며 용혈을 일으키는 암반응을 진행시키는 것으로 간주된다.

이는 적혈구의 헤모글로빈 중에 철이 함유되어 있어 헤모글로빈이 일단 손상을 받게 되면 자동산화에 의하여 $\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 등이 쉽게 생성될 수 있기 때문이다 (J.E. Repine, R.B. Fox and E.M. Berger, 1981; H. Rosen and S.J. Klebanoff, 1981).

적혈구 세포의 막 단백질은 reactive oxygen species에 의하여 cross-linking, aggregation 등 aging 과정에서 비가역적인 손상을 가져오나 단백질 분해 (proteolysis) 는 막지질 damage와는 독립적으로 일어난다는 보고도 있다 (A. A. Lamola, 1980; K. J. A. Davies, 1987).

적혈구 세포내에는 lysosome은 없으나 수종의 ATP-independent, soluble neutral proteolytic enzyme이 존재한다. 활성산소종에 의하여 단백질 구조가 변화되고 이와같이 손상을 받은 단백질은 단백질 분해효소의 좋은 기질이 되어 용혈을 촉진할 가능성이 충분히 있다고 사료된다. 또한 oxygen radical이 직접적으로 RBC protease를 활성화시킬 가능성도 배제하지는 못한다. 결국 용혈의 sigmoidal time curve는 endogenous oxidants ($\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 etc) 또는 proteolytic enzyme 등의 관여를 시사하고 있다.

광용혈에 있어 카로티노이드의 용혈억제는 뚜렷하다 (Fig. 7, 8, 9). β -Carotene의 $^1\text{O}_2$ quenching rate는 여러 연구자들에 의하여 발표되었던 바 각종 카로티노이드중 가장 좋은 quencher로 알려져 있었다.

본 연구자들에 의한 실험에서도 β -carotene의 k_q 값은 $2.36 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로 상당히 컸다. 그러나 실험에 사용된 카로티노이드 중 β -carotene은 용혈억제 효과가 가장 낮았으며 lutein, capsanthin, capsanthin diester, astaxanthin 순으로 용혈억제 효과의 증가를 보였다. 특히 capsorubin과 fucoxanthin은 현저한 용혈억제 효과를 Fig. 9와 Table 5에서 보여주고 있다. In Vitro 실험에서 fucoxanthin의 $^1\text{O}_2$ quenching rate constant는 $0.96 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로 실험한 카로티노이드중 가장 낮았으나 적혈구 용혈억제 효과는 가장 큰 값 ($\tau_{50} = 243$ 분)을 주었다. (T.Y. Lee, D.H. Lee and S.N. Park, 1987). 결국 β -carotene은 photodynamic reaction으로부터 생성되는 $^1\text{O}_2$ 은 효과적으로 제거하나, $\cdot\text{OH}$, $\text{HOO}\cdot$ 과 O_2 등에 의해서 유도되는 산화로부터는 ketocarotenoid에 비하여 효과적으로 세포막을 보호하지 못함을 보여주고 있다.

이들 카로티노이드의 k_q 값과 τ_{50} 을 비교한 것이 Table 8에 나와 있다. $^1\text{O}_2$ 에 의해 개시된 광용혈은 광조사가 끝난 후에도 계속적인 secondary reactive oxygen species를 생성하는 암 반응에 의해 용혈이 일어나며 이때 ketocarotenoid는 이들 활성 산소종들을 효율적으로 제거시키므로 활성 산소종에 대한 카로티노이드의 적혈구 세포보호 작용을 나타낸다고 사료된다.

β -carotene을 제외한 이들 카로티노이드 구조의 특징은 모두 $-\text{OH}$ 기 또는 $-\dot{\text{C}}=0$ 기를 갖고 있으며 특히 보호작용이 제일 큰 fucoxanthin은 이들 작용기 이외에도 epoxy기와 allene기를 포함하고 있다. 이들 작용기를 갖는 카로티노이드들은 이들 카로티노이드가 적혈구 세포에서의 적혈구막, 막 단백질 또는 헤모글로빈에의 특이적인 결합을 하는데 카로티노이드의 구조가 결정적인 역할을 하게 함으로써 단지 $^1\text{O}_2$ 의 diffusional quenching 뿐만이 아닌 photodynamic action으로 부터 현저한 세포보호효과를 나타낼 수 있

Table 8. K_q and τ_{50} of carotenoids

Carotenoids	K_q/K_d (M^{-1})	K_q ($M^{-1}S^{-1}$)	τ_{50} (min)
β -CAR	1.31×10^5	2.36×10^{10}	45
LUTE	1.06	1.90	48
LYCO	2.06	—	—
4, 4-OH - β -CAR	1.04	1.87	—
CAPS	1.27	2.29	56
-monoester	1.24	2.23	—
-diester	1.26	—	62
ASTA	—	—	91
-diester	1.29	2.32	—
CAPR	—	—	164
FUCO	0.53	0.96	243

다고 사료된다. 또한 카로티노이드의 구조적 측면을 고려하면 oxygen 함량 ($-OH, -\overset{\overset{O}{||}}{C}=O, -O-$, $-\overset{\overset{O}{||}}{C}-O-$)이 많은 카로티노이드의 보호효과가 큰 것을 볼때에 카로티노이드의 hydrophilicity가 중요한 인자가 될 가능성도 있다. 즉 hydrophilicity가 클수록 적지만 수용액중에서의 용해도가 커져 녹아있는 reactive oxygen species를 효율적으로 제거하거나 또는 soluble protein에 직접 binding 함으로서 (P.F. Zagalsky, P.J. Herring 1972) photodynamic action으로부터 세포를 보호할 가능성도 충분히 있다고 사료된다. 일반적으로 카로티노이드는 oxygen radical을 제거하는 능력이 1O_2 의 physical quenching에 비하면 미약한것으로 간주되고 있으나 지금까지의 연구결과를 종합해 보면, capsorubin이나 fucoxanthin 등은 암반응 동안 직접적인 oxygen radical의 좋은 scavenger로 작용할 가능성이 가장 크며 앞으로 그 mechanism의 해명이 이루어진다면 세포손상과 보호측면에서의 노화 기초연구뿐 아니라 노화방지 물질의 개발에 대한 응용연구에 큰 도움이 되리라 생각된다.

Reference

- Brown, Murray Raison John K. (1987), *Phytochemistry* 26, 4, 961-965.
- Calovert, J.G. and Pitts Jr., J.N. (1966). "Photochemistry", J. Wiley-sons, p. 784.
- Carlsson, D.J., Suprunehuk, T. and Wiles, D.M. (1974). *Can. J. Chem.*, 52, 3728.
- Davies, K.J.A., Goldberg, A.L. (1987). *J. Biol. Chem.* 262, 8220, 8227.
- Davies, K.J.A. (1987). *J. Biol. Chem.* 262, 9895, 9902, 9908, 9914.
- Dubbelman, T.M.A.R., de Goeij, A.F.P.M., van Stevenick, J. (1978) *Photochem. Photobiol.* 28, 197.
- Dubbelman, T.M.A.R., de Goeij, A.F.P.M., van Stenvenick, J. (1980). *Biochem. Biophys.* 595, 133.
- Farmilio, A. and Wilkinson, F. (1972). *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 8960.
- Farmilio, A. and Wilkinson, F. (1973a). *Photochem. Photobiol.* 18, 441.
- Farmilio, A. and Wikinson, F. (1973b). *J. Polym. Sci. B.*, 11, 61.
- Foote, C.S. and Denny, R.W. (1968) *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6233.
- Foote, C.S., Peterson, E.R. and Lee, K.W. (1972). *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1032.
- Foote, C.S., Denny, R.W., Weaser, L., Chang, Y.C. and Peters, J. (1970a). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 171, 139.
- Foote, C.S., Chang, Y.C. and Denny, R.W. (1970b). *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5216.
- Foote, C.S. (1982) "Pathology of Oxygen" (A.P. Auor, ed.), Academic Press, N.Y., p. 21.
- Foote, C.S., Shook, F.C. and Abakeru, R.B. (1984) *Methods Enzymol.* 105, 36.
- Girotti A.W. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72. 1367.
- Grasseli, J.G. and Ritchey, W.M. (1973). "Atlas of Spectral data and Physical Constants for Organic Compounds", CRC press.
- Guillory, J.P. and Cook, C.F. (1973). *J. Polym. Sci. Al.*, 11, 1927.
- Isler, C. (1971). "Carotenoids," Hoffman La Roche and Co. Ltd. Switzerland Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart, p. 16.
- Karrer, P. and Jucker, E. (1948). "Carotenoid" Birkhauser Basel.
- Karrer, P. and Jucker, E. (1950). "Carotenoid," Elsevier Pub. Co.
- Klebanoff, S.J. (1980). *Ann. Int. Med.*, 93, 480.
- Knox J.P. and Dodge A.D. (1985), *Phytodemistry* 24, 5, 889-896.
- Krinsky, N.I. (1982). *Pure and Appl. Chem.*, 51, 649.

- Krinsky, N.I. (1979). "Singlet Oxygen", Academic Press, N.Y., p. 597.
- Krinsky, N.I. (1982). "Topics in Photobiology" (Proceeding of International Lamola, A.A., Doleiden, F.H. (1980). 31, 597.
- Leibovitz, B.E. and Siegel, B.W. (1980). J. Geontel., 35, 45.
- Lee, T.Y., Lee, D.H. and Park, S.N. (1984). J. Korean Agr. Chem. Soc. 27. 1.
- Lee, T.Y., Lee, D.H. and Park, S.N. (1987), Photochem. Photobiol. 45 Supplement, 10s
- Martin, Joseph P., Logsdon, Naomi (1987), J. Biol. Chem. 262, 15, 7213-7219.
- Mathenon, I.B.C., Lee, J., Yamanashi, B.S. and Wolbarsht, M.L. (1974). J. Am. Chem. Soc., 96, 3343.
- Mathew-Roth. M.M., Wildon, T., Fujimori, E. and Krinsky, N.I. (1974). Photochem. Photobiol., 19, 217.
- Merkel, P.B. and Kearns, D.R. (1972). J. Am. Chem. Soc., 94, 7244.
- Merkel, P.B. and Kearns, D.R. (1975). J. Am. Chem. Soc., 97, 462.
- Michelson, A.M., Durosay, P. (1977). Photochem. Photobiol. 25, 55.
- Niwa, Y. (1986), Fragrance Journal No. 79, 89-99.
- Ogiliby, P.R. and Foote, C.S. (1983), J. Am. Chem. Soc. 105, 3423.
- Park, S.N., Lee T.Y. (1984). "Quenching Effect of Carotenoids on Singlet Oxygen", J. Soc. Cos. Chem. Korea No. 10, 75.
- Peracek, F.J. and Zechmeister, L. (1956). Anal Chem., 18, 1484.
- Pooler, J.P. (1986). Photochem. Photobiol. 43. 263.
- Repire, J.E., Fox. R.B. and Berger E.M. (1981), J. Biol. Chem. 256, 7094-7096.
- Rosen, H. and Klebanoff, S.J. (1981), Arch. Biochem. Biophys. 208, 512-519.
- Singh. A. McIntgre, N.R. and Koroll, G.W. (1978). Photochem. Photobiol. 28, 595.
- Stanier, R.Y., Griffitha, M., Sistro, W.R. and Cohen-Bazire, G. (1955). Nature, 176, 1955.
- Workshop on Photobiology, Korean). p. 67.
- Young, R.H., Wehrly, K. and Martin, R.L. (1971). J. Am. Chem. Soc. 93, 5774.
- Zagalsky, P.F., Herring P.J. (1982), Comp. Biochem. Physiol., 41B, 397.

ABSTRACT

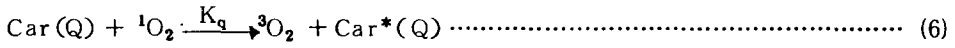
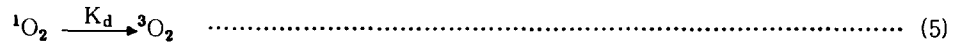
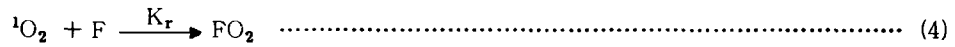
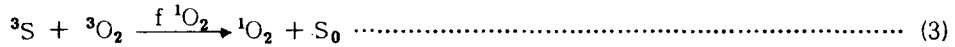
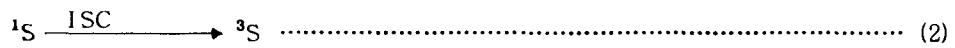
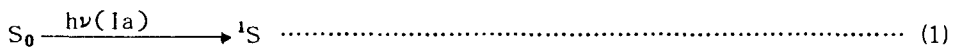
β -Carotene has been known as an effective quenching agent of singlet oxygen and the carotenoid pigments in general are expected to protect cells against photosensitized oxidations. We are determined the quenching rate constants of

several Ketocarotenoids including capsanthin, capsanthin diester, astaxanthin and fucoxanthin, and the relative quenching activities against singlet oxygen were compared with those of β -carotene and reported carotenoids. Nevertheless the ketocarotenoids exhibited lower quenching rate constants than β -carotene, they showed more pronounced protective activities than β -carotene against photohemolysis induced by singlet oxygen. Among the ketocarotenoids investigated, fucoxanthin indicated a significant protective activity for the cell. The results suggested that. 1) 1O_2 may be a likely initiator of photohemolysis, but this reaction is followed by slow dark reactions involving secondary reactive species. 2) For protection of RBC against photodynamic action with carotenoids, carotenoids having functional groups such as $-C=O$ and $-OH$ groups are most efficient.

This suggests that partition of carotenoids between the bulk and the membrane and/or their specific binding to membrane proteins are more critical for the photo-protection by carotenoids than is a diffusional quenching of 1O_2 .

부 록

본 실험의 photo-oxygenation에 관하여는 반응 단계는 다음과 같이 생각할 수 있다.



여기서 S는 증감제로서 rose-bengal이며 F는 1O_2 과 거의 정량적으로 반응하여 photo-oxygenation을 일으키는 DPBF이고 Car(Q)는 1O_2 의 quencher로서 그 능력을 비교 검토하고자 하는 각종 카로티노이드이다. 위와같은 반응 단계에서 steady-state approximation에 의한 반응속도는 다음과 같다.

$$\frac{-d[F]}{dt} = J_a \cdot \Phi_{ISC} \cdot f {}^1O_2 \cdot \frac{K_r[F]}{K_r[F] + K_q[Q] + K_d} \dots\dots\dots (7)$$

여기서 I_a 는 증감제에 의한 빛의 흡수비율 ($\text{mol} \cdot \text{quanta} / \text{sec}$)이며, Φ_{ISC} 는 증감제의 삼중항 상태의 양자수득율이고 $f \text{ } ^1\text{O}_2$ 는 삼중항 상태 증감제로 부터 $^1\text{O}_2$ 의 수득율이다. 이 값은 많은 유기용매중에서 삼중항 상태 quencher가 존재하지 않을 때는 대략 1.0의 값을 가짐이 밝혀졌다. (P.B.Merkel and D.R.Kearris, 1972).

(7)식에서 $[F]$ 가 매우 작을 때 ($\sim 10^{-6}\text{M}$) 일차반응 속도 식을 얻을 수 있다.

$$-\frac{d[F]}{dt} = K\left(\frac{K_r[F]}{K_q[Q] + K_d}\right) \dots\dots\dots (8)$$

여기서 $[F]$ 의 값 변화에 따르는 $-\frac{d[F]}{dt}$ 값의 변동을 그래프로 그리면 기울기 S 는 다음과 같다.

$$S = K\left(\frac{K_r}{K_q[Q] + K_d}\right) \dots\dots\dots (9)$$

(9)식으로 부터 다음 (10)식과 같은 Stern-Volmer식을 얻을 수 있다.

$$S_0/S_q = 1 + (K_q/K_d)[Q] \dots\dots\dots (10)$$

여기서 S_0 는 quencher, Q 가 없을 때를 나타낸다. S_0/S_q vs. $[Q]$ 의 Stern-Volmer식의 직선에 있어서 기울기는 K_q/K_d 를 나타낸다.