

색소 첨가제에 의한 히드록시 라디칼의 광증감 생성반응

김민식·성대동*

경남전문대학 산업학부, 동아대학교 화학과*

Photosensitized Generation of Hydroxyl Radical by Color Additive

Min-Sik Kim and Dae-Dong Sung*

Div. of Industry, Kyung-Nam Junior College, Pusan 616-010, Korea.

*Dept. of Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea.

Abstract

Reactivity and reaction mechanism for the photosensitized generation of hydroxyl radical by various coumarin derivatives are investigated by means of ESR and laser flash photolysis methods. The nine kinds of coumarin derivatives show to be proceeded through the OH[·] radical generation mechanism, however 1-ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine decomposes and produces the carbene intermediate before OH[·] radical generation reaction occurs. The nine coumarin derivatives show the signals, which are corresponded to DMPO-OH spin adducts. NaN₃, EtOH and HCOONa act as a strong photosensitizer to quench OH[·] radical. The decay rate constants of the hydrated electrons in the case of added N₂O show higher than added K₃Fe(CN)₆.

Key words : Coumarine derivatives, photosensitizer

서론

식품과 의약품의 첨가제로 쓰이는 coumarin과 그 유도체는 바닐린, 헤리오트리핀 등과 잘 혼합¹⁾되고 광생물학적으로 큰 효과²⁾를 나타내기 때문에 이들의 화학적 성질에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. Coumarin 유도체가 DNA와 광화학 반응에 의하여 새로운 유독성 물질로 변화되는 과정은 생리학적으로 중요한 정보를 제공한다³⁾. Coumarin 유도체 중 furocoumarin에 자외선-A 영역의 빛을 쬐어 주면 광독성(phototoxicity)이 현저하게 줄어든다는 보고⁴⁾도 있다. 이를 이용하여 새로운 광화학 요법제의 개발이 촉진되고 있다⁵⁾. 그러나 coumarin 유도체에 자외선-A 영역의 빛을 쬐어 줄 때 세포가 손상되기도 하며 때로는 피부암을 유발하기도 한다⁶⁾. Coumarin 및 그 유도체가 광화학 반응에 어떻게 민감하게 반응하여 새로운 분자로 전이되는가에 대한 연구는 일부 임상학적으로 보고된 것이 있으나 분자 수준에서 구체적으로 연구한 결과는 거의 보고된 바 없는 실정이다.

Coumarin 및 그 유도체는 분자 내에 있는 케톤기에 의해 OH[·] 라디칼과 아주 빠르게 반응할 것이 예상⁷⁾

되고 이 반응은 광화학 반응에 의해 더욱 촉진될 것이다. 본 연구에서는 OH[·] 라디칼을 형성할 것으로 예상되는 coumarin 분자 및 그 유도체의 수용액에 365nm의 빛을 조사시킨 뒤 OH[·] 라디칼의 가동효과를 측정하고 그 결과로부터 coumarin 분자 및 이와 유사한 색소 분자들의 반응성과 메커니즘을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

1. 시약

2-Coumaranone(:2-CN), {7-(dimethylamino)-2,3-dihydrocyclopenta[C][1]benzopyran-4(1H)-one}(Coumarin 138:C-138, {7-(dimethylamino)-4(trifluoromethyl)coumarine}(Coumarin 152:C-152), {2,3,6,7-tetrahydro-9-(trifluoromethyl)-1H, 5H, 11H-[1]benzopyrano[6,7,8-ij]quinolizin-11-one}(Coumarin 153:C-153), {2,3,6,7-tetrahydro-9(ethylacetato)-1H, 5H, 11H-[1]benzopyrano[6,7,8-ij]quinolizin-11-one}(Coumarin 314:C-314), {2,3,6,7-tetrahydro-9-(methylketo)-1H, 5H, 11H-[1]benzopyrano[6,7,8-ij]quinolizin-11-one}(Coumarin 334:C-33

4), {2,3,6,7-tetrahydro-9-(cyano)-1H, 5H, 11H-[1]benzopyrano-[6,7,8, ij]quinolizin-11-one}(Coumarin 337:C-337), 2H-1-benzopyran-2-one(Coumarin:2-C), cresolphthalein(C:CP)은 Aldrich Chem. Co.로부터 구입하여 사용하였다.

각 시료의 포화수용액을 만든 후 암실 냉장고 속에서 10시간 이상 보관하였다. 각 포화 수용액의 농도는 $1.5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 2.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 범위이었다.

5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)는 Tokyo Kosei Co.로부터 구입한 후 정제하여 사용하였다. DMPO는 사용직전에 냉동실(-22°C)에서 보관하였다.

Cytochrome c와 bovine erythrocytes(superoxide dismutase:SD) 및 bovine liver(catalase:BL) 그리고 desferrioxamine C:DFO)은 Sigma Chem. Co.로부터 구입하여 사용하였다. 1-Ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(ENNG)은 Aldrich Chem. Co.로부터 구입하여 사용하였다.

2. Cytochrome c에 의한 환원 반응 속도 상수 결정

Cytochrome c에 의한 superoxide dismutase 환원 반응으로 superoxide 음(-)이온의 양을 결정하였다.

Superoxide 음(-)이온의 양은 Simic⁸⁾, Butler⁹⁾, Koppenol¹⁰⁾ 등의 방법에 따라 결정하였다.

$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 ferricytochrome c에 365nm 파장의 빛으로 2시간 동안 조사시킨 시료 수용액을 가하였다. Ferricytochrome c와 superoxide 음(-)이온 라디칼의 반응 속도상수는 pH 변화에 따라 차이가 났다. 따라서 pH 7.2짜리 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 인산 완충용액을 사용하였다. 전체 시료의 부피가 1.5mL인 시료를 분광용 시료관(두께 10mm, 폭 4mm)에 빨리 넣고 곧이어 ferricytochrome c를 빨리 떨어뜨린 후 30초 이내에 측정하였다. Cytochrome c는 작은 양이라도 superoxide dismutase에 아주 예민하게 반응하여 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 를 생성하므로 superoxide dismutase를 포함하는 용액과 포함하지 않는 용액에서 각각의 반응 속도를 측정하였다. Superoxide dismutase의 농도는 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 이었다.

Cytochrome c와 흡광도는 Shimadzu UV/240 spectrophotometer와 Kontron Uvikon 860 spectrophotometer에 2nm 두께의 슬릿을 장착하여 측정하였다. 반응 속도 측정은 McCord의 방법¹¹⁾에 따라 흡광도를 418nm에서 ferricytochrome c가 환원되는 동안에 약 1시간에 걸쳐 수행하였다. 여기서 물 흡광계수의 차이 $\Delta \epsilon = 6.8 \times 10^4 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 이었다. 418nm에서 흡광도는 시간이 경과함에 따라 증가하였다.

3. 시료의 바닥상태 흡광도 측정

시료 수용액의 흡광도 측정은 Perkin Elmer 683 Spectrophotometer를 사용하였다. 시료의 용해도가 아주 낮아서 물 흡광계수를 결정하기가 어려워서 에탄올을 공용매로 사용하였다. 물과 에탄올의 혼합 비율은 95/5(v/v)로 하였고 혼합용매에 시료를 녹여 암실에 보관하였다가 측정시간을 가능한 짧게 하여 빛을 조사시키면서 흡광도를 측정하였다.

4. 광증감반응과 ESR스핀 가둠효과(Spin trapping) 측정

전자 스핀 공명(electron spin resonance:ESR) 측정은 Bruker ESR 300E spectrometer를 이용하여 100kHz field modulation의 조건에서 9.56 GHz에서 수행하였다. ESR 스펙트럼은 시료용액에 빛을 조사시키면서 일정시간이 경과한 후에 마이크로파의 출력을 20mW, 그리고 변조폭을 2G로 한 상태에서 기록하였다. DMPO를 포함한 시료 전체의 부피는 1mL이었다. 이 시료관을 25°C로 유지하면서 고압수은램프(Phywe CS 150W)로 조사시켰다. 고압수은램프에서 나오는 빛을 파장 365nm에 맞추었다.

광투과도는 38%이었고 광학계의 bandwidth는 5nm가 되게 하였다. 방출되는 빛을 ESR cavity에 직접 조사시켰다. 파장 365nm에서의 빛의 세기는 $3 \text{Jm}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이었다. 스핀가둠효과는 Sander의 방법¹²⁾에 따라 50mM DMPO를 이용하여 시료용액 속에서 스핀 가둠 라디칼에 적당한 농도로 유지시켰다. 시료용액에 빛을 조사시킬 때 일정 파장에서 생성되는 DMPO-OH의 부가생성물을 흡광도로 확인하였다. 반응시료용액에 N_2 기체를 주입시켜 공기를 추출하였다. OH라디칼의 생성속도는 DMPO-OH의 부가생성의 양을 시간 함수로 나타내어 계산하였다. DMPO-OH의 부가생성물의 양은 매 10분 간격으로 측정한 ESR 스펙트럼에서 피크의 높이로부터 상대적인 값으로 구하였다.

5. 레이저 설팅 분해(Laser flash photolysis) 반응 실험

나노초 비상주 흡수 스펙트럼 측정(nanosecond transient absorption spectroscopy:NTAS)은 Q-switched Nd/YAG 레이저(Spectron YAG SL-400G)를 이용하여 구하였다. 여기방출(excitation emission)은 $\lambda = 354.7 \text{nm}$ 파장에서 반최대치의 펄스폭(pulse width at half-maximum: PWHM)이 2ns(nanosecond) 되도록 두께의 비선형 결정(KDP)을 이

용하여 진동수 변조법으로 발전시켰다. 원통형 렌즈는 폭 1cm, 높이 0.4cm의 레이저 빔을 얻기 위하여 사용하였다. 원통형 렌즈는 1cm×1cm의 silica cuvette 앞에 놓았다.

레이저 빔에 의해 시료가 여기될 때 일정한 형태의 스펙트럼을 얻기 위해 서리가 된 규소판을 silica cuvette 앞에 설치하였다.

시료를 통해 나오는 빛의 세기 변화는 2ns(nanosecond)로 시분해시킬 수 있는 섬광램프 단색화 광증폭기로서 측정하였다. 광증폭기 상의 신호는 시간 상관 단광자 계수법(time-correlated single photon counting: TCSPC)으로 나타내었다¹³⁾. 광계수는 single channel analyzer(SCA)와 photon counter로¹⁴⁾ 구성하였다. SCA는 낮은 에너지 준위와 높은 에너지 준위 사이에서 문턱에너지의 크기를 조절하도록 두 개의 단자로 고정하였다. 단색화 장치는 구동장치에 의해 작동되면 광계수와 동조되게 하였다. 광 다이오드(photodiode)에 의해 유발된 신호가 시간당 진폭 변조기(time-to amplitude converter:TAC)상에서 변조되고 이것이 PMT신호에 의해 변조가 멈추도록 하였다¹⁵⁾. TAC상에서 나오는 신호를 먼저 multichannel analyzer(MCA)상에서 소멸곡선으로 나타내게 할 수 있었다. 이때 나오는 형광 소멸곡선을 이용하여 TAC의 범위를 결정하였다. TAC로부터 나온 신호는 SCA

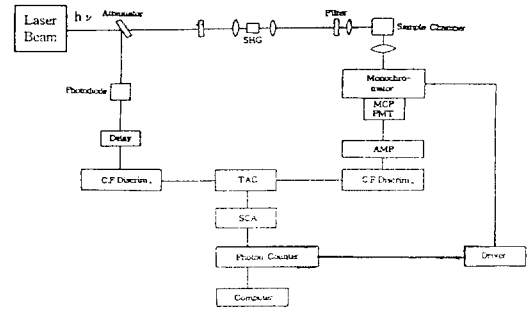


Fig. 2. Constructed the time-correlated single photon counting electronic system in this work.

로 보내었다. 시간 지연(time delay) 0점은 기기 반응 함수인 instrument response function(IRF) 상에서 최대값이 되게 하였다.

SCA는 Tenmelec사의 model TC-450형이고, 광계수기(photon counter)는 Stanford Research System 회사의 SR-400 gated photon counter이다.

본 연구에서 사용한 레이저 섬광 광분해 장치의 개략도는 Fig. 1과 2에 각각 나타내었다.

레이저 섬광 반응은 상온(25℃)에서 진행하였다. 시료는 에탄올/물(20/80, v/v) 혼합 용매계에 녹여서 사용하였다.

시료 용액의 흡광도를 측정하는 동안에 Ar기체를 시료에 계속 통과시켰다.

결과 및 고찰

Fig. 3에는 순수한 물에 각 시료를 녹인 후 측정된 흡수스펙트럼 중 대표적으로 C-138과 C-152, C-314 및 C-153에 대하여 나타내었다.

Fig. 3에서 보면 C-138은 292nm에서 흡수띠를 보이고 다음은 256nm에서 중간 흡수띠를 보인다. C-152는 314nm에서 가장 큰 흡수띠를 보이고 다음은 254nm에서 중간 흡수띠를 보인다.

C-153은 308nm에서 그리고 336nm와 256nm에서 각각 강한 흡수띠를 보이며 C-314는 291nm에서 최대 흡수띠를 보이고 또한 335nm와 273nm에서도 비슷한 크기의 강한 흡수띠를 보인다. 다른 coumarine유도체들도 대체로 비슷한 흡수띠를 보였다. 그러나 CP는 300~320nm 영역에서 어떤 흡수띠도 보이지 않았다. 그리고 ENNG는 UV/vis 영역의 빛에 의해 쉽게 분해되어 다른 중간체로 변함을 알 수 있었다.

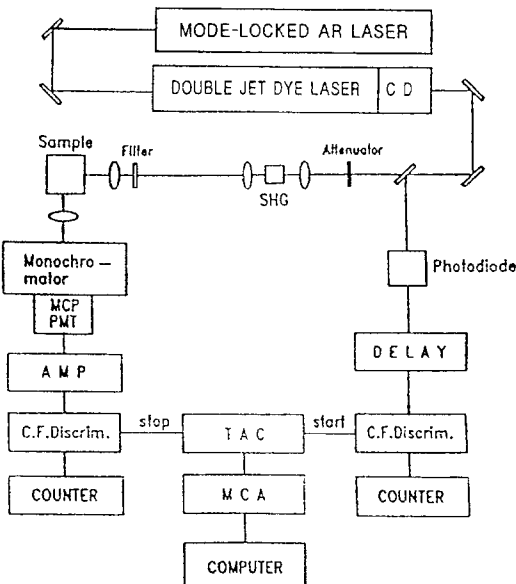


Fig. 1. Schematic diagram of picosecond photon counting system constructed in this work. CD denoted cavity dumper.

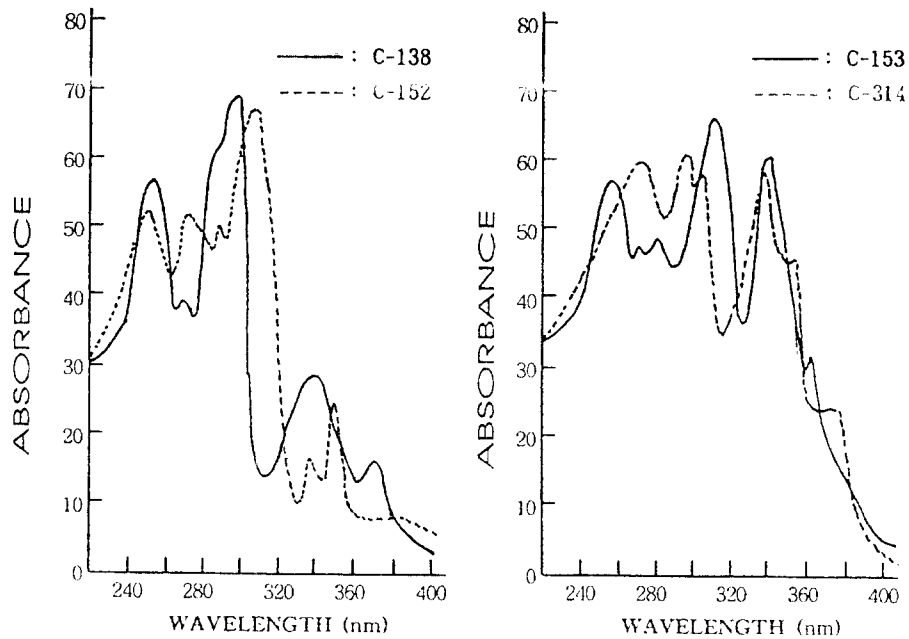


Fig. 3. Absorption spectra of {7-(dimethylamino)-2,3-dihydrocyclopenta[C][1]benzopyran-4(1H)-one} (C-138), {7-(dimethylamino)-4-(trifluoromethyl)coumarine} (C-152), {2,3,6,7-tetrahydro-9-(trifluoromethyl)-1H, 5H, 11H-[1]benzopyrano[6,7,8-ij]quinolizin-11-one} (C-153) and {2,3,6,7-tetrahydro-9-ethylacetato-1H, 5H, 11H-[1]benzopyrano[6,7,8-ij]quinolizin-11-one} (C-314) in aqueous solutions, at the same concentration.

Table 1. Wavelength of the maximum peak detected in the UVA region and their corresponding molar extinction coefficients(ϵ)

Solvents	Compounds									
	2-CN	C-138	C-152	C-153	C-314	C-334	C-337	2-C	CP	
EtOH	λ_{\max}	309 336	318 332 (shoulder)	313 358 (shoulder)	337 298	320 333	319 365 (shoulder)	333 389	298 330 (slight shoulder)	327 388
	ϵ ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	10,700 6,900	13,800 10,500	8,800 3,100	12,100 11,900	13,500 10,600	7,600 2,300	11,800 —	12,500 7,200	11,800 —
	λ_{\max}	313 338	322 341	321 363 (shoulder)	342 299	322 341	322 376 (shoulder)	335 —	296 333 (shoulder)	335 —
H ₂ O-EtOH (95:5%, V/V)	ϵ ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	12,400 7,200	13,500 10,400	9,800 3,200	9,800 10,900	13,500 10,200	9,000 2,800	12,100 —	13,800 7,500	11,800 —

Table 1에는 본 연구에서 사용한 시료 9개에 대한 320~380nm의 영역(UVA)에 해당하는 피이크의 파장과 몰 흡광계수를 나타내었다. Table 1에서 보면 각 시료의 몰 흡광계수는 발색단에서 보이는 일반적인 λ_{\max} 의 값과¹⁶⁾ 거의 일치함을 알 수 있다.

ESR에 의한 스핀 가둠효과측정의 결과는 DMPO와 OH라디칼이 결합한 DMPO-OH 부가생성물의 생성속도에 비례하였다.

시료 용액에 50mM의 DMPO를 넣은 후 365nm 파장의 빛을 조사시키고 ESR상에서 시그날을 확인하였더니 DMPO-OH 부가생성물에 해당하는 4중선이 관측되었다. 일반적으로 발색단기를 갖는 화합물들의 hyperfine splitting constant(HFSCS)가 14.9G($\alpha_N = \alpha_{\text{OH}}$)에서 관측¹⁷⁾되는데 본 연구에서도 일치하였다. C-138을 50mM농도로 포화시킨 DMPO용액에 넣은 후 각 조건에서 측정된 ESR스펙트럼을 Fig. 4에 각각

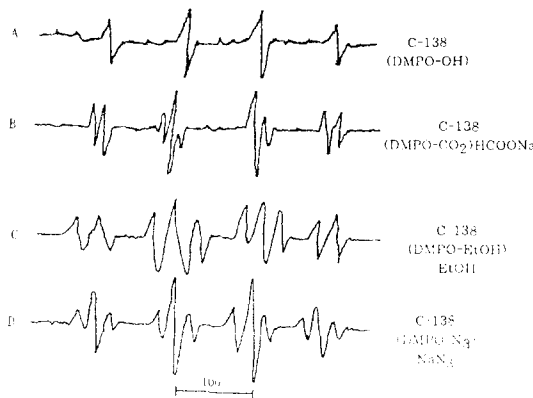


Fig. 4. ESR spectra of spin-trapped radicals obtained by irradiation at 365nm of C-138 saturated solution with DMPO (50 mM) under air (A); C-138 saturated solution with DMPO (50mM) in the presence of HCOONa (B); C-138 saturated solution with DMPO (50mM) in the presence of 2% ethanol (EtOH) (v/v)(C); C-138 saturated solution with DMPO (50mM) in the presence of NaN_3 (10M)⁻³(D).

나타내었다. Fig. 4의 A에서 보는 바와 같이 공기중에서 C-138을 DMPO에 포하시킨 후 365nm의 빛에서 측정된 ESR스펙트럼은 DMPO-OH의 부가 생성물에 해당하는 4중선이 나타났다. 스핀가둠효과를 저해할 수 있는 물질로 알려진 에탄올(EtOH), sodium formate(HCOONa) 및 NaN_3 와 함께 측정된 ESR스펙트럼은 각각 Fig. 4의 B, C, D에 나타내었다.

Fig. 4의 B, C 및 D에서 보는 바와 같이 HCOONa, EtOH, NaN_3 는 DMPO-OH 부가 생성물이 생성되는 과정에서 나타나는 OH^\cdot 의 스핀가둠효과를 잘 보여주고 있다. Fig. 4의 D의 경우 C-138과 DMPO가 반응하여 생성되는 부가 생성물인 DMPO-OH의 생성율이 NaN_3 존재하에서는 약 31% 정도 감소하였다.

Fig. 4의 B, C, D에서와 같이 스핀가둠효과를 나타낼 수 있는 저해제를 넣고 ESR스펙트럼상에서 계산한 결과로부터 저해제에 의한 DMPO-OH 부가 생성물량의

변화를 알아보았다. 저해제인 HCOONa, EtOH, NaN_3 중 가장 저해 효과가 큰 것은 NaN_3 이었고 그 순서는 $\text{NaN}_3 > \text{EtOH} > \text{HCOONa}$ 순이었다. 저해제를 가한 후 UVA를 조사시키면서 측정된 DMPO-OH의 상대적인 양을 ESR 스펙트럼상에서 구한 후 빛의 조사 시간에 대하여 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에는 시료용액 C-138과 C-153 두 가지에 대해서 대표적인 도표만을 나타내었다. 다른 시료용액도 Fig. 5와 같이 측정된 후 빛 조사시간 80분에서의 DMPO-OH 부가 생성물의 저해 효과를 구하여 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 보면 DMPO-OH 부가 생성물의 저해 효과는 모든 시료에서 NaN_3 의 경우 가장 크게 나타난다.

이것은 NaN_3 가 DMPO-OH 부가 생성물의 생성과정에서 생성되는 OH^\cdot 라디칼을 소멸시키는 강한 촉진제¹⁸⁾로 작용하기 때문일 것이다.

Fig. 6에는 superoxide dismutase(SOD)에 의해 생성된 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 라디칼 음(-)이온이 cytochrome c가 환원되는 반응속도를 그림표로 나타내었다.

Cytochrome c의 환원반응속도상수는 광증감제가 없을 경우에는 아주 작았고 반면에 SOD의 농도에 따라

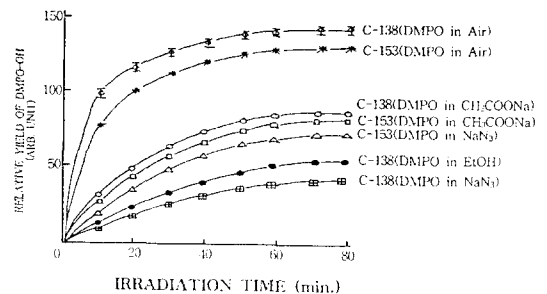


Fig. 5. DMPO-OH adduct yield variation as a function of UVA irradiation time for C-138 and C-153 compounds in air and three kinds of inhibitors.

Table 2. Inhibition ratio(% v/v)^a for DMPO-OH adduct^b production for the samples in various inhibitors at room temperature

Inhibitors	Compounds								
	2-CN	C-138	C-152	C-153	C-314	C-334	C-337	2-C	CP
HCOONa	18	26	19	25	22	20	21	17	15
EtOH	26	29	26	29	28	26	24	20	18
NaN_3	36	31	32	30	36	32	29	32	22

^a All ratio were obtained on the ESR spectrum.

^b Absolute ratio was determined as 100% (v/v) in the case of DMPO-OH production in the air without any other inhibitors.

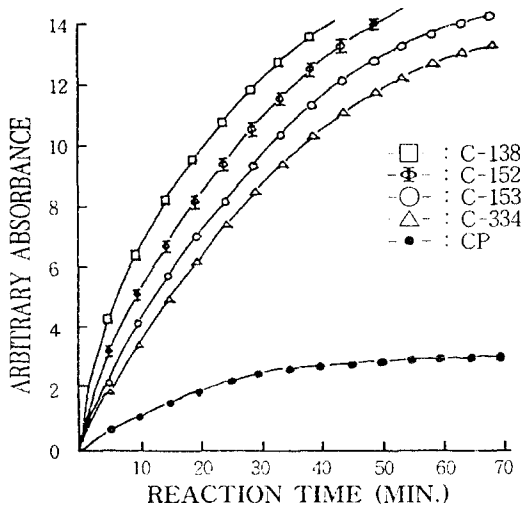


Fig. 6. Rate profile of reduction of cytochrome c by $O_2^{\cdot-}$ for five samples in pH 7.2, 0.1 M phosphate. The concentration of cytochrome c was 50 μ M.

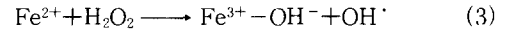
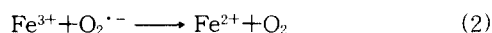
크게 나타났다. 이러한 현상은 SOD가 $O_2^{\cdot-}$ 음이온 라디칼에 대해 일종의 촉매 기질¹⁹⁾로 작용하기 때문에 나타나는 현상일 것으로 생각되고 또한 $O_2^{\cdot-}$ 음이온 라디칼이 다른 산화제에 의하여 OH \cdot 라디칼을 생성하기 때문일 것이다.

이러한 가능성을 알아보기 위하여 ESR상에서 $O_2^{\cdot-}$ 음이온 라디칼을 과산화수소와 반응시켰더니 OH \cdot 라디칼 환원반응이 관측되었다.

따라서 본 연구에서 수행한 SOD가 $O_2^{\cdot-}$ 음이온 라디칼을 산화시키는 역할을 할 것이다. 즉 다음과 같은 Haber-Weiss반응 메카니즘²⁰⁾과 같은 경로를 따라 반응할 것이 예상된다.



그러나 이 반응은 일반적으로 너무 느리게 진행되기 때문에 OH라디칼들이 생성되기에는 효과적이지 못하다. 그러나 Haber-Weiss반응 메카니즘은 전이금속 존재하에서는 두 단계로 진행되며 반응속도를 빠르게 해준다. Gutteridge의 연구 결과²¹⁾에 의하면 전이금속 중에서 Fe^{3+} 이온이 존재할 때 Haber-Weiss 반응은 Fe^{3+} 이 Fe^{2+} 로 환원되면서 다음 식 (2)에서 보는 바와 같이 OH라디칼들을 쉽게 생성한다.

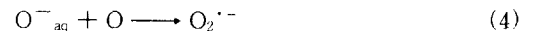


만일 Gutteridge의 반응 메카니즘이 옳다면 OH \cdot 라디칼 생성반응은 본 연구에서 사용한 시료용액에 DMPO를 반응시킨 혼합 용액에서 촉매로 작용하는 Fe^{3+} 이온의 생성을 방해하는 환원제를 첨가하면 영향을 받을 것이다.

본 연구에서 Fe^{3+} 이온에 대하여 강력한 킬레이트제로 작용하는 desferrioxamine 존재하에서 OH \cdot 라디칼 생성반응의 억제 효과를 관측하였더니 Gutteridge의 메카니즘이 적용됨을 확인하였다.

$O_2^{\cdot-}$ 음(-)이온 라디칼이 생성되는 반응을 좀더 정확히 알아보기 위하여 광이온화 반응을 진행시켰다. Superoxide라디칼인 $O_2^{\cdot-}$ 음(-)이온 라디칼이 생성되기 위해서는 산소분자와 반응하기 전에 먼저 수화된 전자(e^-_{aq})를 형성할 수 있는 유리전자의 방출이 일어나야 한다.

수화된 전자가 생성되려면 본 연구에서 사용한 색소 분자들과 먼저 용매화된 전자들로 생성되어야 할 것이다. 용매화된 전자의 존재를 알아보기 위하여 두 가지 방법으로 수화된 전자를 제거하는 물질의 반응성을 검토하였다. 시료용액에 N_2O 기체를 주입시키면서 Fe^{3+} 의 억제 효과를 알아보기 위해 Ross의 방법²²⁾에 따라 $K_3Fe(CN)_6$ 를 첨가하였더니 정반대의 결과를 보였다. 일반적으로 수화된 전자들이 OH \cdot 라디칼로 변하는 과정은 N_2O 기체에 의해 촉진된다. 만일 수화된 전자들이 N_2O 기체가 있는 용액속에서 생성된다면 e^-_{aq} 는 N_2O 기체의 의해 억제되는 효과는 다음 식 (4)와 같은 $O_2^{\cdot-}$ 음(-)이온 라디칼이 생성되는 반응과 경쟁적으로 일어날 것이 예상된다.



본 연구에서 식 (4)에 의해 진행되는 반응의 속도 상수를 구하여 Table 3에 나타내었다.

Table 3에서 보면 N_2O 와 $K_3Fe(CN)_6$ 에 의해 수화된 전자의 소멸 속도 상수는 N_2O 의 경우 $K_3Fe(CN)_6$ 보다 약 2.5~3배 정도 크게 나타난다. 이것은 본 연구에서 사용한 시료와 반응하여 superoxide라디칼 음(-)이온이 생성되는 반응 메카니즘이 단순히 Gutteridge의 메카니즘에 의해서만 진행되지 않음을 뜻한다.

Table 3에서 $K_3Fe(CN)_6$ 와 N_2O 존재 하에서 각 시료의 수화된 전자의 소멸 속도 측정은 레이저 섬광 분해반응(laser flash photolysis : LFP)으로 수행하였다.

Table 3. Rate constants of hydrated electron (e^-_{aq}) quenching reaction by competition between O_2 and $K_3Fe(CN)_6^{a)}$ and $N_2O^{b)}$

Compounds Inhibitors	2-CN	C-138	C-152	C-153	C-314	C-334	C-337	2-C	CP
	Rate Constants ($\times 10^3 M^{-1} \cdot s^{-1}$)								
$K_3Fe(CN)_3$	2.74	2.91	3.01	3.34	2.98	3.24	3.76	4.12	3.78
Rate Constants ($\times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$)									
N_2O	8.29	7.43	8.18	7.46	8.85	9.24	9.10	9.48	9.39

^{a)} The concentration of $K_3Fe(CN)_6$ is $1.54 \times 10^{-3} M$.

^{b)} N_2O gas is saturated while the reaction is proceeding.

LFP에서 $K_3Fe(CN)_6$ 와 N_2O 를 배제한 순수 시료 용액에 대해서 먼저 수화된 전자의 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 순수 시료 용액의 농도는 약 $1.54 \times 10^{-3} M$ 로 하였고 여기에 아르곤 기체를 통과시켜 포함시켰다.

레이저 빔을 시료 용액에 조사한 후 수화된 전자의 최대 흡수 스펙트럼을 구하였더니 715nm에서 나타났다. 레이저 에너지가 $20 \mu J$ 에서 $90 \mu J$ 로 변할 때 광발도는 급격히 증가하였고 레이저 에너지가 큰 쪽에서 두 성분이 존재함을 알 수 있었다. 한 성분은 수명이 약 60ns 이었고 다른 성분의 수명은 약 350ns이었다. 수명이 짧은 성분은 시료 분자가 두 개의 광자에 의해 여기된 후 수화된 전자를 생성한 결과임을 알 수 있었고 수명이 긴 성분은 삼중항 상태에 해당하는 중간체²³⁾인 것으로 생각된다. N_2O 와 $K_3Fe(CN)_6$ 를 시료 용액에 넣은 후 측정된 LFP의 스펙트럼은 N_2O 의 경우 두 개의 광자가 관여하는 반응으로 진행함을 알 수 있었고 $K_3Fe(CN)_6$ 는 한 개의 광자가 관여하는 반응으로 진행함을 알 수

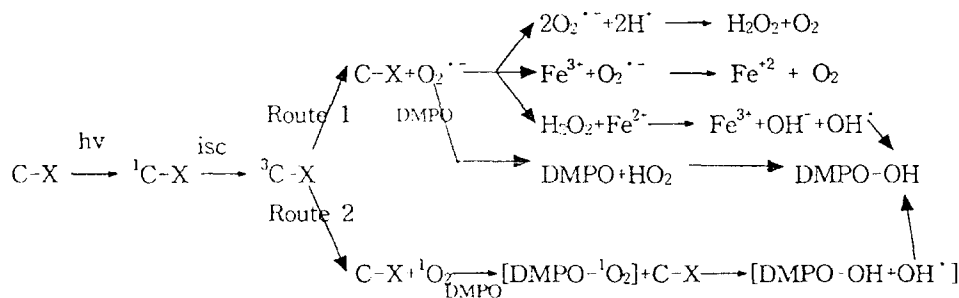
있다.

N_2O 의 경우, 처음에 나타나는 수명이 60ns인 것이 수화된 전자로 확인되었다. LFP상에서 구한 중간체의 소멸 속도로부터 구한 반응 속도 상수를 Table 3에 각각 나타내었다.

N_2O 를 시료 용액에 가했을 때 빠른 반응과정에 해당하는 중간체가 사라져 버렸다. 이와 같은 현상은 2개의 광자가 관여하는 생성반응과 수화된 전자의 소멸반응 때문에 생기는 것이다. O_2 기체가 존재할 때 수화된 전자의 소멸 속도는 증가하였다.

이것은 Bensasson과 Ronfard-Haret이 연구한 Psoralen의 반응에서 관측된 바와 일치하였다. 이상의 반응 메커니즘을 그림표로 나타내면 Scheme 1과 같다.

처음 시료 용액 C-X에 빛을 쬐어 주면 들뜬 단일항상태, ^1C-X 로 되고 이것은 계간 건너기를 삼중항 상태의 ^3C-X 로 된다. 삼중항 상태의 ^3C-X 는 O_2^{*-} 음(-) 이온



C-X : 2-CN, C-138, C-152, C-153, C-314, C-334, C-337, 2-C, CP

isc : intersystem crossing

^1C-X : singlet state intermediate

^3C-X : triplet state intermediate

Scheme 1

라디칼 존재 하에서 DMPO와 반응하든가 혹은 $^1\text{O}_2$ 와 반응하여 최종 생성물인 DMPO-OH로 진행한다.

$^3\text{C-X}$ 가 DMPO와 반응하지 않고 단순히 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 와 반응한다면 앞서 논의한 것처럼 Gutteridge의 반응 메카니즘에 의해 $\text{OH}^{\cdot-}$ 과 OH^{\cdot} 을 생성할 것이다. $\text{OH}^{\cdot-}$ 과 OH^{\cdot} 이 생성될 때 Fe^{3+} 과 Fe^{2+} 이 관여한다. C-X와 $^1\text{O}_2$ 가 반응할 때 DMPO는 $^1\text{O}_2$ 의 결합체로 작용하여 $[\text{DMPO-}^1\text{O}_2]$ 중간체를 만들고 이 중간체는 OH^{\cdot} 과 반응하여 최종 생성물인 DMPO-OH가 된다.

요 약

여러 종류의 coumarin 유도체가 광화학 반응에 의하여 OH^{\cdot} 라디칼을 생성하는 반응을 ESR 및 레이저 섬광분해 반응으로 진행시키고 반응속도 상수를 구하여 반응성과 메카니즘을 알아보았다. 본 연구에서 사용된 9종류의 coumarin 유도체는 모두 OH^{\cdot} 라디칼 생성반응 메카니즘으로 반응이 진행이되었으나 1-ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine은 광조사에 의해 OH^{\cdot} 라디칼 생성반응이 일어나기 전에 분해하여 카르벤 중간체로 변하였다. 9개의 coumarin 유도체는 DMPO-OH스핀 부가 생성물에 해당하는 시그날을 나타내었다. OH^{\cdot} 라디칼을 소진시키는 NaN_3 , EtOH, HCOONa 등은 강한 광증감제로 작용하였다. 수화된 전자의 소멸 속도 상수는 N_2O 를 첨가했을 때가 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 를 첨가했을 때보다 크게 나타났다.

감사의 말

본 연구는 연구비의 일부를 동아대학교 학술지원금으로 수행되었다.

참고문헌

- Nishibe, S. : *Structure Elucidation and Biological Activities of Phenylpropanoids, Coumarine and Ligands from Medicinal Plants, in Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 5, Elsevier, Amsterdam, 505 (1989).
- Musajo, L. and Rodighiero, G. : *Mode of Photosensitizing Action of Furocoumarins, in A. C. Giese(ed).*, *Photophysiology*, Vol. VII, Academic Press, New York, 115-147(1972).
- Parrish, A., Stern, R. S., Pathak, M. A. and Fitzpatrick, T. B. : *Photochemotherapy of Skin Diseases, in Regan, J. D. and Parrish, J. A.(eds.) : The Science of Photomedicine*, Plenum Press, New York, 595-624(1982).
- Averbeck, D. : *Photochem Photobiol.* 50, 859-882 (1989).
- Patahak, M. A. and Fitzpatrick : *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.*, 14, 3-22(1992).
- Makino, K., Hagiwara, T. and Murakami, A. : *Int. J. Radiat. Appl. Instrum., Part C, Radiat. Phys. Chem.* 37, 656-665(1991).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (eds.), : *Free Radicals in Biology and Medicine (Second Ed.)* Oxford University Press(Clarendon), Oxford. (1989).
- Simic, M. G., Taub, I. A., Tocci, J. and Hurwitz, A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 161-167 (1975).
- Butler, J., Koppenol, W. H. and Margoliash, E. : *J. Biol. Chem.*, 257, 10747-10750(1982).
- Koppenol, W.H., van Buuren, K. J. H., Butler, J. and Braams, R. : *Biochim. Biophys. Acta.* 449, 157-168 (1976).
- McCord, J. M., Crapo, J. D and Fridovich, I. in Michelson, A. M., McCord, J. M. and Fridovich, I. (eds.) : *Superoxide and Superoxide Dismutase, Academic Press*, New York, 11-17(1977).
- Sanders, S. P., Harison, S. J., Kupusamy, P., Sylvester, J. T. and Zweier, J. L. : *Free Radic. Biol. Med.* 16, 753-761(1994).
- Kirmse, W., Loosin, K. and Sluma, H.-D : *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 5935(1981).
- Cova, S., Longeni, A., Audreoni, A. and Cubeddu, R. : *IEEE, J. Quant. Electron., QE-19*, 630(1983).
- Louis, T.A., Ripamenti, G. and Laciata, A. : *Rev. Sci. Instrum.* 61, 11(1990).
- Vigny, P., Gaboriam, F., Duquesne, M., Bisagni, E. and Averbeck, D. : *Photochem. Photobiol.* 30, 557-564 (1979).
- Makino, K., Mossoba, M. M. and Riesz, P. : *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 3537-3539(1982).
- Finkelstein, E., Rosen, G. M. and Rauckman, E. J. : *Arch Biochem. Biophys.* 200, 1016(1980).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : in Packer L and Glazer, A. N. (eds.), : *Methodes in Enzymology*, Vol. 186, Academic Press, New York, 1-85(1990).
- Liochev, S. I. and Fridovich, I. : *Free Radic., Biol. Med.* 16, 29-33(1994).
- Gutteridge, J. M. C., : *FEBS Lett.*, 19-23(1985).
- Ross, A. B. : *Natl. Stand. Ref. Data. Ser., Natl. Bur. Stand (US)*, 43, Suppl (1975).
- Ronfard-Haret, J.C., Averbeck, D., Bensason, R. V., Bisagni, E. and Land, E. J. : *Photochem. Photobiol.* 35, 479-489(1982).