

## Singlet Oxygen에 의한 Oxygenation 반응에 미치는 Keto-carotenoids의 Quenching Activities

李 泰 寧 · 李 大 衡  
(化學教育科)

### I. 서 론

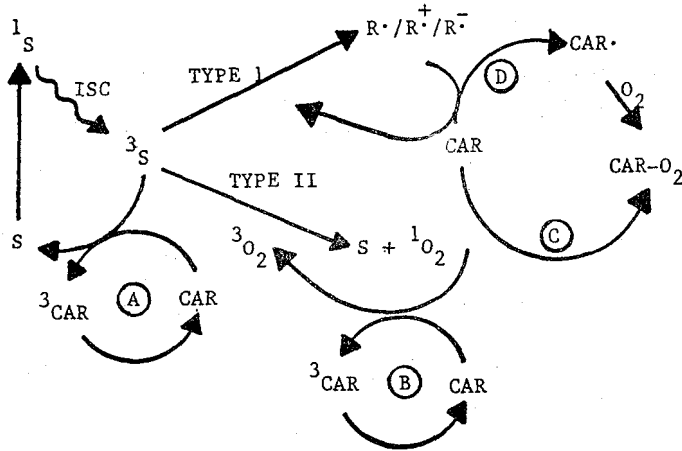
식물·동물·미생물계에 다양하게 분포된 카로티노이드는 그 화학적 성질이나 구조뿐 아니라 생물학적·생리학적 중요성으로 말미암아 일찍부터 많은 화학자들의 관심의 대상이 되어 왔다(P. Karrer and E. Jucker, 1948; O. Isler, 1971; G. Britton and T.W. Goodwin, 1981).

자연계에 널리 분포된 이러한 카로티노이드들의 역할에 대해서는 광합성의 보조색소로서의 생물학적 기능과 카로티노이드중 일부의 것이 Vitamin A 활성을 가짐으로 인한 영양학적면에서 주목되었다. 즉,  $\beta$ -ionone 고리를 2개 가진  $\beta$ -carotene을 위시하여 고리가 1개인  $\alpha$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, cryptoxanthin,  $\beta$ -apo-carotenal 등이 Vitamin A 활성을 가진 provitamin A로 중요시되었다.

그러나 1955년 Stanier 등에 의해 식물 및 광합성균류중의 광합성 조직에 카로티노이드가 널리 존재하는 것은 chlorophyll이나 bacteriochlorophyll로부터 광합성의 부반응으로 일어나는 photodynamic action으로 부터 세포를 보호하기 위함이라는 가설(R.Y. Stanier et al, 1955)이 제창된 후, 카로티노이드의 생체보호작용에 대한 관심이 높아왔다.

카로티노이드의 생체 보호 메카니즘에 대해서는 삼중항 상태의 광증감제에 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 에너지전달 메카니즘인 Type II가 관여할 가능성을 고려하여 Fig. 1과 같이 제안하고 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( $O_2^-$ ) 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; R.C.



**Fig. 1.** Mechanism of Carotenoid protection. Carotenoids (CAR) can quench triplet sensitizer A, quench  $^1O_2$  B, chemically react with  $^1O_2$  C, or react with radical intermediates D, C and D presumably result in the bleaching of the carotenoid pigment. ISC=intersystem crossing; S=sensitizer; R=an oxidizable substrate. N.I. Krinsky and S.M. Deneke, 1982.

Straight and J.D. Spikes. 1985). 이들중  $^1O_2$ 은 광합성이나 high energy 조사라는 특수한 환경 아래서뿐 아니라 생체내에서 superoxide anion radical을 거쳐 효소반응으로 생성될 수 있음은 물론, 백혈구의 식균작용(N.I. Krinsky. 1982)시나 면역학적인 자극(S.J. Klebanoff. 1980)에 의해서도 생성되어 조직의 염증, 세포막의 산화적 변질등에 관여함이 최근에 밝혀져 있다.

한편, Foote 등은  $\beta$ -carotene이  $^1O_2$ 을 효과적으로 quenching시킴을 관찰한 바 있다. (C.S. Foote and R.W. Denny. 1968) 그후 여러가지 카로티노이드 들이 나타내는  $^1O_2$ 에 대한 quenching activity가 측정되고 되고 있다. 즉, lycopene과  $\beta$ -apo-8'-carotenal의  $^1O_2$ 에 대한 quenching rate ( $kq$ )를 비롯하여 (C.S. Foote et al. 1970a), all-trans-retinal, lutein,  $\beta$ -carotene, synthetic  $C_{30}$ ,  $C_{35}$ ,  $C_{50}$ ,  $C_{60}$  카로티노이드의  $kq$ 값이 구해졌고, 이로부터 카로티노이드의  $^1O_2$  quenching activity는 이중결합의 conjugation수와 관련이 있음이 제안된 바 있다 (C.S. Foote, Y.C. Chang and R.W. Denny. 1970b).

Mathew-Roth 등은 *Sarcina lutea*의 wild type, mutant 7과 93a로부터 추출한 phytoene, phytofluene, P-422, P-438,  $\beta$ -carotene, isozeaxanthin 등의  $^1O_2$  quenching rate를 보고하였다(M.M. Mathew-Roth et al. 1974).

이외에도  $\beta$ -carotene의  $kq$ 값은 용매조건과 광증감제를 달리하여 여러 사람에 의해 구해졌으나(C.S. Foote et al. 1972; P.B. Merkel and Kearns. 1972; D.J. Carlsson et al. 1974; A. Farmilio and F. Wilkinson. 1972. 1973a. 1973b; I.B.S. Mathenson et al. 1974), 카로티노이드의 구조와  $^1O_2$  quenching activity와의 관계를 조사한 연구는 Foote의 보고 이외에는 별로 없다.

본 연구에서는 전복(*Haliotis discus hannai*)의 내장중에서 lipoprotein과 결합하고 있는 카로티노이드는 먹이의 pattern을 반영하는 다양한 free form의 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 바 있다(S.N. Park, 1984). 또한 새우(*Trachypenaeus curvirostris*)의 색소 carotenoid인 astaxanthin과 그 ester 사이의  $^1O_2$  quenching activity 차이도 in vitro에서는 없음을 밝힌바 있다(S.N. Park, 1984). 그리고 canthaxanthin과 그의 환원형인 4-hydroxy-4'-keto- $\beta$ -carotene, 4,4'-dihydroxy- $\beta$ -carotene 사이에 볼 수 있는 화학구조와 활성도간의 관계를 고찰할 때 carbonyl기는  $^1O_2$ 의 quenching activity에 영향을 미치지만 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 rate constant를 구하고 그 구조와의 관계를 검토하였다. 본 연구에 사용한 카로티노이드들의 구조는 Fig. 2와 같다.

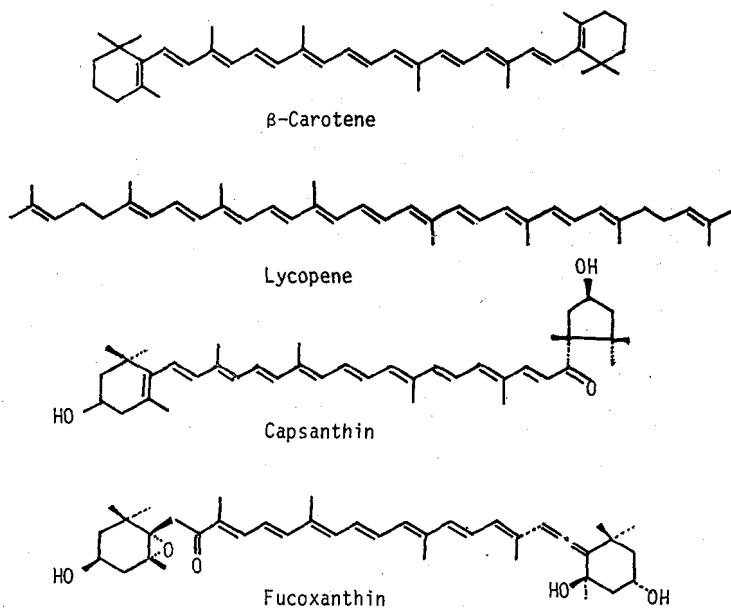


Fig. 2. Structures of carotenoid pigments used in the quenching studies of  $^1O_2$ .

## II. 실험

### 1. 사용기기 및 시약

가시부 전자 흡수 스펙트럼은 Varian Techtron Model 635 UV-Visible spectrophotometer를 사용하여 얻었으며, photo-oxygenation 반응의 광원은 300W, 82V FHS tungsten lamp를 사용하였다. 단색광은 Bausch and Lomb사의 high intensity monochromator (1350 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 실험실에서 분별 증류를 통해 재정제하였으며 기타 특별히 언급하지 않는 한 시약은 시판 일급 시약을 그대로 사용하였다. photo-oxygenation에 사용한 메탄올은 실험실에서 재증류하였고 벤젠은 Kanto chemical Co.의 일급시약을 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>로 탈수 처리한 후 증류하여 사용하였다. 1,3-diphenylisobenzofuran(DPBF)는 메탄올에서 재결정한 것을 썼으며, rose bengal은 Aldrich 제품을 그대로 사용하였다.

### 2. 재 료

$\beta$ -carotene은 일본 Wako사 제품을 Ca(OH)<sub>2</sub>를 흡착제로 한 column으로 분리 정제하였으며, capsanthin 및 그 esters는 1984년 9월초 시중에서 구입한 증류 미상의 붉은 고추에서 추출, 정제하였다. Lycopene은 8월말 시중에서 구입한 수박에서, fucoxanthin은 10월초 시중에서 구입한 건미역에서 각각 분리 정제한 것을 사용하였다.

### 3. 실험방법

#### (1) 카로티노이드의 분리

a)  $\beta$ -carotene: Ca(OH)<sub>2</sub>를 흡착제로 한 column에서 헥산—에틸에테르(10:1) 용매계로 분리한  $\beta$ -캐로틴 획분을 모아서 다시 헥산—에틸에테르(10:1)로 전개한 TLC의 chromatogram은 Fig. 3의 (1)과 같다. 이렇게 분리한  $\beta$ -캐로틴 성분의 가시부 흡수 스펙트럼은 n-헥산에서  $\lambda_{max}$ 는 451, 478nm였고, 메탄올에서는 433, 451, 480nm였다. 또한 95% 메탄올—헥산간의 분배시험(F. J. Peracek and L. Zechmeister. 1956)에서는 완전히 헥산층으로 분배하였으며, epoxy기의 유무를 찾는 epoxy test(P. Karrer and E. Jucker. 1950) 결과는 음성이었다.

b) Capsanthin과 그 esters: 고추 과피의 아세톤 전 추출물을 헥산—에틸에테르(2:3)을 사용하여 TLC로 분리한 chromatogram은 Fig. 3의 (2)와 같다. 이중 분광학적 성질로 미루어 볼때 capsanthin과 capsorubin의 혼합물로 추측되는 색소띠 3번을 분취, 헥산—에틸에테르

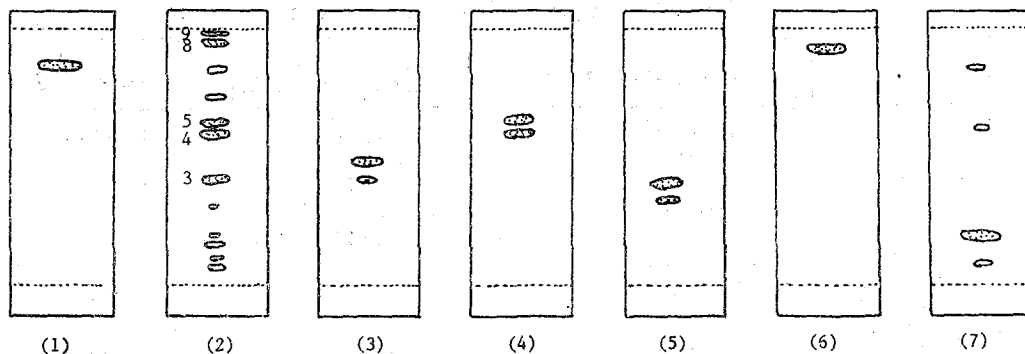


Fig. 3. Thin-layer chromatograms of various carotenoids.

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 keton=4 : 1

르(1 : 8)로 전개하여 두 성분으로 분리하였다(Fig. 3의 (3)). Fig. 3의 (4)는 capsanthin과 capsorubin의 monoester로 추측되는 색소띠 4, 5번을 헥산—에틸에테르(2 : 3)으로 전개 분리한 것이며, (5)는 capsanthin과 capsorubin diester 혼합물을 헥산—에틸에테르(4 : 1)로 전개한 것이다. Capsanthin과 그 mono-, diester는 chromophore 부분이 모두 같기 때문에 가시부 흡수 스펙트럼에서  $\lambda_{max}$ 는 메탄올에서 473nm, 벤젠에서는 486nm로 동일하게 나타났다. 헥산—95% 메탄올간의 분배시험에서 5 : 95의 것은 capsanthin으로, 88 : 12의 것은 monoester로, 90 : 10으로 분배된 것은 diester로 각각 추정되었다.

c) Lycopene: 수박의 n-헥산 전 추출물을 n-헥산을 용매로 사용한 TLC chromatogram은 Fig. 3의 (6)과 같다. 가시부 흡수 스펙트럼은  $\lambda_{max}$ 가 벤젠에서는 458, 487, 521nm, n-헥산에서는 444, 472, 503nm로 나타났으며 분배시험에서는 완전히 헥산층으로 분배되었다.

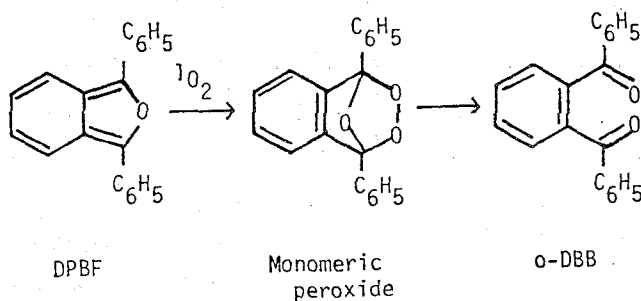
d) Fucoxanthin: 건미역의 아세톤 추출물을 농축시킨 것을 n-헥산으로 추출하여 chlorophyll을 제거하고, 용매계 methylene chloride-ethyl methyl ketone(4 : 1)을 사용하여 전개한 chromatogram은 Fig. 3의 (7)과 같다. 가시부 흡수 스펙트럼에서의  $\lambda_{max}$ 는 에탄올에서 450nm, 메탄올에서 447nm, 헥산에서는 427, 450, 478nm였다. Epoxy test 결과는 양성이었으며, 분배시험에서는 hydroxy기가 3개나 되어 완전히 95% 메탄올 층으로 분배하였다. 분리한 각 카로티노이드들의 성질을 정리하면 Table 1과 같다.

## (2) $^1O_2$ quenching 실험

Photooxygenation의 실험장치는 광원(300W Tungsten lamp)과 monochromator (Bausch and Lomb, 1,350 grooves/nm, 300nm blaze) 및 반응용기로 구성되었다.

Table 1. The properties of isolated carotenoids.

Pigment	Absorption maxima	Partition ratio in n-hexane-95% MeOH	Epoxy test
$\beta$ -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



$^1O_2$ 의 발생을 위해 광증감제로서 rose bengal을 사용하였으며, 조사광은 메탄올 용액의 경우는 556nm, 벤젠-메탄올 용액의 경우는 559nm였다. 발생된  $^1O_2$ 의 양의 측정은  $^1O_2$ 와의 반응으로 인한 DPBF의 감소량을 측정함으로써 이루어졌다. DPBF는  $^1O_2$ 과 physical quenching없이 정량적으로 반응하여 monomeric peroxide가 생기고 이것이 실온에서 분해하여 o-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 반응용액중의 증발을 보완하기 위해 미리 반응용액과 같은 용매, 즉 메탄올 혹은 벤젠-메탄올(3:5)이 들어있는 용기를 거치도록 하였다. photooxygenation하는 동안 DPBF의 농도 감소는 DPBF의 흡광도 변화로 관찰하였다. 조사전과 조사후 4분에 메탄올 용액에서는 410nm, 벤젠-메탄올 용액에서는 413nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 실험에서 rose bengal의 농도는  $6.5 \times 10^{-5}M$ , DPBF는  $3.25 \times 10^{-5}$ ,  $1.95 \times 10^{-5}$ ,  $1.3 \times 10^{-5}$ ,  $0.65 \times 10^{-5}M$ , 카로티노이드는  $5.0 \times 10^{-6}$ ,  $3.75 \times 10^{-6}$ ,  $2.5 \times 10^{-6}$ ,  $1.5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-6}M$  등으로 조건을 통일시켜 행하였다. 각 카로티노이드의 농도 계산에 사용한 extinction coefficient는 Table 2와 같다.

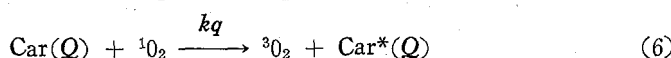
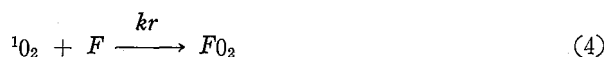
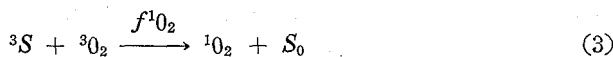
Table 2. Extinction coefficients used in determining pigment concentration.

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

\* J.G. Grasseli, W.M. Ritchey. 1973.

† in this study

본 실험의 photooxygenation에 관여하는 반응단계는 다음과 같이 생각할 수 있다.



여기서  $S$ 는 증감제로 rose-bengal을 나타내며,  $F$ 는  ${}^1O_2$ 과 정량적으로 반응하여 photooxygenation을 일으키는 DPBF,  $Car(Q)$ 는  ${}^1O_2$ 의 quencher로서 그 능력을 비교 검토하고자 하는 각종 카로티노이드를 나타낸다. 이와같은 반응 단계에서 steady-state approximation에 의한 반응속도는 다음과 같다.

$$-\frac{d[F]}{dt} = I_a \cdot \Phi_{ISC} \cdot f^1O_2 \cdot \frac{kr[F]}{kr[F] + kq[Q] + kd} \quad (7)$$

$I_a$ 는 증감제 rose bengal에 의한 빛의 흡수율(mol·quanta/sec)이며,  $\Phi_{ISC}$ 는 증감제의 삼중항 상태의 양자수득율이고,  $f^1O_2$ 는 삼중항 상태 증감제로 부터의  ${}^1O_2$  수득율을 나타낸다. 이  $f^1O_2$  값은 많은 유기용매 중에서 삼중항 상태의 quencher가 존재하지 않을 때는 대략 1.0의 값을 가짐이 밝혀져 있다(P.B. Merkel and D.R. Kearns. 1971).

카로티노이드에 의한  ${}^1O_2$  quenching은 DPBF의  ${}^1O_2$  quenching과 경합하기 때문에 카로티노이드에 의해 DPBF의 흡광도 혹은 형광의 감소가 억제된다. 증감제를 넣지 않고 DPBF만의 메탄올 용액에 빛을 조사하였을 때는 DPBF의 흡광도 감소는 없었으며, 정제된 질소를 포화시킨 메탄올 용액에 rose bengal과 DPBF를 넣고 계속 질소 존재하에서 빛을 조사해도

DPBF의 흡광도 감소는 거의 없음을 이미 밝혀져 있다(S.N. Park. 1984).

(7)식에서 농도가  $10^{-5} \sim 10^{-6}M$  정도로 매우 묽을 때는 다음과 같은 1차 반응속도식을 얻을 수 있다.

$$-\frac{d[F]}{dt} = K\left(\frac{kr[F]}{kq[Q]+kd}\right) \quad (8)$$

여기서  $[F]$ 의 값 변화에 따른  $-d[F]/dt$  값의 변화를 그래프로 그리면 기울기  $S$ 는 (9)식과 같다.

$$S = K\left(\frac{kr}{kq[Q]+kd}\right) \quad (9)$$

(9)식에서 quencher  $Q$ 가 없을 때의  $S_0$ 와 quencher  $A$ 가 있을 때  $S_q$ 의 비를 구하면 (10)식과 같은 Stern-Volmer식을 얻을 수 있다.

$$S_0/S_q = 1 + \left(\frac{kq}{kd}\right)[Q] \quad (10)$$

이때  $S_0/S_q$  vs  $[Q]$ 의 그래프에서 기울기  $kq/kd$ 를 얻고 이미 알려진 메탄올 용액에서의  $kd$  값인  $1.8 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ (R.H. Young et al. 1971)을 대입하면 곧 카로티노이드의 quenching rate constant인  $kq$ 값을 구할수 있다.

### III. 결 과

#### 1. $\beta$ -Carotene의 $^{1}O_2$ quenching rate constant

비교를 위해 사용한  $\beta$ -carotene의 메탄올 용액에서 DPBF 농도에 대한 시간에 따른 DPBF 농도 감소의 그래프는 Fig. 4와 같으며,  $\beta$ -carotene의 농도에 대한  $S_0/S_q$ 의 그래프는 Fig. 5와 같다. Stern-Volmer식에 의하여 구한  $\beta$ -carotene의  $kq$ 값은  $2.36 \times 10^{10}(M^{-1} sec^{-1})$ 로 다른 연구자들이 구한 값과 비교한 것이 Table 3이다. 측정치의 차이는 사용한 quencher의 종류, 용매와 원료의 순도 차이에서 유래되는 것이 그중 큰 원인이 될 것으로 본다.

Table 3.  $Kq$  of  $\beta$ -carotene

$Kq(\times 10^{10} M^{-1} S^{-1})$	Solvent	Quencher
2.36	MeOH	DPBF*
2.0	benzene	DPBF <sup>1)</sup>
1.3	benzene	DPBF <sup>2)</sup>
2.6	CS <sub>2</sub>	Anthracene <sup>3)</sup>
2.3	benzene-MeOH(3 : 2)	Rubrene <sup>4)</sup>
3.0	freon-113	DPBF <sup>5)</sup>

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

\* in this study



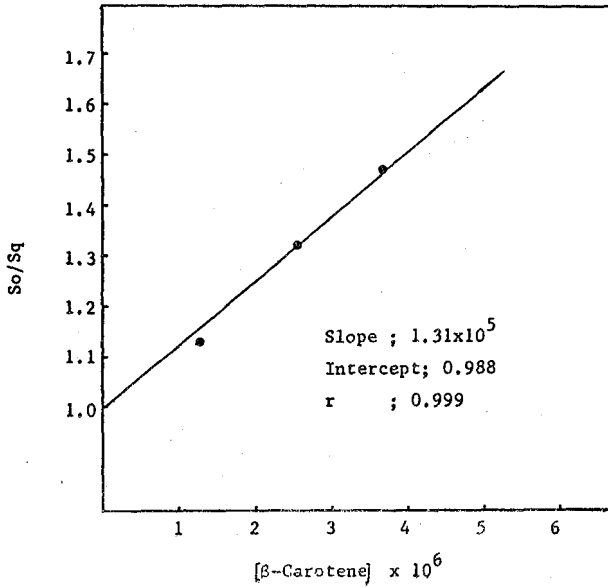


Fig. 4. Plot of  $S_0/S_q$  vs  $[\beta\text{-Carotene}]$

Irradiation wavelength; 556nm  
 Irradiation time ; 4min.  
 Solvent ; MeOH

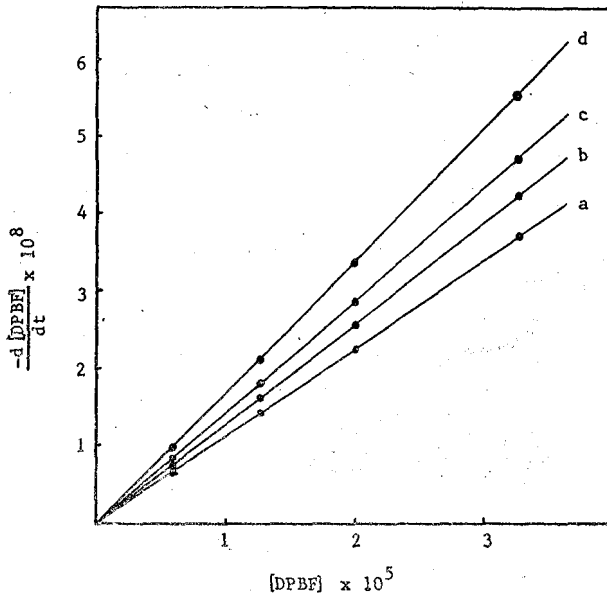


Fig. 5. Plot of  $-\frac{d[\text{DPBF}]}{dt}$  vs  $[\text{DPBF}]$

for competitive quenching of  $\beta\text{-Carotene}$  in MeOH.

Irradiation wavelength; 556nm  
 Irradiation time ; 4 min.

$\beta\text{-Carotene}$  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

## 2. Capsanthin과 그 esters의 quenching rate constants

메탄올 용액에서  $^1\text{O}_2$  quencher의 농도를 달리 했을때 DPBF의 감소 속도에 미치는 capsanthin과 capsanthin monoester의 영향을 측정할 후, Stern-Volmer식에 의해 구한 capsanthin

의  $kq$  값은  $2.29 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이며 capsanthin monoester의 값은  $2.23 \times 10^{10}$ 였다. 모두  $\beta$ -carotene에 못지않은 큰 값의  $^1\text{O}_2$  quenching activity를 보여주었다. 또한 두 카로티노이드 구조의 차이점인 hydroxy group과 ester group 도입에 따른  $^1\text{O}_2$  quenching activity의 차이는 lutein과 그 ester, astaxanthin과 그 ester에 있어서와 마찬가지로 거의 없음을 보여주고 있다. 벤젠-메탄올(3:5) 용액에서 capsanthin monoester와 diester의  $kq/kd$  값은 각각  $1.33 \times 10^5$ ,  $1.26 \times 10^5$ 으로 메탄올에서 보다는 작았지만 메탄올 용액에서와 같은 경향을 나타냈다. 벤젠-메탄올에서의  $kd$  값은 메탄올 용액에서 측정된  $kd$  값과는 비교할 수는 없다. 각 용매중에서의  $^1\text{O}_2$  life time과 diffusion rate에 viscosity가 미치는 차이등 용매효과가 크게  $kd$  값에 반영되기 때문이다. 그러나  $kq/kd$  값은  $kq, kd$ 의 용매효과가 서로 상쇄된 값이므로, 다른 용매계에서 측정된 값을 비교하는데 사용될 수 있는 parameter이다.

### 3. Lycopene의 quenching rate constant

벤젠-메탄올(3:5) 용액에서  $^1\text{O}_2$  quencher의 농도를 달리 했을 때 DPBF의 감소 속도에 미치는 lycopene의 영향을 측정 한 후, Stern-Volmer식에 의해 구한 lycopene의  $kq/kd$  값은  $2.06 \times 10^5$ 으로  $\beta$ -carotene 보다도 더 좋은  $^1\text{O}_2$  quencher임을 보여 주었다.

### 4. Fucoxanthin의 quenching rate constant

메탄올 용액에서  $^1\text{O}_2$  quencher의 농도를 달리 했을 때 DPBF의 감소속도에 미치는 fucoxanthin의 영향을 측정 한 후 Stern-Volmer식에 의해 구한  $kq$  값은  $0.96 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로 lycopene,  $\beta$ -carotene은 물론 capsanthin 및 그 ester들보다 훨씬 낮은  $^1\text{O}_2$  quenching activity를 보여주었다.

본 연구에서 구한 카로티노이드들의  $^1\text{O}_2$ 에 대한 quenching rate를 정리하면 Table 4와 같다.

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

Carotenoids	$Kq/Kd(\times 10^5)$	$Kq(\times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1})$	Solvent
$\beta$ -Carotene	1.31	2.36	MeOH
Capsanthin	1.27	2.29	MeOH
Capsanthin monoester	1.24	2.23	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

## IV. 논 의

실험에 사용한 각 카로티노이드의 이중결합 수 및 carbonyl기의 수는 Table 5와 같다.

1970년 Foote 등은 all-trans retinal, lutein,  $\beta$ -carotene, synthetic C<sub>30</sub>, C<sub>35</sub>, C<sub>50</sub>, C<sub>60</sub> 카로티노이드의  $kq$ 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 phytoene, phytofluene, P-422, P-438,  $\beta$ -carotene, isozeaxanthin 등의  $kq$ 를 구하여 Foote의 주장을 뒷받침하며, lutein과 P-422가 2개의 hydroxy기를 갖고 있으면서 매우 좋은  $^1O_2$  quencher임을 설명하기 위해 이중결합 수보다는 카로티노이드의 ionization potential이  $^1O_2$ 의 quenching에 더 영향을 미친다고 제안한 바 있다(M.M. Mathew-Roth et al. 1974).

$\beta$ -Carotene과 lycopene을 비교해 보면 이중결합의 conjugation 수는 모두 11개로 같다. 그러나  $\beta$ -carotene의 5위치 methyl기의 수소는 8위치 탄소와 결합한 수소와 van der Waals 반경이내에 있기 때문에 steric hinderance로 인해  $\beta$ -ionone 고리는 conjugation된 사슬과 동일 평면을 이루지 못하고 약 45° 각도로 뒤틀리게 된다. 즉  $\beta$ -carotene은  $\pi$ -전자와 효과적인 overlapping을 이루지 못하여 lycopene보다 큰  $\pi$ -ionization potential을 갖고 덜 좋은  $\pi$ -electron donor이다. 따라서  $\beta$ -carotene의  $^1O_2$  quenching activity는 lycopene 보다 낮다. 물론 본 실험에서 용매계의 차이로 인해 lycopene의  $kq$ 값을 구하지 못하였으나 다른 연구자들에게 의하면 용매의 diffusion rate와 같은  $3 \times 10^{10}$  정도로 알려져 있다(C.S. Foote et al. 1970a, 1970b).

Capsanthin과 그 ester들의 이중결합 수는 carbonyl기를 포함하여 모두 11개로  $\beta$ -carotene에 못지 않은  $^1O_2$  quenching activity를 보여 주는데 이것은 이중결합 수가 같은 4,4'-dihydroxy- $\beta$ -carotene의 결과와도 일치한다. Fucoxanthin은 conjugation수가 9개 뿐이므로  $kq$ 값은 급격히 감소하여  $0.96 \times 10^{10}$ 으로 가장 낮았는데 이 값은 이중결합수가 같은 Foote의 C<sub>30</sub> 카로티노이드의 값과 비슷한 결과를 보여주었다. 결국 이중결합의 conjugation 수는

Table 5. Number of functional group in the carotenoids under studies.

Carotenoid	No. of conjugated double bonds	No. of carbonyl groups	No. of hydroxy groups
$\beta$ -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

ionization potential에 가장 큰 영향을 미치므로 conjugation 수와  $^1O_2$  quenching activity의 관계는 ionization potential로도 설명이 가능하다. Capsanthin과 그 ester들은 hydroxy기 혹은 ester기가 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 hydroxy 혹은 ester기의 영향은 바로 lutein 및 그 esters의 경우(S.N. Park, 1984)와도 같은 것이다. 그러나 astaxanthin과 그 esters간의  $^1O_2$  quenching activity는 astaxanthin의 hydroxy기가 allylic 위치에 있기 때문에 ionization potential에 미치는 상반되는 영향 즉 inductive effect와 resonance effect로 인하여  $kq$ 값은 비슷하나 resonance effect가 크게 나타났다는 보고와는 다른 경우이다. 하지만 capsanthin과 그 esters, lutein과 그 esters의  $^1O_2$  quenching activity가 in vitro 메탄올 용액에서 차이가 나지 않는다 하더라도 생체내에서도 꼭 그렇다고 볼수는 없다. 생체내에서 carotenoid는 긴 alkyl chain이 cell membrane에 삽입되어 막을 보호에 유리할 수 있으므로 hydroxy기 보다는 ester 형태의 hydrophobic한 것이 더 바람직할 수도 있기 때문이다. 이런것은 카로티노이드가 red-cell의 photohemolysis에 미치는 영향을 검토하면 가능하리라 보는데 현재까지 이 방면에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않다.

## References

- Britton, G. and Goodwin, T.W. (1981). "Carotenoid Chemistry and Biochemistry", Pergamon Press.
- 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.
- 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. Autor, ed.), Academic Press, N.Y., p. 21.
- 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. A1.*, **11**, 1927.

Isler, O. (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.

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 Workshop on Photobiology, Korea), p. 67.

Krinsky, N.I. and S.M. Denke. (1982). *J. Natl. Cancer Inst.* **69**, 205.

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.

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.

Park, S.N. (1984). "Quenching Effect of Carotenoids on Singlet Oxygen", Master Thesis, Seoul National Univ.

Peracek, F.J. and Zechmeister, L. (1956). *Anal. Chem.*, **18**, 1484.

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.

Straight, R.C. and Spikes, J.D. (1985). "Singlet Oxygen, Vol. IV, Reaction Modes and Product, Part 2". (Frimer, A.A. ed), CRC Press, p. 91.

Young, R.H., Wehrly, K. and Martin, R.L. (1971). *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5774.

Quenching Activities of Keto-carotenoids on the  
Oxygenation by Singlet Oxygen.

Tae Young Lee and Dae Hyung Lee

**Abstract**

The singlet oxygen quenching activities of various carotenoids obtained from natural products were studied. The  $^1\text{O}_2$  quenching rate constants ( $K_q$ ) of  $\beta$ -carotene, capsanthin, capsanthin monoester, capsanthin diester and fucoxanthin were determined and compared quantitatively. The relationship between the structures of carotenoids and its  $^1\text{O}_2$  quenching activities were discussed in the light of the substituent effects on the structure.

In methanolic solution, the  $K_q$ 's of capsanthin, capsanthin monoester and fucoxanthin were shown to be  $2.29 \times 10^{10}$ ,  $2.23 \times 10^{10}$  and  $0.96 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  respectively, while the  $K_q$  of  $\beta$ -carotene was determined as  $2.36 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ . And the  $K_q/K_d$  values of capsanthin monoester, diester and lycopene in benzene-methanol (3:5) solution were  $1.33 \times 10^5$ ,  $1.26 \times 10^5$  and  $2.06 \times 10^5$ , respectively.

Under the experimental condition, there was no pronounced differences in  $^1\text{O}_2$  quenching activity between capsanthin and capsanthin esters. The  $^1\text{O}_2$  quenching activity of fucoxanthin was shown to be two-fifth of the  $\beta$ -carotene's.

These results indicated that the activity of quenching decreased as the introduction of hydroxy or carbonyl group.

Carotenoid-fatty acid esters showed lower quenching activity than corresponding free carotenoids, and diester was less active than monoester. These results implied that the existence of long fatty acid chain in carotenoid ester molecules might reduce the quenching activity by the reduction of the effective cross-section of the reaction.