

카로티노이드 1O_2 퀸칭 효과

朴 秀 男 · 李 泰 寧

(太平洋化學技術研究所 · 서울大學校)

I. 서 론

생체내에서 생성되는 organic free radical 및 활성 산소종인 O_2^- , 1O_2 , OH·, H_2O_2 , HOCl 은 세포의 살상, 돌연변이 유발, 발암등과 관계가 있음이 인식되고 있다.¹

활성이 큰 산소종과 free radical 들은 여러가지 고에너지의 복사선에 의해서도 생성이 되나 근 자외선이나 가시광선에 의해서도 식물체의 광합성계인 chlorophyll, phaeophytin, 동물의 protoporphyrin, hematoporphyrin 등 porphyrin 고리화합물은 물론 많은 천연색소들 또는 합성 염료의 존재하에서 산소 및 생체 분자들로 부터 만들어지고 있다.² 광증감 작용 (photosensitization) 을 하는 이들 색소 분자는 광에너지 흡수에 의해 들뜬 단일항 상태는 intersystem crossing 을 거쳐 삼중항 상태로 된다. 이 삼중항 상태의 분자는 그 에너지를 삼중항 상태의 산소분자에 전달하든가 또는 전자의 전달, 혹은 다른 분자로 부터 H원자들을 탈취함으로써 활성 산소종인 이들 1O_2 , O_2^- 또는 free radical 을 발생하게 된다.³

이들 활성분자종 또는 radical 은 세포막에 대한 손상, 막지질의 peroxidation, 그리고 단백질, 핵산 (특히 Guanine), 탄화수소등 생체 고분자 물질의 파괴에 의해서 앞서 언급한 death of cell, mutagenesis, carcinogenesis, ageing of tissues 의 원인이 된다고 한다.^{1,4}

최근에는 hemin, hematoporphyrin 으로 부터 유도된 hematoporphyrin 유도체 (HpD) 와 같은 광증감제의 선택적 세포의 파괴 유발로 암 치료 목적으로의 연구도 활발히 시도되고 있다.⁵ 생체에 대한 1O_2 의 유해한 반응성이 인식된 후 Foote 등은 β -carotene 이 1O_2 을 효과적으로 quenching 시킴을 관찰했고⁶, Krinsky 등 (1973) 이 liposome 에 대한 photo-dynamic damage (즉 leakage of glucose, lipid peroxidation) 를 β -carotene 이 방어함을 보고한 후 카로티노이드의 quenching 작용이 주목되고⁷ 광합성과정중 부생되는 1O_2 에 대한 식물체의 보호제로의 카로티노이드의 생물학적 의의가 새로 인식될 뿐 아니라 미생물에 대한 생체 실험에서도 그 보호작용이 입증되고 있다.⁸ 최근에 Peto 등 (1982) 은 전염병학 연구를 통해 카로티노이드가 anti-cancer activity 가 있을 것이라는 가설을 발표한 바 있고⁹ Mathews-Roth (1982)¹⁰, Seifter (1982)¹¹ 등은 mice 의 Tumor 유발률이 카로티노이드 투여로 감소됨을 보고하고 있다.

이와같이 카로티노이드는 free radical 이나 1O_2 에 의한 생체 손상을 억제시켜 주는 보호작용이 있음을 Fig.1 과 같이 Krinsky 는 설명하고 있다.

본 연구에 앞서 전복 내장중에서 발견되는 먹이의 pattern 을 반영하는 다양한 카로티노이드 분포와는 대조적으로 lipoprotein 결합 카로티노이드는 비교적 짧은 사슬의 지방산인

lauric 및 myristic acid의 lutein ester 형이 많음을 관찰 보고한 바 있다.¹² 그리고 패류 내장에서 발견되는 chlorophyll의 대사 산물인 녹색 색소가 두드러진 광증감작용을 하고 있음에 비추어 lutein의 lauric, myristic ester로의 대사는 광선하에서 발생될수 있는 1O_2 에 대한 방어의 합목적성을 함축하고 있지 않은가 생각되었다. 본 연구에서는 quenching activity를 비교 검토함과 아울러 무척추동물인 갑각류 색소 단백질 성분으로 그 분포가 넓은 astaxanthin도 역시 주성분이 astaxanthin의 fatty acid ester임을 확인하였다. 그러나 이 경우에는 전복 내장과는 달리 지방산 분포가 triglyceride의 fatty acid의 분포와 그리 큰 차이가 없는 것이 전복 내장의 경우와는 대조적임을 알 수 있었다. 본 실험에서는 lutein ester, astaxanthin ester가 free carotenoid와 in vitro (여기서는 MeOH)에서 1O_2 에 대한 quenching 능력의 차가 있나 여부를 살폈다. 그리고 이와 아울러 C_{40} 카로티노이드의 치환기의 도입이 1O_2 quenching 능력에 미치는 영향, 즉 치환기의 효과와 도입된 그 위치의 영향을 계통적으로 검토하기 위하여 4,4'-diketo- β -carotene인 canthaxanthin과 lutein의 isomer라고 볼 수 있는 mono hydroxy 및 dihydroxy- β -carotene의 1O_2 에 대한 quenching activity를 kinetic study를 통해 정량적으로 실험한 결과를 보고하고자 한다.

본 연구에서 사용한 카로티노이드의 구조는 Fig.2와 같다.

II. 실험

1. 사용기기

전자흡수 스펙트럼은 Varian Techtron Model 635 UV-Vis Spectro-photometer를

사용하였으며, 형광 스펙트럼은 Aminco-Bowman Spectro-fluorometer로 PM tube는 장파장 부분에서 검출감도가 좋은 Hamamatsu사 제품인 Model R636을 사용하였다. 반응시 광원으로는 Kodak 4200K Projector의 300W, 83V FHS 텅스텐등을 사용하였다. 단색광은 Baush and Lomb high intensity monochromator (1350 groove/mm 300 nm blaze)를 통해 얻었다.

2. 시약 및 재료

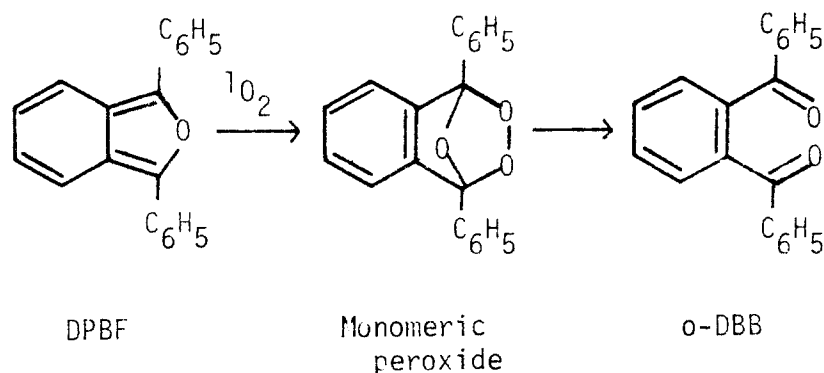
메탄올(동양화학 제품)은 재증류한 것으로, 용매만을 blank로 어떤 형광도 내지 않는 감도 내에서 사용하였다. DPBF는 메탄올에서 재결정한 것을 사용하였고 rose bengal은 Aldrich 제품을 사용하였다. 질소가스는 40% - NaOH에 녹인 약 10%의 Pyrogallol용액과 $CaCl_2$ 관을 통과시켜 산소 및 수분을 제거한 후 사용하였다. 4,4'-diketo- β -carotene을 환원시킨 것을 사용하고 일부는 그대로 사용하였다. Lutein (3,3'-dihydroxy- β -carotene) 및 lutein ester는 전복 내장중에서 분리한 것을 사용하였고 lutein lauric acid ester는 시금치에서 TLC로 분리한 lutein을 가지고 합성하여 사용하였다. 또한 β -carotene 및 일부 free lutein은 시금치에서 분리한 것을 사용하였다. Astaxanthin 및 astaxanthin ester는 새우의 껍질로 부터 분리하여 사용하였다. 광증감제인 녹색 색소 (phaeophytin a-like)는 전복내장에서 분리하였고, phaeophytin a는 시금치에서 분리하였다. Sodium copper chlorophyll은 Nisshin chemical Co.에서 구입한 것을 사용하였다. 모든 실험은 실온에서 광선을 피하여 암실의 어두운 적색 전등밑에서 실시하고 카로티노이드는 $-12^\circ C$ 냉동실에 보관 사용하였으며 실험 직전에 TLC 및 분광계에 의해 순도를 확인한 후 사용하였다.

3. 실험방법

$^1\text{O}_2$ quenching 실험

Photo-oxidation의 실험장치는 Fig. 3, 4와 같다. $^1\text{O}_2$ 의 발생으로는 메탄올 용액에서 rose-bengal 및 진북내장에서 분리한 phaeophytin a-like, 신선한 시금치에서 분리한 phaeophytin a를 증감제로 사용하였고 조사광은 rose bengal의 경우 554nm이고 ph-

aeophytin a-like 및 phaeophytin a는 666nm이었다. (Fig. 5) $^1\text{O}_2$ 발생 검출로는 DPBF (1,3-diphenyl iso-benzofuran)을 사용하였다. DPBF는 반응성이 커 $^1\text{O}_2$ 과 physical quenching 없이 매우 빠르게 반응하여 monomeric peroxide (I)가 생기고 이것이 실온에서 분해하여 o-dibenzolbenzene을 만든다고 보고되고 있다.¹³ DPBF은 oxygena-



tion에 의해 흡광도 또는 형광의 감소를 나타낸다. 실험에 사용한 각종 카로티노이드, DPBF, rose-bengal의 농도는 실험 직전에 분광계를 사용하여 측정하였다.¹⁴ 반응용기에는 기포 발생기를 사용하여 공기를 통과시켰는데 이 공기는 반응용액중의 용매의 증발을 보완하기 위하여 미리 메탄올 용액이 든 용기를 통과시켰다. 측정을 위해 반응중 반응시료를 취할때는 공기 또는 질소의 흐름을 중지시키고 조사광을 차단시킨 후 피펫으로 일정량을 취하여 사용하고 그 용액을 반응용기에 다시 넣어 반응을 계속 시켰다.

a) DPBF, rose-bengal 각종 카로티노이드를 메탄올용액으로 하여 실험할 농도로 stock solution을 만들어 용기에 넣고 마개를 단단히 막은 후 실험시에 각각 5ml volumetric 피펫으로 정확히 취하여 반응 용기에 넣은 후 실험하였다. photo-oxidation 하는 동안 DPBF의 감소는 DPBF의 흡광도 변화

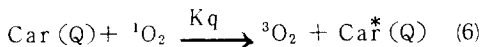
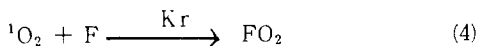
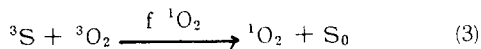
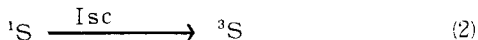
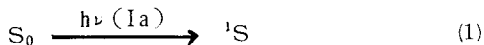
로 관찰하며 조사전과 조사후 4분에 파장 410nm에서 흡광도를 측정하였고 카로티노이드에 의한 410nm에서의 흡광도를 DPBF 410nm에서의 흡광도로 부터 빼줌으로 보정하였다. Rose bengal은 410nm에서 흡광도를 나타내지 않았다.

b) 진북내장에서 분리한 phaeophytin a-like의 광 증감작용 및 카로티노이드에 의한 보호작용에 관한 실험에서는 DPBF의 410nm의 흡광도와 phaeophytin a-like의 soret peak가 거의 겹쳐 측정이 곤란하므로 spectrofluorometer를 사용하여 Ex. 410nm와 Em. 455nm에서 형광을 측정하였다.

III. 결 과

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 일으키고 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.

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

여기서 I_a 는 증감제에 의한 빛의 흡수비율 ($\text{mol} \cdot \text{quanta}/\text{sec}$)이며, Φ_{ISC} 는 증감제의 삼중항 상태의 양자수득율이고 $F \cdot {}^1O_2$ 는 삼중항 상태 증감제로부터 1O_2 의 수득율이다. 이 값은 많은 유기용매 중에서 삼중항 상태 quencher가 존재하지 않을 때는 대략 1.0의 값을 가짐이 밝혀졌다.¹⁵ Fig.6은 rose-bengal에 의한 DPBF의 흡광도 감소를 나타내고 있다. 카로티노이드에 의한 1O_2 quenching은 DPBF의 1O_2 quenching과 경합하기 때문에 카로티노이드에 의해 DPBF의 흡광도 또는 형광의 감소가 억제된다. 증감제 없이 DPBF의 메탄올 용액에 554nm의 광을 조사했을 경우 DPBF의 감소는 없었으며, 정제된 질소를 포함시킨 메탄올 용액에 rose-bengal과 DPBF를 넣고 계속 질소 존재하에서 광조사를 했을 경우에도 DPBF의 농도 감소는 거의 찾아볼 수 없었다.

Lutein과 lutein ester의 1O_2 quenching 효과

Fig.7는 lutein, lutein ester, β -carotene의 1O_2 quenching 효과를 반응시간과 DPBF농도의 역수로서 나타낸 그림이다. DPBF와 rose-bengal 만을 포함한 메탄올 용액에서는 DPBF의 농도가 급격히 감소함을 알 수 있는데 이때 β -carotene, lutein lutein ester는 DPBF의 photodecomposition을 감소시킴을 알 수 있다. Lutein 및 lutein ester의 quenching 효과는 비슷하나 β -carotene보다는 다소 떨어지는 효과를 보이고 있다.

Fig.8, Fig.9 및 Table 1은 lutein 및 lutein-lauric acid ester의 농도에 따른 1O_2 quenching 효과를 반응시간 별로 측정하였다. 카로티노이드의 극히 묽은 농도 ($\sim 10^{-7}$ M)에서도 뚜렷한 1O_2 quenching 효과가 있음을 알 수 있다.

Fig.10는 합성한 lutein-lauric acid ester와 lutein, β -carotene의 quenching 효과를 나타내고 있다. 이 실험에서도 lutein과 lutein lauric acid ester의 quenching 효과는 대략 비슷한 정도를 보이고 있음을 알 수 있다.

카로티노이드의 K_q 값 결정

(7)식에서 [F]가 매우 작을 때 ($\sim 10^{-6}$ M)¹⁶ 일차반응 속도 식을 얻을 수 있다.

$$-\frac{d[F]}{dt} = K \left(\frac{Kr[F]}{Kq[Q] + Kd} \right) \quad (8)$$

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

$$S = K \left(\frac{Kr}{Kq[Q] + Kd} \right) \quad (9)$$

Table 1. Effects of concentration of lutein ester on the singlet oxygen quenching activity.

concentration(M)	$\log [\text{DPBF}]^{-1}/t$	R
0	6.40×10^{-2}	0.9999
2.92×10^{-7}	5.90×10^{-2}	0.9998
5.84×10^{-7}	5.65×10^{-2}	0.9998
1.17×10^{-6}	5.65×10^{-2}	0.9998
2.34×10^{-6}	4.67×10^{-2}	0.9998
4.67×10^{-6}	3.68×10^{-2}	0.9995

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

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

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

Fig.11과 Fig.12은 lutein diester, Fig.13과 Fig.14는 astaxanthin diester, Fig.15, Fig.16은 4,4'-dihydroxy- β -carotene에 대한 각각의 DPBF의 농도와 $-\frac{d[F]}{dt}$ 값의 변동을 그린 그래프와 Stern-Volmer 그래프를 나타낸 그림들이다. 이 Stern-Volmer 그래프의 기울기 K_q/K_d 와 메탄올 용액에서 알려진 K_d 값 ($18 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) 으로부터 Table 2와 같이 K_q 를 구하였다. 이때 astaxanthin diester의 K_q 값은 $2.32 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이었고, 4,4'-dihydroxy- β -carotene은 $1.87 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, lutein diester의 경우는 $1.90 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이었다. Mathew-Roth 등(1974)^{14-b}이 benzene-methanol (3:2) 용액에서 구한 lutein의 K_q 값은 $2.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이었다. β -Carotene의 K_q 는 Farmilo와 Wilkinson에 의해서 $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ⁹, Foote 등에

의해서는 $2.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 등 다양한 값을 나타내고 있다.²⁰ Table 2에서 astaxanthin diester는 가장 효과적인 quenching 효과를 보이고 4,4'-dihydroxy- β -carotene과 lutein diester는 비슷한 정도의 좋은 효과를 보이고 있다. 즉 Table 2에서 보는 바와 같이 모두 diffusion controlled rate에 가까운 큰 값을 보여주고 있다. 4,4'-Dihydroxy- β -carotene은 Fig.17와 Table 3에서 lutein보다는 양호한 효과를 보이고 있다. Fig.18은 astaxanthin, astaxanthin monoester 및 diester, 4-hydroxy-4'-keto- β -carotene, 4,4'-dihydroxy- β -carotene의 $^1\text{O}_2$ quenching 정도를 비교한 그래프이다. Astaxanthin, 그의 monoester 및 diester는 차이가 거의 없고, mono hydroxy, dihydroxy- β -carotene과는 뚜렷한 차이를 볼 수 있다.

녹색 색소 (phaeophytin a-like)의 광 증감 작용과 카로티노이드의 보호작용

광 증감제로 phaeophytin a, phaeophytin a-like, sodium copper chlorophyll을 사용하여 DPBF의 감소를 형광의 감소로 측정할 실험은 Fig.19에 있다. phaeophytin a-like

및 lutein diester 는 진북내장에서 추출한 것이고 phaeophytin a 는 시금치에서 분리한 것이다. Phaeophytin a 및 phaeophytin a-like 는 강력한 광 증감제로 광증감작용은 그 세기가 동일했으나 sodium copper chloro-

phyll 의 경우는 전혀 광증감작용을 나타내지 않았다. 또한 형광도 볼 수 없었다. Phaeophytin a-like 의 광증감작용에 대하여 진북내장에서 추출한 lutein ester 가 효과적으로 보호작용을 하고 있음을 알 수 있다.

Table 2. Rate of Singlet - Oxygen Quenching by Carotenoids in MeOH.

Carotenoids	No. of Conjugated double bonds	k_q/k_d	$k_q (M^{-1}Sec^{-1})$
Astaxanthin diester	13	1.29×10^5	2.32×10^{10}
4,4'-dihydroxy-B-carotene	11	1.04×10^5	1.87×10^{10}
Lutein diester	10	1.06×10^5	1.90×10^{10}

Table 3. Effects of concentration of lutein on the singlet oxygen quenching activity.

concentration(M)	$\log [DPBF]^{-1}/t$	(r)
0	6.65×10^{-2}	0.9992
5.84×10^{-7}	6.13×10^{-2}	0.9987
1.17×10^{-6}	5.74×10^{-2}	0.9999
2.34×10^{-6}	5.36×10^{-2}	0.9998
4.67×10^{-6}	4.54×10^{-2}	0.9997
8.8×10^{-6}	3.24×10^{-2}	0.9999
* 1.22×10^{-6}	5.26×10^{-2}	0.9996

*; 4,4'-dihydroxy - B - carotene

IV. 논 의

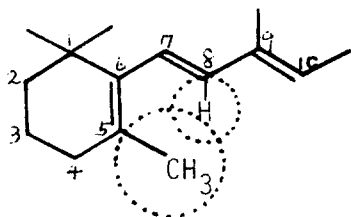
극성 또는 H/L이 1O_2 quenching에 미치는 영향

Lutein과 lutein ester는 n-hexane-85% methanol 간의 분배계수와 용해도(lutein은 methanol, ethanol soluble, ester는 hexane soluble)가 보여주는 바와 같이 극성에 있어서 차이가 나지만 MeOH 용액중에서의

1O_2 의 quenching에 관한 별로 차이가 없다. 따라서 in vitro 메탄올 용액에 있어서는 카로티노이드에 미치는 3 위치의 OH기나 에스테르기 $-O-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-(CH_2)_{10}CH_3$ 가 quenching에 미치는 영향에는 차를 찾아볼 수 없다. 따라서 아마도 극성이나 hydrophilicity-hydrophobicity 관계는 homogeneous 용액에는 1O_2 의 quenching에 영향을 미치지 않는 것이 아닌가 생각된다. 그러나 생체 막이나 liposome 같은 heterogeneous 한계에서도 그 일반화가 통용될 것이라고 보기는 어렵다.

1O_2 quenching에 미치는 카로티노이드의 치환기의 영향

C_{40} Carotenoid 들인 실험한 카로티노이드에 있어서 polyene hydrocarbon인 β -carotene은 2개의 β -ionone 고리를 가진 8개의 isoprene 단위를 이루고 있으며 11개의 2중결합이 conjugation 되어 있다. 그러나 5 위치의 methyl 기의 H는 8 위치의 탄소에 결합한 H와 Van der Waal's 반경 이내에 있기 때문에 입체장애를 받아 β -ionone 고리는 conjugation 된 사슬과 동일 평면을 이루지 못하며 약 45° 각으로 뒤틀려 있다. 즉 사슬의 π 전자와 효과적인 포개짐을 이루지 못하고 있다.



한편 고리가 열린 lycopene (11개의 conjugation 된 2중결합과 격리된 1,1' 위치의 2개의 이중결합을 가짐)보다 transition energy는 크며 따라서 λ_{max} 는 blue shift하고 있다. β -Carotene은 11개의 2중결합이 conjugation 된 lycopene보다 큰 π -ioni-

zation을 갖는다. 즉 lycopene보다는 덜 좋은 π -electron donor이다. Lutein은 한개의 β -ionone 고리 대신 2중결합이 1개 작은 1개의 α -ionone 고리와 함께 conjugation system과는 영향을 미치지 않는 3,3' 위치에 알콜기를 갖고 있는데 비해 4,4'-dihydroxy- β -carotene은 β -carotene보다 2개의 OH기를 더 가진 allyl alcohol 형태의 구조를 갖고 있다. 따라서 β -carotene과 4,4'-dihydroxy- β -carotene (V)은 allylic 위치의 2개의 OH기가 1O_2 quenching에 미치는 효과를 반영하고 있다고 할 수 있다. Allylic alcohol로 볼 수 있는 V에 있어서는 π -전자의 delocalization이 β -carotene보다도 클 것이며 따라서 π -ionization potential은 더 작은 (polarizability는 더 큼) 즉 더욱 좋은 π -전자주체로 작용할 것이 예상되는 동시에 inductive effect와 2개의 hydrophilic한 polar group의 도입은 반대로 quencher로서 불리한 서로 상반되는 효과가 기대된다. 그래도 V lutein보다는 quenching 효과가 더 있음을 보여주고 있다. (Fig.17) 즉 resonance effect가 유리하게 반영되고 있음을 보여주고 있다. 한편 OH대신 카르보닐기를 가진 4-hydroxy-4'-keto- β -carotene보다 1개의 allylic OH 및 conjugation 된 $C=O$ 기를 갖고 있으며 V보다 더욱 좋은 1O_2 의 quencher임을 실험 결과 나타내고 있다 (Fig.18). 여기서 OH에 의한 inductive effect보다는 $C=O$ 의 conjugation에 의한 resonance 효과가 quenching에 더욱 효과적임을 나타내고 있다. 한편 lutein과 lutein ester에서, 별로 차이가 나지 않는 점으로 보아서 극성기의 영향은 메탄올 용액에서는 별로 quenching에 영향을 미치지 않음을 짐작할 수 있다. 따라서 β -carotene과 lutein의 quenching activity의 차이도 극성 OH기의 영향이 아니라

conjugate 된 2중 결합의 수의 차이로 기착될 수 있다. Fig.18에서 보는 바와 같이 astaxanthin ester는 β -carotene보다도 더욱 효과적인 제일 두드러진 quencher 임을 나타내고 있다. Astaxanthin ester는 β -carotene보다도 2개의 conjugation 된 2중결합

을 갖고 있으면서 inductive effect를 별로 미치지 않는 구조의 ester임을 감안할때 OH기가 없는 canthaxanthin과 같은 정도의 강력한 quenching 효과를 나타냄도 이해할 수 있다.

REFERENCES

1. a) Pryor, W.A., *Ann. New York Acad. Sci.*, 393, 1-22 (1982).
 b) Krinsky, N.I., in *Singlet Oxygen* (H.W. Wasserman and R.W. Murray, eds) (1979).
 c) Foote, C.S., in *Pathology of Oxygen* (A.P. Autor, ed.) pp. 21-44, Academic Press, New York (1982).
 d) K.C. Smith, *Photochemistry and Photobiology of Nucleic acids*, 2, pp. 187-218, Academic Press, New York (1976).
2. a) J.D. Spikes, in the *Science of Photobiology* (Ed. K.C. Smith) p. 93, Plenum Press, N.Y. (1977).
 b) S. Cannistraro, A. Vande Vorst and G. Jori, *Photochem. Photobiol.*, 28, 257 (1978).
 c) G. Gauzzo, G. Gennari, G. Jori and J.D. Spikes, *Photochem. Photobiol.*, 25, 389 (1977).
3. a) K. Gollnick, *Advan. Photo. Chem.*, 6 (1968).
 b) K. Gollnick, and G.O. Schenck, In *4-Cycloaddition Reactions* (J. Hamer, ed.) pp. 255-344, Academic Press, New York 1967).
4. a) J.D. Spikes and M.L. Macknight, *Photochemistry of Macromolecules*, pp. 67-83, Plenum Press, New York (1970).
 b) N.I. Krinsky, *Photochem. Photobiol.* 20, 532-535 (1974).
 c) J.D. Spikes, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 244, 496-508 (1975).
 d) A.M. Michelson and P. Durosay, *Photochem. Photobiol.*, 25, pp. 55-63 (1977).
 e) Zimmermann, R., L. Flohe, U. Weser and H. J. Hartmann, *FEBS Lett.*, 29, 117-120 (1973).
5. a) R. Lipson, E. Baldes and A. Olsen, *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 1 (1961).
 b) C. J. Gomer and T. J. Dougherty, *Cancer Res.*, 39, 146 (1979).
 c) T. J. Dougherty, C. J. Gomer and K.R. Weishaupt, *Cancer Res.*, 36, 2330 (1976).
 d) K.R. Weishaupt, C. J. Gomer and T. J. Dougherty, *Cancer Res.*, 36, 2326 (1976).
 e) T. J. Dougherty, G. Lawrence, J.H. Kaufman, D. Boyle, K.R. Weishaupt and A. Goldfarb, *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 231 (1979).
 f) T. J. Dougherty, R.E. Thoma, D.G. Boyle and K.R. Weishaupt, *Cancer*

- Res., 41, 401 (1981).
- g) T. J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle and A. Mittleman, *Cancer Res.*, 38, 2628 (1978).
6. C.S. Foote and R.W. Denny, *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 6233 (1969).
7. Anderson, S.M. and Krinsky, N.I., *Photochem. Photobiol.* 90, 6233 (1973).
8. a) N.I. Krinsky, *Topics in Photobiology*, May 26-29 (1982).
 b) Albrich, J.M., McCarthy, C.A. and J.K. Hurst, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 210-214 (1981).
 c) Packer, J.E., Mahood, J.S., Mora-Arellano, V.O., Slater, T.F., Willson, R.W. and Wolfenden, B.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 98, 901-906 (1981).
 d) N.I. Krinsky and S.M. Deneke, *J. Natl. Cancer Inst.*, 69, 205-209 (1982).
9. Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. and Sporn, M.B., *Nature*, 290, 201-209 (1981).
10. Mathew-Roth, M.M., *Oncology*, 39, 33-37 (1982).
11. Seifter, E., Rettura, G., Padawer, J. and Levenson, S.M., *J. Natl. Cancer Inst.*, 68, 835-840 (1982).
12. T.Y. Lee, D.H. Lee and S.N. Park, *J. Korean Agr. Chem. Soc.*, 27, 1-6 (1984).
13. a) J.G. Calvert and J.N. Pitts Jr., in *Photochem.*, J. Wiley and sons, p. 784 (1966).
 b) Singh, A., N.R. McIntyre and G.W. Koroll, *Photochem. Photobiol.* 28, 595-601 (1978).
14. a) R. Kuhn and H. Kuhn, *European J. Biochem.*, 2, 349-360 (1967).
 b) M.M. Mathews-Roth, T. Wilson, E. Fujimori, and N.I. Krinsky, *Photochem. Photobiol.*, 19, 217(1974).
 c) Sigh, A., N.R. McIntyre and G.W. Koroll, *Photochem. Photobiol.* 28, 595-601 (1978).
15. D.S. Han, "Photosensitizing Property of Emodin Derivatives",
 서울대학교 석사논문 (1981)
16. a) C.S. Foote and Ta Yen Ching, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 6209 (1975).
 b) P.B. Merkel, R. Nilsson and D.R. Kearns, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 1030 (1972).
 c) Robert, H. Young, Kathy Wehrly and Robert, L. Martin, *J. Amer. Chem. Soc.*, 93, 5774 (1971).
17. A. Framilo and F. Wilkinson, *Photochem. Photobiol.*, 18, 447 (1973).
18. C.S. Foote, E.R. Peterson, and K.W. Lee, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 1032 (1972).
19. N.I. Krinsky and S.M. Deneke, *JNCI*, Vol. 69, No. 1, July 1982.

ABSTRACT

$^1\text{O}_2$ quenching abilities of several carotenoids which contain hydroxy, carbonyl and ester groups were compared quantitatively with β -carotene, and the capacity of the quenching was interpreted in the light of electronic effects.

The rate constants of $^1\text{O}_2$ quenching of lutein diester and astaxanthin diester in MeOH solution were shown to be $1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ Sec}^{-1}$, $2.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ Sec}^{-1}$ respectively.

Under the experimental conditions, and within the carotenoid tested results, the larger the resonance energy is, the larger becomes the rate constant and consequently the lower the transition energy is, the better becomes the quencher.

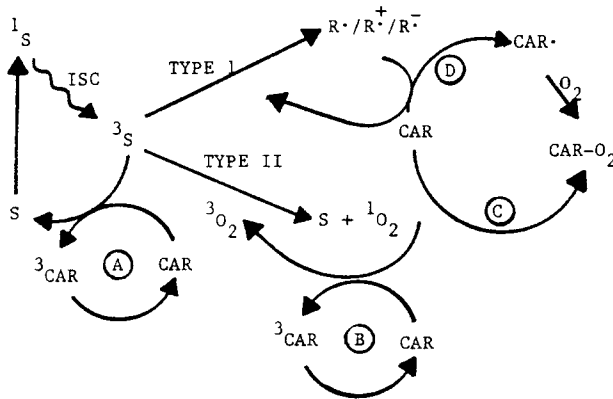


Fig. 1. Mechanism of Carotenoid protection. Carotenoids (CAR) can quench triplet sensitizer A, quench $^1\text{O}_2$ B, chemically react with $^1\text{O}_2$ C, or react with radical intermediates D, C and D presumably result in the bleaching of the carotenoid pigment.

ISC = intersystem crossing; S = sensitizer;
R = an oxidizable substrate.

N.I. Krinsky and S.M. Deneke, JNCI, Vol. 69,
No. 1, July 1982

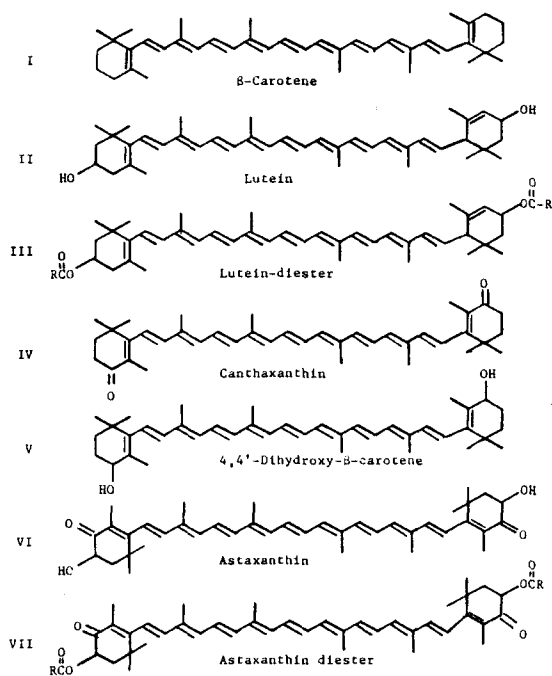


Fig. 2. Structures of Carotenoid pigments used in the quenching studies of 1O_2 .

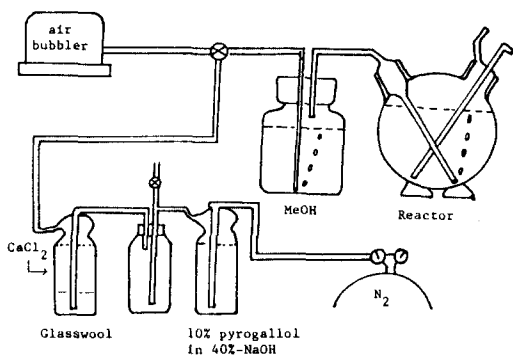
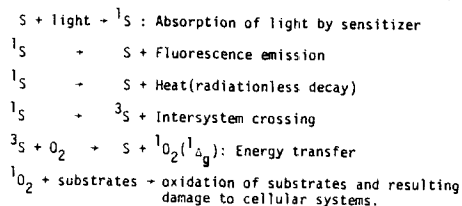


Fig. 3. Reaction Vessel with gas masking bottle.

Photobiological Mechanism of Sensitized Photooxidation and the Generation of Singlet Oxygen, Superoxide anion Radical or Organic Free Radicals.

(a) Singlet oxygen mechanism (Type II photooxidation):



(b) Electron transfer mechanism (Type I photooxidation):

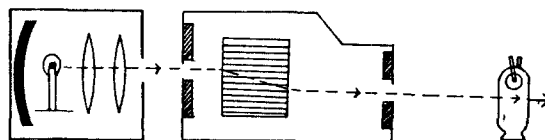
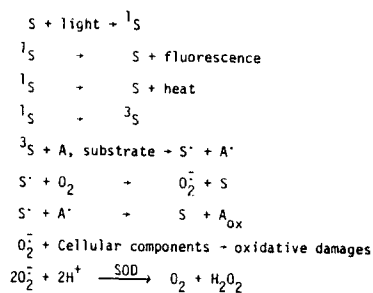


Fig. 4. Schematic diagram of the photolysis system.

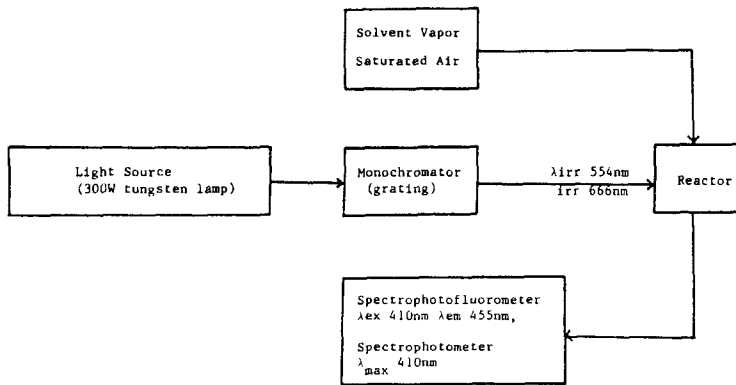


Fig. 5. Schematic diagram of the Irradiation Apparatus

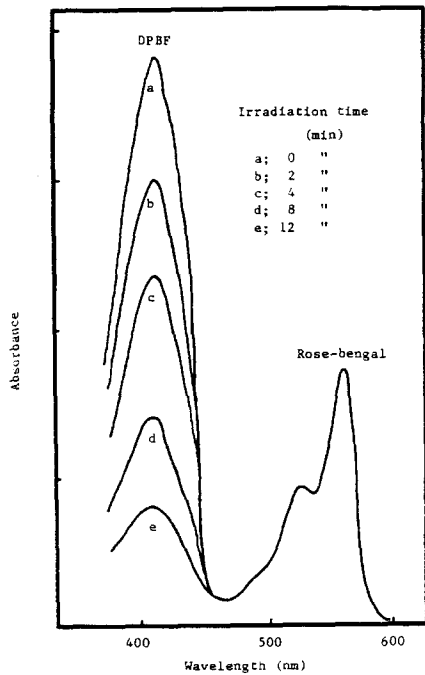


Fig. 6. Rose bengal sensitized photodecomposition of DPBF irradiated with the light of 554nm in MeOH.

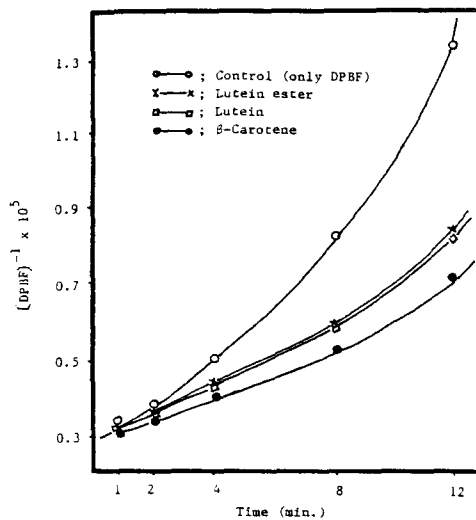


Fig. 7. Singlet oxygen quenching activity of Carotenoids.

DPBF : $3.1 \times 10^{-5} M$, Rose bengal : $6.5 \times 10^{-6} M$
 Lutein : $4.67 \times 10^{-6} M$, β -Carotene : $4.67 \times 10^{-6} M$
 Lutein ester : $4.67 \times 10^{-6} M$

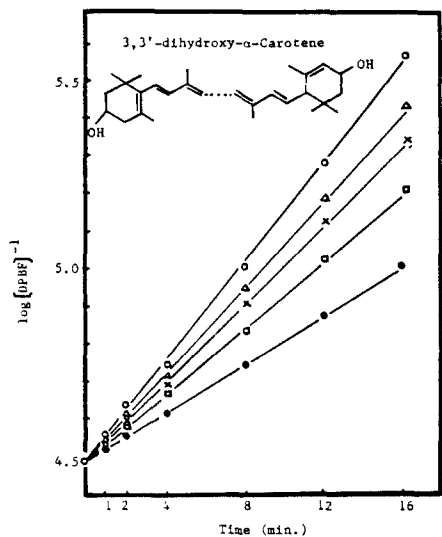


Fig. 8. Rose Bengal ($6.5 \times 10^{-6} M$) sensitized photodecomposition of DPBF ($3.25 \times 10^{-5} M$) irradiated with the light of 554 nm in MeOH.

** Concentration of Lutein
 ○—○: 0.0M
 △—△: $5.84 \times 10^{-7} M$
 ×—×: $2.34 \times 10^{-6} M$
 ●—●: $8.8 \times 10^{-6} M$
 □—□: $4.67 \times 10^{-6} M$

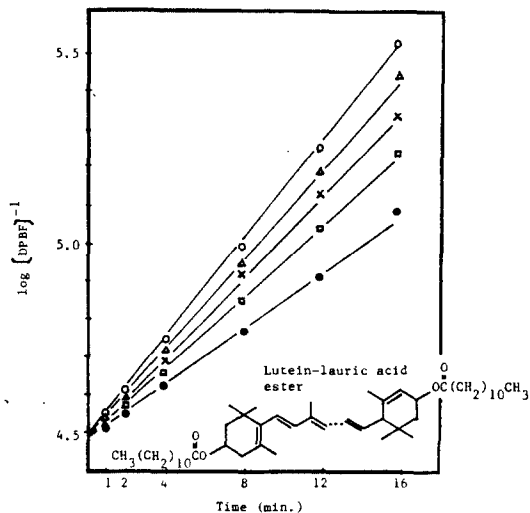


Fig. 9. Rose Bengal ($6.5 \times 10^{-6} M$) sensitized photodecomposition of DPBF ($3.25 \times 10^{-5} M$) irradiated with the light of 554 nm in MeOH.

** Concentration of Lutein-ester
 ○—○: 0.0M
 △—△: $2.92 \times 10^{-7} M$
 ×—×: $1.17 \times 10^{-6} M$
 ●—●: $4.67 \times 10^{-6} M$
 □—□: $2.34 \times 10^{-6} M$

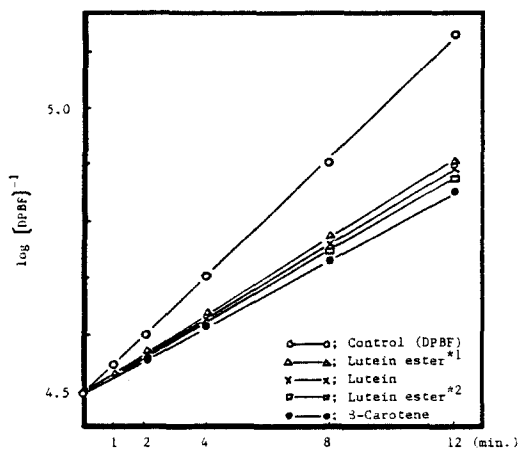


Fig. 10. Singlet oxygen quenching activity of carotenoids.

DPBF; $3.1 \times 10^{-5} M$, Lutein lauric acid ester; $4.67 \times 10^{-6} M$
 Lutein; $4.67 \times 10^{-6} M$, β -carotene; $4.67 \times 10^{-7} M$
 Lutein lauric acid ester^{#2}; $4.67 \times 10^{-6} M$
 Rose bengal; $6.5 \times 10^{-6} M$

*1 : #5 on TLC plate in synthesis of lutein ester.
 *2 : #4 on TLC plate in synthesis of lutein ester.

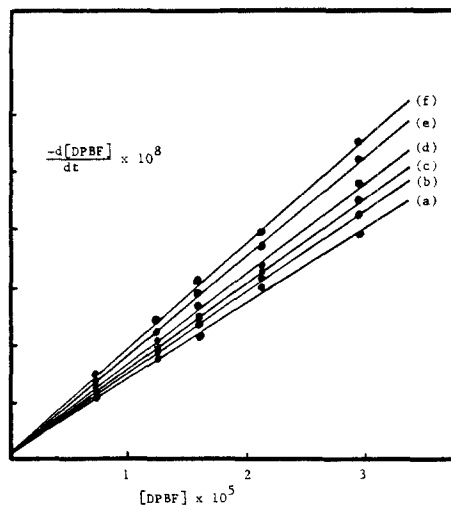


Fig. 11. Plot of $-\frac{d[DPBF]}{dt}$ vs $[DPBF]$

(Lutein diester quenched photooxidation of DPBF in MeOH irradiated with the light of 554 nm for 4 minutes)

(a) $4.37 \times 10^{-6} M$ (b) $3.69 \times 10^{-6} M$
 (c) $2.92 \times 10^{-6} M$ (d) $2.22 \times 10^{-6} M$
 (e) $1.04 \times 10^{-6} M$ (f) 0.0M; control

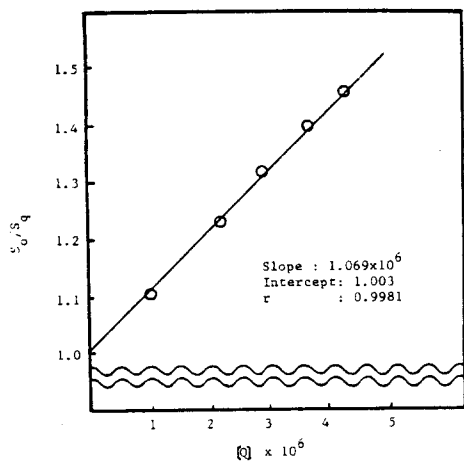


Fig. 12. Plot of S_0/S_q vs $[Q]$

Q : Lutein diester
(irradiated with the light of 554 nm
for 4 minutes)

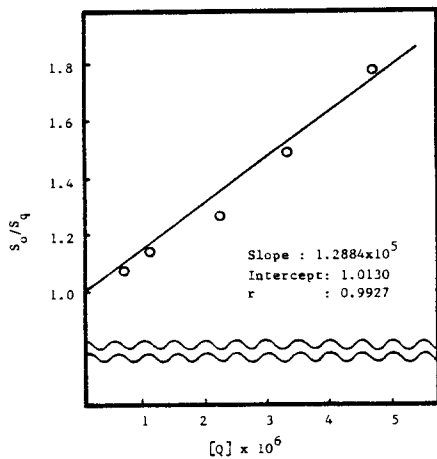


Fig. 14. Plot of S_0/S_q vs $[Q]$

Q = Astaxanthin diester

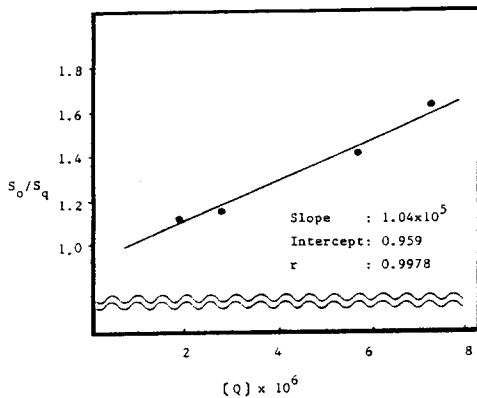


Fig. 16. Plot of S_0/S_q vs $[Q]$

Q = 4,4'-dihydroxy-8-carotene

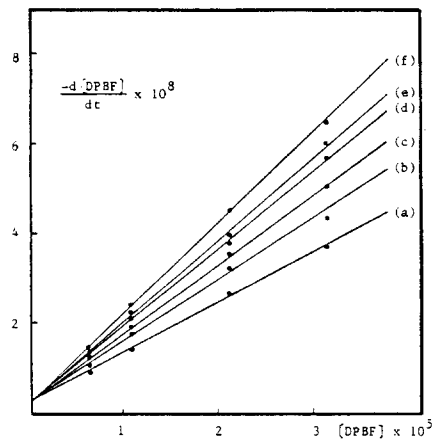


Fig. 13. Plot of $-\frac{d[DPBF]}{dt}$ vs $[DPBF]$

(Astaxanthin diester quenched photo-oxidation
of DPBF in MeOH irradiated with the light of
554 nm for 4 minutes)

- (a) $5.72 \times 10^{-6} M$ (b) $3.37 \times 10^{-6} M$
(c) $2.25 \times 10^{-6} M$ (d) $1.12 \times 10^{-6} M$
(e) $0.63 \times 10^{-6} M$ (f) 0.0M ; Control

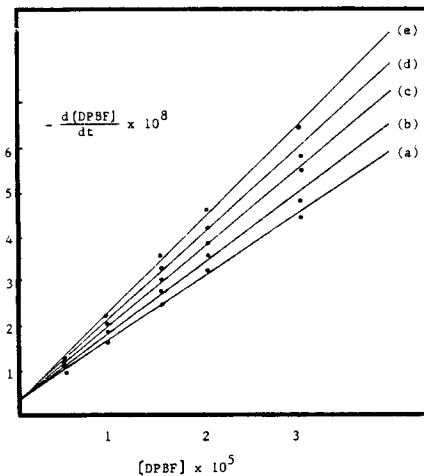


Fig. 15. Plot of $-\frac{d[DPBF]}{dt}$ vs $[DPBF]$

(4,4'-dihydroxy-8-carotene quenched
photo-oxidation of DPBF in MeOH
irradiated with the light of 554nm
for 4 minutes)

- (a) $6.62 \times 10^{-6} M$ (b) $5.04 \times 10^{-6} M$
(c) $2.60 \times 10^{-6} M$ (d) $1.73 \times 10^{-6} M$
(e) 0.0M

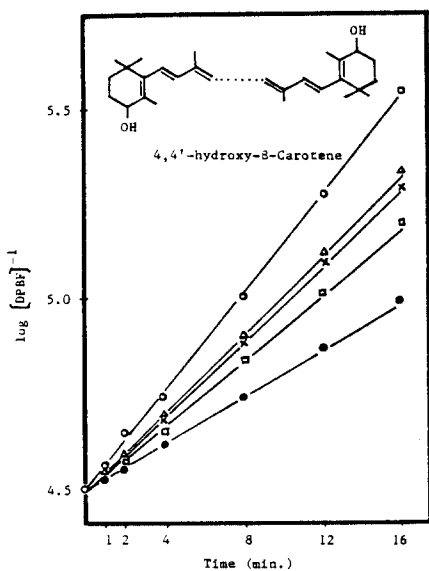


Fig. 17. Rose Bengal ($6.5 \times 10^{-6} \text{M}$) sensitized photodecomposition of DPBF ($3.25 \times 10^{-5} \text{M}$) irradiated with the light of 554 nm in MeOH.

○—○; Lutein 0M
 △—△; Lutein $2.34 \times 10^{-6} \text{M}$
 □—□; Lutein $4.67 \times 10^{-6} \text{M}$
 ●—●; Lutein $5.72 \times 10^{-6} \text{M}$
 X—X; 4,4'-dihydroxy-β-Carotene $1.22 \times 10^{-6} \text{M}$

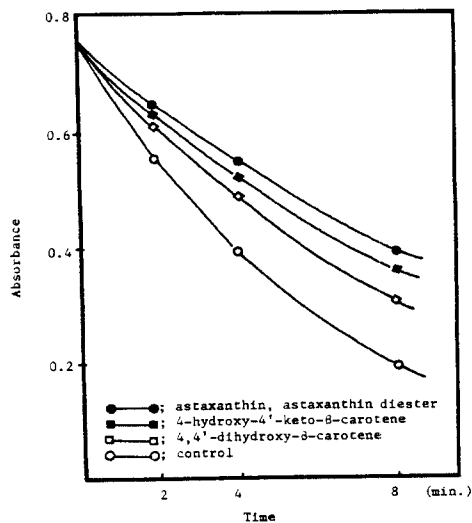


Fig. 18. Singlet oxygen quenching effects of carotenoids on the rose bengal sensitized photodecomposition of DPBF irradiated with the light of 554 nm in MeOH.

●—●; astaxanthin, astaxanthin diester
 ■—■; 4-hydroxy-4'-keto-β-carotene
 □—□; 4,4'-dihydroxy-β-carotene
 ○—○; control
 Astaxanthin ; $5.3 \times 10^{-6} \text{M}$
 4-Hydroxy-4'-keto-β-carotene ; $5.2 \times 10^{-6} \text{M}$
 4,4'-Dihydroxy-β-carotene; $5.9 \times 10^{-6} \text{M}$
 DPBF ; $3.1 \times 10^{-5} \text{M}$
 Rose bengal ; $6.5 \times 10^{-6} \text{M}$

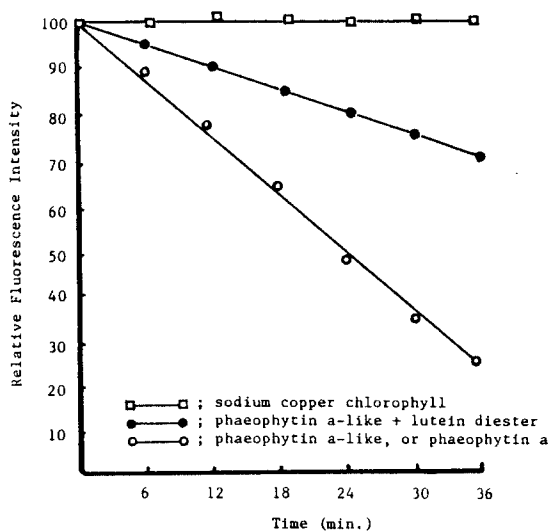


Fig. 19. Protective Effect of Lutein diester isolated from the viscera of abalone on the phaeophytin a (like) sensitized photodecomposition of DPBF irradiated with the light of 666 nm in MeOH.

DPBF ; $6.4 \times 10^{-6} \text{M}$
 lutein diester ; $3.3 \times 10^{-6} \text{M}$
 phaeophytin a ; $1.9 \times 10^{-6} \text{M}$
 sodium copper chlorophyll ; $1.9 \times 10^{-6} \text{M}$