

N₂-레이저 플래쉬 광분해 방법에 의한 Benoxaprofen의 광증감 작용에 관한 연구

李紀煥·梁俊默*·尹民重†

충남대학교 자연과학대학 화학과

*충남대학교 자연과학대학 물리학과

(1989, 10, 5 접수)

N₂-Laser Flash Photolysis study of Photosensitizing Properties of Benoxaprofen

Ki Hwan Lee, Joon Mook Yang*, and Minjoong Yoon†

Department of Chemistry, Chungnam National University Daejeon 302-764, Korea

*Department of Physics, Chungnam National University Daejeon 302-764, Korea

(Received October 5, 1989)

Benoxaprofen(BXP)의 들뜬상태를 직접 검출하기 위하여, 질소 레이저 플래쉬 광분해 분광기를 제작하였다. 이 분광기의 성능을 확인하기 위하여 표준시료로써 안트라센을 사용하여 시험하였다. 에탄올에 녹은 BXP의 레이저 광들뜸을 질소기체 존재하에서 수행하였으며 파장범위 400~600 nm에 걸쳐 순간흡수 스펙트럼을 측정하고 이에 대한 산소 및 베타 카로틴의 효과를 조사하였다. 그 결과 415 nm에서의 최대 순간흡수율은 BXP의 삼중항 상태에 기인하며 삼중항 에너지는 22 kcal/mole 이상임을 확인하였다. 또한, BXP의 라디칼로 추정되는 중간체에 기인하는 최대순간 흡수율이 520 nm에 관측되었다. 이들 결과에 의해 BXP의 광증감 메커니즘을 논의하였다.

ABSTRACT. The nitrogen-laser flash photolysis apparatus has been set up to detect directly the transient produced from the excited Benoxaprofen (BXP). The function of the instrument has been tested by using anthracene as a standard sample. The laser photoexcitation of BXP in ethanol has been carried out under a constant stream of N₂ gas and a transient absorption spectrum has been recorded over the 400-600 nm. The effects of oxygen and β -carotene on the transient spectrum reveal that the maximum transient absorption at 415 nm is attributed to the triplet state of BXP and the triplet energy of BXP is above 22 Kcal/mole. In addition to the triplet state, another transient species has been observed to be produced, which is probably a radical form of BXP. The photosensitization mechanism of BXP is discussed based on these results.

서 론

Benoxaprofen(BXP)은 효과적인 비스테로이드 항염제인 부작용으로 빛을 흡수하여 생체세포 멤브레인의 해리를 촉진시키는 광증감작용을 한다¹. 이 광증감작용의 메커니즘은 에탄올에 녹은

BXP의 ESR 연구를 통해 부분적으로 연구되었다^{2,3}. 이 연구에 의하면 세포 멤브레인의 해리는 그 성분 단백질이나 지질의 산화에 기인하는데 이들 산화작용을 광여기된 BXP로부터 생성되는 BXPH 및 BXP· 라디칼들이나 삼중항 상태와 산

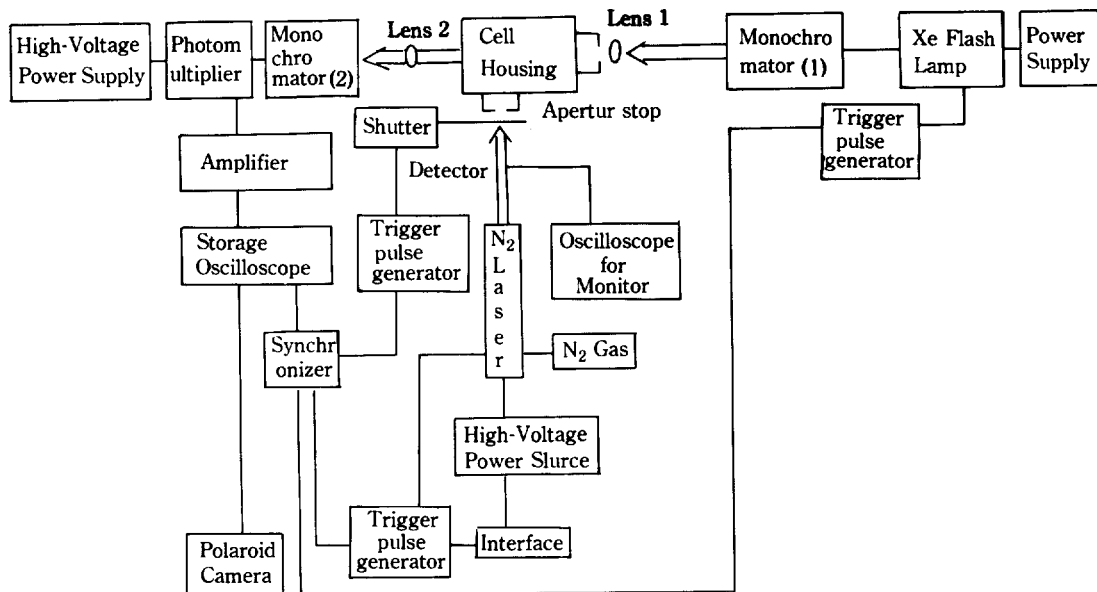


Fig. 1. Block diagram of N_2 -laser flash photolysis system.

소의 반응으로부터 발생하는 O_2^- 이나 1O_2 에 의해 촉진된다고 제안되었다. 그러나 이 BXP 라디칼들은 빠른 속도로 사라지는 중간체들이므로 ESR과 같은 정상상태 분광법에 의해서는 직접적으로 확인될 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 이들 1O_2 과 O_2^- 들이 광여기된 BXP로부터 생성되는 메카니즘을 보다 직접적으로 조사할 목적으로 질소 레이저 플래쉬 광분해방법에 의해 에탄올에 녹은 BXP의 중간체 흡수 스펙트럼들을 여러 가지 조건에서 측정 분석하였다.

실 험

시약. Benoxaprofen은 미국 Lilly Research Lab.에서 구입하였으며 Anthracene과 β -carotene은 Aldrich사에서 구입하였다. 그 밖에 소요된 유기용매는 spectroscopic grade이며 필요에 따라 재증류하였다.

질소 레이저 플래쉬 광분해 분광기에 의한 중간체 흡수 스펙트럼의 측정. 질소 레이저 플래쉬 분광기는 본 실험실에서 제작하여 사용하였다. 질소 레이저는 물리학과 레이저실에서 제작한 것으로 펄스폭은 8~10 ns이고 세기는 약 25 mJ이다. 레이저 플래쉬 광분해 장치의 설계도면은

Fig. 1에 나타내었다. 레이저에 의한 발광(emission)의 영향을 최소화하기 위하여 Xe-플래쉬 램프(펄스세기, 300 W; 펄스폭 2 ms)를 향하는 광축과 레이저를 향하는 광축이 서로 수직하며 단색계(monochromator) (2)를 향하는 광축은 Xe 램프를 향하는 광축과 일치하게 하였다. 시료를 투과하는 기준광(reference beam)은 가능한한 평행광으로 만들고 렌즈 2는 폭 5 mm만 남기고 가려줌으로써 레이저에 의한 시료의 들뜸과정에서 야기되는 발광을 최대로 줄일 수 있도록 하였다. 이러한 발광의 세기를 줄이는 또 하나의 광학적 방법은 단색계 (2)의 슬릿폭을 0.80~0.90 mm 범위에서 조절하는 것이다. 오실로스코프(oscilloscope)상에 나타나는 dark current는 슬릿폭 3이 0.35 mm 이하일 때와 같다. 렌즈 2는 초점거리 43~80 mm의 zoom 렌즈를 사용하였으며 그 초점거리를 적절히 조정하여 광여기된 시료로부터 생성되는 중간체에 의한 약한 흡수를 효율적으로 집광토록 하였다. 또한 레이저에 의한 시료의 비가역적 분해를 줄이기 위해 단일 shot을 실시하였는데 이 단일 shot을 위해 전자셔터(electronically activated shutter)를 광축에 설치하였다. 이러한 장치는 시료내 들뜬 분자가 미처 완화되기

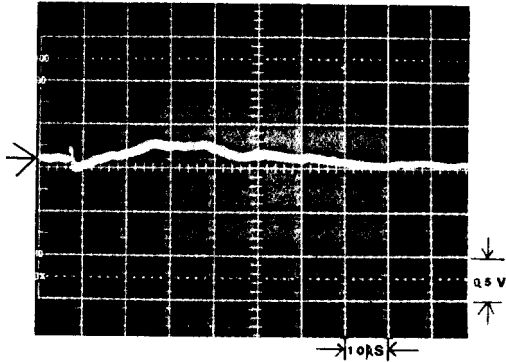


Photo 1. a. Oscillogram for the laser flash photolysis of anthracene in toluene, monitored at 430 nm. The arrow indicates the light level immediately prior to the laser flash.

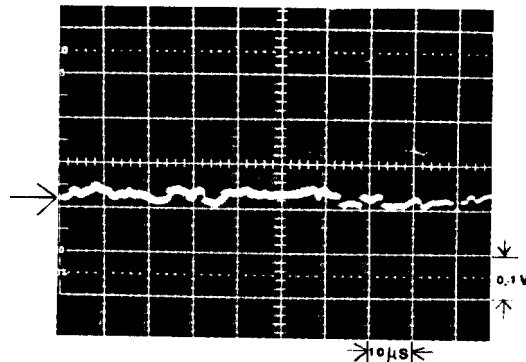


Photo 1. b. The trace of the monitoring light only at 430 nm without laser flash.

전에 연속적인 레이저에 의한 재들뜸의 가능성이 크기 때문에 꼭 필요하다.

Synchronizer와 trigger pulse generator는 본 실험장치의 작동시간을 조정하는데 이용되는 것으로서, 이 장치는 4개의 square wave pulse generator와 심장부인 converter 그리고 4개의 증폭기와 연결되어 있다. 각 증폭기로 들어간 신호는 증폭되어 외부 전자파의 영향을 받지 않고 각각의 pulse generator를 정확히 작동시킬 수 있도록 하였다. Synchronizer에는 전체 실험장치의 작동을 시작시키는 키가 설치되어 있는데 이 키를 눌러줌과 동시에 처음 세 개의 증폭기들이 순차적으로 신호를 내보내게 되어있다. 그러나 나머지 증폭기 하나와 4개의 모니터는 이 키에 관계없이 계속적으로 작동되도록 되어있다. 결과적으로 synchronizer는 전자서터, Xe-램프, 오실로우스코우프, 레이저 등을 순차적으로 작동시켜 주는 것이다. PMT는 Mcpherson사 Model 650이며 rise time은 2ns 정도이다. PMT로부터 나오는 신호는 5A48 이중증폭기와 5B42 delaying time base가 내장된 storage oscilloscope(50 MHz Tektronix 5441)에 연결하였다. Signal trace는 폴라로이드 필름을 C-30A Series 폴라로이드 카메라에 끼우고 오실로우스코우프 CRT에 부착 기록하였다.

본 기기의 성능을 실험하기 위하여 톨루엔에 녹인 anthracene(0.1 mM)을 표준시료로 선택하였

으나, 용액에 녹아있는 산소를 제거하기 위하여 시료용액을 석영 큐벳에 가하고 septum으로 봉한 다음 질소기체(99.999%)를 한 시간 이상 bubbling 하였다. 사진 1a는 레이저광과 모니터링광을 동시 작동시켜 430 nm에서 모니터링된 대표적인 anthracene의 oscillogram이다. 이것은 사진 1b에서와 같은 모니터링광만에 의한 oscillogram에 비해 430 nm의 빛이 흡수되었음을 확실히 나타내주고 있다. 이는 문헌⁵⁻⁷에 이미 소개된 anthracene의 삼중항 중간체에 의한 oscillogram과 잘 일치한다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 에탄올에 녹은 BXP의 들뜬상태를 직접 관찰하고자 anthracene의 경우처럼 레이저로 들뜨게한 뒤에 여러 파장의 모니터링광의 순간흡수를 측정하였다. Fig. 2는 질소 및 공기포화된 BXP 에탄올 용액을 레이저로 조사시킨 후 5 μs만에 측정된 BXP의 순간흡수 스펙트럼들이다. 이 스펙트럼은 415 nm와 520 nm 부근에서 최대 순간흡수도를 나타내고 있는데 415 nm에서 측정된 순간흡수의 대표적 decay profile은 사진 2와 같다. 공기 중에서는 415 nm 부근에서의 순간흡수가 질소 포화용액의 경우보다 상당히 감소됨을 관찰할 수 있는데 이는 415 nm의 순간흡수가 산소에 의해 퀘칭이 잘 되는 BXP의 삼중항 상태에 기인함을 암시한다고 할 수 있다. 만일에 이것이 사실이라면 들뜬 BXP로부터 β-carotene과

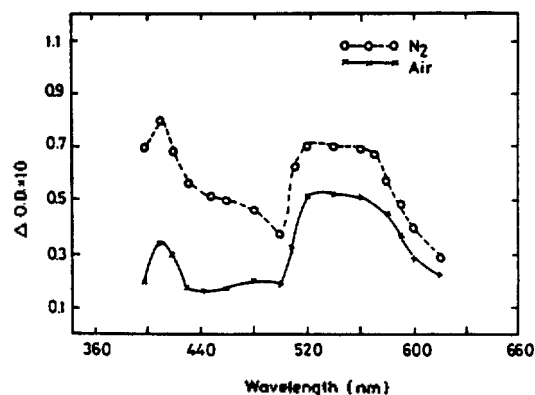


Fig. 2. Transient absorption spectra observed at 5 us after 337 nm laser flash in a nitrogen saturated (o-o-o-o) and an saturated (x-x-x-x) solutions of benoxapofen (1.0 mM).

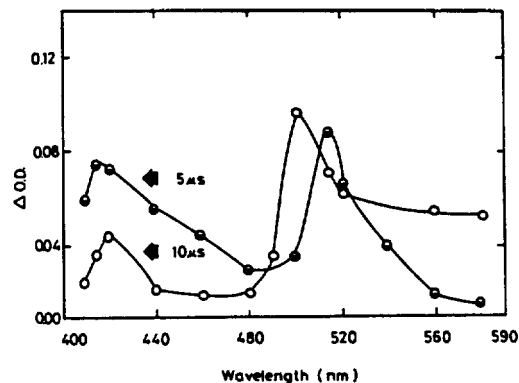


Fig. 3. Transient absorption spectra observed at 5 us and 10 us after 337 nm laser flash of 0.01 mM benoxapofen in the presence of 0.5 mM β -carotene in ethanol.

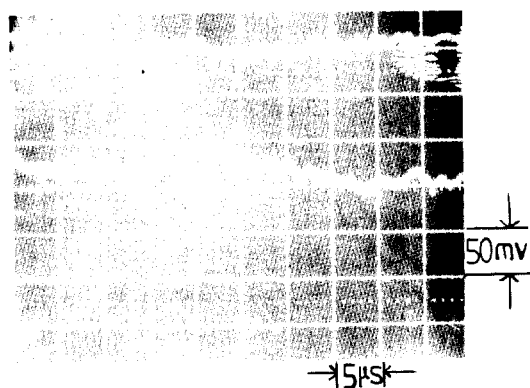


Photo. 2. Typical oscillogram for the laser photolysis of benoxapofen in ethanol. Upper trace is with monitoring light (415 nm) off and lower trace is with the monitoring light on.

같은 여타 기질의 에너지 전이에 의한 광증감현상이 관찰될 수 있어야 한다. 예를 들어 β -carotene의 삼중항 상태의 에너지 준위는 약 22 kcal/mol인 반면에 BXP에 유사한 benzoxazole 유도체들의 삼중항 상태가 50 kcal/mole⁸ 이상임을 미루어 볼 때 BXP로부터의 에너지전이는 충분히 가능하여야 한다. 더욱이 β -carotene 자신만의 계간전이 효율은 대단히 낮으므로 β -carotene 자신의 빛을 흡수하여 삼중항 상태를 생성하기란 대단히 어려운 일이다. 따라서 β -carotene의 삼중항 상태는 BXP의 광증감에 의해서만 그 생성이 가능할 것이다. 이러한 가정을 확인하기 위하여

0.01 mM의 BXP를 0.5 mM의 β -carotene에 혼합하고 질소로 한 시간 이상 포화시킨 뒤에 레이저를 조사시켜 여러 파장에 따라 순간흡수를 측정하였다. Fig. 3은 이 혼합용액의 순간흡수 스펙트럼인데 415 nm의 순간흡수가 레이저 플래쉬 후 10 μ s에 급격히 감소하는 반면에 500~580 nm에서의 흡수는 β -carotene이 없는 BXP의 경우에 비해 오히려 증가됨이 관측되었다. β -carotene이 삼중항 상태에 500~580 nm의 빛을 흡수한다는 사실¹⁰에 비추어 BXP-carotene 혼합용액으로부터 관측된 500~580 nm의 순간흡수는 BXP의 삼중항 상태로부터의 에너지전이에 의해 생성된 β -carotene이 삼중항 상태에 기인된 것으로 사료된다. 실제로 415 nm에서의 흡수의 decay 속도는 β -carotene이 없을 때(약 $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$)보다 있을 때가 더 큼이 관측되었다(약 $6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$). 또한 이 415 nm의 흡수 decay 속도는 β -carotene의 삼중항 생성속도와 거의 일치하고 있다. 이와 같은 결과들은 다시금 415 nm에서의 순간흡수가 BXP의 삼중항 상태에 의한 것임을 확인시켜준 것이라고 사료된다. 이러한 결과는 또한 BXP의 삼중항 상태의 에너지 준위가 β -carotene의 삼중항 에너지 준위인 22 kcal/mole 이상임을 나타낸다.

한편 520 nm 부근의 순간흡수 역시 415 nm 흡수와 같이 산소에 의해 어느 정도 퀸칭이 되어

(Fig. 3) 이 순간흡수도 BXP의 삼중항 상태에 의한 것으로 간주될 수 있겠으나 β -carotene에 의한 켄칭 속도상수를 측정해 본 결과, $8.7 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 로서 415 nm의 경우인 $2.6 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 보다 대단히 작음을 알 수 있다. 이는 520 nm 부근의 순간흡수가 순수한 삼중항 상태에만 기인한 것이 아님을 암시한다고 사료된다. Reszka 등³은 ESR 연구방법에 의하여 에탄올 용액에서 전자전달에 의한 BXP 음이온 라디칼 생성과 수소탈취에 의한 BXP 라디칼 생성을 제안한 바 있다. 이러한 제안은 에탄올이 다른 많은 quinone형 화합물들의 들뜬 삼중항 상태에 수소 혹은 전자 공여체로서 작용할 수 있다는 사실¹¹⁻¹³과도 잘 부합한다. 따라서 520 nm의 흡수가 이와 같은 BXP 라디칼에 기인하리라는 추측은 능히 할 수 있다. 이러한 추측을 확인할 목적으로 라디칼 켄칭로 알려진 2, 4, 6 *t*-butyl-phenol이 BXP의 순간흡수 스펙트럼에 미치는 영향을 조사하였는데 415 nm 부근의 흡수는 거의 변함이 없었으나 520 nm의 흡수는 눈에 띄게 감소함을 확인하였다. 이러한 사실에 의하면 520 nm 부근의 순간흡수가 BXP 라디칼에 기인함이 확실하다. 물론 BXP 라디칼이 에탄올 용매로부터 전자를 받아 생성된 BXP⁻인지 아니면 수소를 전달받아 생성된 BXPH⁻인지는 본 실험방법으로는 확인할 수 없으므로 이에 대한 더 많은 연구가 요청된다.

BXP의 삼중항 상태나 라디칼은 다른 분자들의 경우와 같이 산소와 반응하여 강력한 산화제인 ¹O₂ 또는 O₂⁻을 각각 생성할 수 있다. 본 실험에서 BXP의 삼중항 상태와 라디칼에 의한 순간흡수로 사료되는 415 nm 및 520 nm의 흡수가 산소에 의해 켄칭되는 사실이 이러한 가능성을 뒷받침하고 있다. 결론적으로 에탄올 용액에서 BXP는 빛에 의해 생성되는 삼중항 상태와 라디칼과 같은 중간체와 산소의 경쟁적 반응으로부터 ¹O₂와 O₂⁻의 생성이 촉진되어 다른 기질을 쉽게 산화시킬 수 있는 것이다. 이는 생체 멤브레인의 단백질 성분

인 트립토판의 산화에 대한 BXP의 광증감 작용이 ¹O₂이나 O₂⁻의 켄칭인 N₃⁻ 또는 superoxide dismutase에 의해 효율적으로 켄칭된다는 사실¹⁴과도 잘 일치한다.

본 연구는 한국과학재단과 1989년도 문교부 기초과학육성연구비의 지원에 의한 것입니다.

인 용 문 헌

1. A. M. Kligman and K. H. Kaidbey, *Eur. J. Rheum. Inflamm.*, **5**, 124 (1982).
2. R. H. Sik, C. Paschall and C. F. Chignell, *Photochem. Photobiol.*, **38**, 411 (1983).
3. K. Reszka and C. F. Chignell, *Photochem. Photobiol.*, **38**, 281 (1983).
4. J. M. Yang, Ph. D. Dissertation, Hanyang University, Seoul, Korea (1983).
5. C. R. Goldschmidt, M. Ottolenghi and M. Stein, *Israel J. Chem.*, **8**, 29 (1970).
6. N. Orbach, J. Noras and M. Ottolenghi, *J. Phys. Chem.*, **77** 2831 (1973).
7. J. Movie, et al., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **74**, 1870 (1978).
8. A. R. Eiser, L. J. Leyshon, D. Saunders, M. V. Mijovic, A. Bright and J. Bogie, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 2414 (1972).
9. T. G. Truscott, E. J. Land and A. Sykes, *Photochem. Photobiol.*, **17**, 43 (1973).
10. E. J. Land, A. Sykes and T. G. Truscott, *Photochem. Photobiol.*, **13**, 311 (1971).
11. P. B. Ayscough and R. C. Sealy, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 54 (1973).
12. A. Ledwith, P. J. Russel and L. H. Sutchiffe, *Proc. London*, **A332**, 151 (1973).
13. K. A. Mchauchian and R. C. Sealy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 115 (1987).
14. M. Yoon and K. H. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **8**, 261 (1987).