Kor. J. Food Hygiene 7 (4), 143-147 (1992)

Phenothiazines의 광독성에 미치는 Ascorbic Acid의 영향

김봉희 · 박영아
충남대학교 약학대학

Effects of Ascorbic Acid on the Phototoxicity of Phenothiazines

Bong-Hee Kim and Young-A Park
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 302-764, Korea

ABSTRACT—**This study was conducted to investigate the effects of ascorbic acid on their phototoxicity of four phenothiazine derivatives such as chloropromazine, perphenazine, trifluoperazine and thioridazine. Effects of the test compounds on RBCs were monitored with a spectrophotometer by the method of Kahan *et al.* The extent of photohemolysis by chlorpromazine, perphenazine and thioridazine were decreased with the use of ascorbic acid. It was observed that toxic photoproducts were formed by chlorpromazine and thioridazine with preirradiated. Although red blood cell hemolysis by preirradiated chlorpromazine was decreased with the use of ascorbic acid but thioridazine was not changed.**

Keywords: Chlorpromazine, Trifluoperazine, Thioridazine, Phototoxicity, Photohemolysis, Ascorbic acid

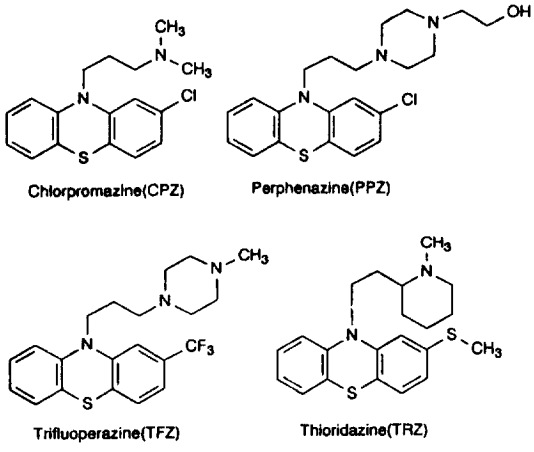
많은 약물들이 섭취 후 일광에 노출되면 광독성 내지 광알러지를 나타내며 그 증상으로 홍반, 부종, 각화증과 더욱 심하게 편평 및 기저세포암종을 일으킨다.[1-3] 또한 화장품, 식품첨가물, 생활일용품, 공업, 농업 등 지속적으로 사용하고 있는 화학물질에 의한 광독성 및 광알러지성 현상이 빈번하게 일어남에 따라 이에 대한 많은 연구가 행해지고 있으며 아울러 그것의 억제제에 대한 연구도 행해지고 있으나 아직까지 그 뚜렷한 결과가 없는 실정이다.[4,5] 더우기 근래에 오면서 에어콘의 냉매, 발포제 및 반도체에 쓰이는 프레온가스(CFC)의 증가로 오존층이 파괴되면서 대기 중의 자외선 증가로 과거 7년간 피부암 수가 2배로 증가되었으며 유엔환경계획(UNEP)은 오존이 10% 감소하면 피부암은 26%가 증가하며 백내장에 의한 실명은 매년 160~175만명이 늘어날 것이라고 발표했다.

화학물질의 광독성, 광알러지성의 실험에 사용되는 방법은 여러가지 방법이 보고되고 있으며,[6] 그 중 일반적으로 행해지는 예비 실험으로는 candida test,[7] photohemolysis,[8] mouse tail oedema[9] 등이 있다.

광독성 약물반응은 주로 phenothiazine tranquilizers와 demethylcholrtetracycliene에서 많이 연구되어 졌으며 특히 chlorpromazine, benoxaprofen은 그 구조와 독성 관계,[10] metabolite의 독성,[11] toxic photoproduct의 형성,[12,13] free radical 생성,[11,14] 생세포화 광결합[15,16] 등에 대한 연구가 보고되어 있으나 이에 대한 확실한 기전이 규명되어 있지 않고 가설만이 있을 뿐이다.

따라서 본 연구는 광독성 및 광알러지를 일으키는 제반 약물이나 화학물질의 안정성과 생체이용률을 높이고 현재까지 확실하게 규명되어 있지 않은 약물 및 화학물질에 의한 광독성 광알러지성의 기전을 이해하고 설명할 수 있는 학문적 기초를 확립하고자 phenothiazines 중 몇가지 약물을 택하여 적혈구를 이용한 광용혈 여부와 이에 미치는 ascorbic acid의 영향을 조사하였다.

Received for publication 10 August, 1992
Reprint request: Dr. B.H. Kim at the above address



Scheme 1. The four phenothiazines tested and their chemical structure.

재료 및 방법

실험에 사용한 Chlorpromazine(CPZ), Perphenazine(PPZ), Trifluoperazine(TFZ), Trioridazine (TRZ)은 U.S.P.로써 그 구조는 Scheme 1과 같다. 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다.

Packed red blood cells는 적십자 혈액원에서 구입하여, 4℃에서 10일간 사용가능하였다.

UVA는 black-light fluorescent tube 40 W F40 T10 BL-B, FL40S BL-B, Sanyo Denki(output는 10 cm에서 2.5 mW/cm, emission peak는 350 nm)를 사용하였다.

Toxic photoproducts의 생성 유무

농축 적혈구(packed human red blood cells)를 physiological saline으로 세척하여 20 v/v% 적혈구 현탁액을 만들었다. Photohemolysis는 Kahn 등의 방법[17]에 준해 측정하였다.

각 약물 CPZ, TFZ, TRZ을 phosphate buffered saline으로 농도가 50 μg/ml가 되게 만들어 이 약물 용액 5 ml를 Quartz에 취하고 20 v/v% 적혈구 현탁액 20 μl를 가한 다음 UVA를 30분간 조사(암실, 10 cm 거리)하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상징액 3 ml를 취해서 540 nm에서 흡광도를 측정하여 100% hemolysis 용액에 대한 % hemolysis를 구하였다.

따로 각 약물 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ 농도 50 μg/ml의 용액을 quartz에 취해 위와 같은 조건으로 UVA를 30분간 조사(암실, 10 cm 거리)한 후, 적혈구 현탁액을 가해 % hemolysis를 구하여 그 결과를 위와 비교하여 toxic photoproduct 생성 유무를 관찰하였다.

100% hemolysis 용액은 0.04% NH_4OH 5 ml에 20 v/v% 적혈구 현탁액 20 μl를 가해 상기와 같은 방법으로 하여 측정한 값으로 하였다.

Toxic photoproduct 생성에 미치는 ascorbic acid의 영향

약물 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ 농도 50 μg/ml인 phosphate buffered saline 용액과 ascorbic acid 농도 2 mg/100 ml, 10 mg/100 ml, 50 mg/100 ml, 100 mg/100 ml인 phosphate buffered saline 용액을 만들었다. 각 약물 3 ml와 각 농도의 ascorbic acid 3 ml를 각각의 quartz에 함께 취하고 UVA를 30분간 조사(암실, 10 cm 거리)한 다음 20 v/v% 적혈구 현탁액 20 μl를 가해 % hemolysis를 구하고, 각 약물에 대해 ascorbic acid 각 농도에 대한 % hemolysis를 비교하여 toxic photoproduct에 의한 RBC hemolysic에 미치는 ascorbic acid의 역할을 관찰하였다.

약물의 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 영향

Phosphate buffered saline으로 각 약물 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ 농도 50 μg/ml, ascorbic acid 농도 2 mg/100 ml, 10 mg/100 ml, 50 mg/100 ml, 100 mg/100 ml 용액을 만들었다. 각 약물 3 ml와 각 농도의 ascorbic acid를 3 ml씩 각각의 quartz에 함께 취하고 20 v/v% 적혈구 현탁액 20 μl를 넣고 UVA를 30분간 조사(암실, 10 cm 거리)한 다음 % hemolysis를 구하였다. Ascorbic acid 각 농도에 대한 각 약물의 % hemolysis를 비교하여 각 약물의 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 역할을 관찰하였다.

결과 및 고찰

일반적으로 광독성에 관련되는 태양 스펙트럼은 290~700 nm이며, 이보다 더 짧은 파장은 대기 중에서 흡수되고, 긴 파장은 단지 조직에 열을 가할 뿐이다. 파장을 물리적, 독성학적 측면에서 분류하면, 220~280 nm로 UV-C로, 280~320 nm를 UV-B로,

320~400 nm를 UV-A로, 400~760 nm를 가시부라 하며, UV-C는 지구표면에서 받는 햇빛 중에는 존재하지 않지만, DNA와 단백질에 심한 광화학적 장애를 일으킬 수 있다. UV-B는 피부의 병리변화에 관여하는 주영역이며, 또한 UV-A는 광감각 반응에 관여한다. 가시광선은 대부분의 단백질과 DNA에 광화학적 반응을 일으키는데 필요한 에너지는 부족하지만, 색깔이 있는 물질이나 rhodopsin 또는 chlorphyll같은 분자에 의해 잘 흡수된다.[18]

본 연구에 앞서 각 약물의 5×10^{-5} M phosphate buffered saline 용액과 이를 UVA로 30분간 조사한 후의 UV spectrum을 비교한 결과 UVA조사 전보다 각 약물의 흡광도가 작아졌는데 이는 Ljunggren의 보고와 일치하였다.[11] 각 약물농도와 UVA조사 시간에 의한 photohemolysis를 조사한 결과[19]에 따라 본 실험에서는 각 약물농도를 50 μg/ml로 하고 UVA 조사시간은 30분으로 하였다. 또한 약물에서 UVA 조사 후 광분해 산물의 생성여부를 알아보고자 UVA조사 전·후의 TLC를 비교하였다.

즉 각 시료약물을 benzene : dioxane : ammonium hydroxide(28%)를 12 : 7 : 1로 하여 silicagel plate 상에서 전개시킨 뒤 상온에서 건조시켜 10% $SbCl_3$를 분무하고, 110℃로 10분간 가열시켜 나타나는 spot의 Rf치는 CPZ : 0.577, PPZ : 0.205, TFZ : 0.111, TRZ : 0.388이였고, 각 약물 용액을 UVA 조사 후 같은 방법으로 TLC 상에서 관찰하였을 때 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ의 함량은 감소됨과 동시에 각각의 광분해산물이 생성되어 나타났다.

Toxic photoproduct의 생성유무

Photohemolysis는 약물이 UV에 의해 excited state가 된 뒤 ground state로 되면서 에너지가 세포막을 peroxidation시켜 colloid osmotic hemolysis[1,4]를 일으키는 것과 UV에 의해 약물이 toxic photoproduct[13,14]를 형성하여 photohemolysis를 일으키는 두 가지 기전으로 분류되어진다.

Toxic photoproduct의 생성여부를 알아보기 위하여 약물에 RBC를 넣어 Drug-RBC suspension을 만든 다음 UVA를 조사한 경우와 약물만 UVA를 조사한 후 RBC를 넣어 실험한 경우와를 비교하였다. Drug-RBC suspension을 만든 다음 UVA를 조사한 경우 CPZ은 83.95%, PPZ은 79.05%, TFZ은 89.99%, TRZ은 50.99%의 photohemolysis를 나타내었다. 반면 약물만 UVA로 조사한 후 RBC를 넣어 실험한 경우는 CPZ, TRZ은 각각 89.75%, 68.47%로 Drug-RBC suspension를 만든 다음 UVA를 조사한 경우와 비슷한 photohemolysis를 나타내었으나 PPZ, TFZ은 각각 18.74%, 7.14%로 Drug-RBC suspension을 만들어 UVA를 조사한 경우에 비해 photohemolysis를 거의 나타내지 않았다(Fig. 1).

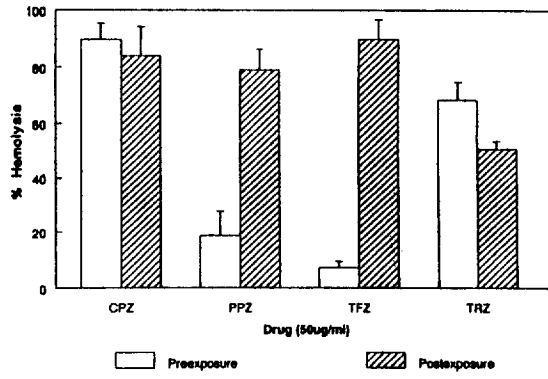


Fig. 1. Comparision of photochemolytic effect of phenothiazines induced by exposion to UVA, before (preexposed) and after (postexposed) addition of RBC to the drug.
All values are the mean± S.D. of 5 experiments. **p<0.01, compaired with preexposure using unpaired t-test.

상기 photohemolysis의 두 기전을 실험결과와 비교하여 볼 때 CPZ, TFZ은 Drug-RBC suspension 뿐 아니라 약물만을 UVA 조사한 뒤 RBC를 넣을 때 photohemolysis하는 것으로 보아 toxic photoproduct의 형성에 의한 photohemolysis가 주가 아닌가 생각되고, PPZ, TFZ은 약물만을 UVA조산한 뒤 RBC를 넣을 때는 photohemolysis가 없었고 Drug-RBC suspension에 UVA를 조사했을 때만 photohemolysis를 하는 것으로 보아 toxic photoproduct의 형성보다는 colloid osmotic hemolysis에 의한 photohemolysis로 생각되어진다.

Toxic photoproduct 생성에 미치는 ascorbic acid의 영향

Phenothiazines류 약물의 광독성에는 free radical이 중요한 역할을 하고 있으며 또한 매우 반응성이 큰 물질들이 관여되고 있음이 간접적으로 알

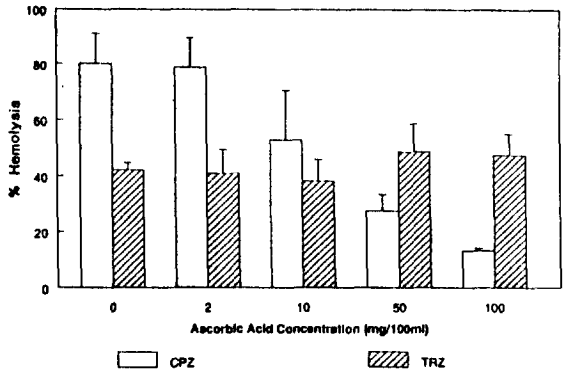


Fig. 2. Effect of ascorbic acid on red blood cell hemolysis induced by the preexposion of CPZ and TRZ to the UVA*.
All values are the mean± S.D. of 5 results.
*The black light fluorescent tube for 30 min at 37℃ (350 nm, 2.5 mW/cm)
**Significantly defferent from the control($p<0.01$).

려져 있다.

또한 ascorbic acid는 항산화제로서 체내에서 활성산소를 제거하는 역할과 lipid peroxidation을 억제하는 등 여러 기능을 하고 있다. 따라서 ascorbic acid가 광독성 약물의 photohemolysis에 관여하는 free radical이나 기타 다른 광생성물질을 억제하여 광독성 내지 광알러지에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 먼저 toxic photoproduct 생성에 미치는 ascorbic acid의 영향을 알아보고자 toxic photoproduct의 생성에 의해 photohemolysis가 일어나는 CPZ, PPZ를 UVA 조사시킬 때 ascorbic acid를 농도별로 첨가하여 UVA조사시킨 후 RBC를 가해 % hemolysis를 구하였다. 실험결과 CPZ은 첨가된 ascorbic acid의 양에 따라 photoproduct에 의한 hemolysis가 유의성있게 감소하였으나($p<0.01$), TRZ은 ascorbic acid 첨가에 영향을 받지 않았다. 이와 같은 결과로 ascorbic acid는 CPZ의 toxic photoproduct 생성을 억제하나, TRZ의 toxic photoproduct 생성에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2).

약물의 photohemolysis에 미치는 ascrobic acid의 영향

각 약물에 의한 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 영향을 알아보고자 Drug-RBC suspension에 ascorbic acid를 0 mg/100 ml, 100 mg/100 ml, 50 mg/100 ml, 100 mg/100 ml 농도별로 가한 후 UVA에 노출시켜 ascorbic acid 농도 변화에 따른 % hemolysis를 조사한 결과 CPZ은 ascorbic acid 농도에 따라 79.33%, 76.77%, 78.01%, 41.27%, 39.37%, PPZ은 60.31%, 46.61%, 41.94%, 22.59%, 23.14%, TRZ은 64.26%, 62.83%, 35.39%, 33.05%, 32.75%로 photohemolysis가 유의성있게 감소되었으나($p<0.01$), TFZ의 photohemolysis는 ascorbic acid의 영향을 받지 않았다(Table 1).

감사의 글

본 연구는 1991년도 신약개발 연구지원사업(보건사회부)과 의약품 개발연구소(충남대학교, 약학대학)의 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

Table 1. Effect of ascorbic acid on red blood cell hemolysis of phenothiazines by UVA irradiation*

Drug (50 μg/ml)	Ascorbic acid concentration (mg/100 ml)				
	0	2	10	50	100
CPZ	79.33± 7.52	76.77± 2.21	78.01± 1.49	41.27± 10.13**	39.37± 11.03**
PPZ	60.31± 9.15	46.61± 9.55	41.94± 9.88	22.59± 9.70**	23.14± 4.80**
TFZ	89.09± 7.67	89.57± 6.75	84.05± 1.23	83.44± 0.62	77.30± 2.45
TRZ	64/26± 4.57	62.83± 0.79	35.59± 9.43**	33.05± 7.26**	32.75± 5.00**

Values are the mean± S.D. of 5 experiments.
*The black light fluorescent tube for 30 min at 37℃ (350 nm, 2.5 mW/cm).
**Significantly different from the control ($p<0.01$).

국문요약

Phenothiazine류의 약물 중 chlorpromazine, perphenazine, trifluoperazine, thioridazine의 광독성에 대한 ascorbic acid의 영향을 조사하였다. 각 약물 농도를 50 μg/ml로 하고 UVA(350 nm, 2.5 mV/cm)로 조사기간은 30분으로 하여 적혈구의 광용혈현상을 Kahn 등의 방법에 의해 spectrophotometer로 측정한 결과 chlorpromazine, perphenazine, thioridazine에 의한 광용혈정도는 ascorbic acid에 의해 유의성 있게 감소되었다. 또한 적혈구를 가하기 전 각 약물을 미리 조사시켜 생성된 물질에 의한 광용혈현상의 광독성 생성물질은 chlorpromazine과 thioridazine에서 보여졌으며, chlorpromazine의 광독성 생성물질에 의한 적혈구 용혈현상만 ascorbic acid에 의해 감소되었다.

참고문헌

1. Edward, S., Rina, S.: Drug-induced photosensitivity, *JAPA.*, **13**(4), 200-204 (1973).
2. Ferguson, J., Addo, H.A., MaGill, P.E., Woodcock, K.R., Johson, B.E., Frain-Bell, W.W.: A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. *Br. J. Dermatol.*, **107**, 429-442 (1982).
3. Klassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J.J.: Casarett and Doull's Toxicology. Macmillan, 3rd. 412-431 (1986).
4. Harber, L.C., Baer, R.L.: Pathogenic mechanism of drug-induced photosensitivity. *J. Invest. Dermatol.*, **58**(6), 327-342 (1972).
5. Ljuggren, B.: Inhibition of ultraviolet and phototoxic dermatitis in the mouse. *Acta. Derm.*, **58**, 307-312 (1978).
6. Emmett, E.A.: Phototoxicity from exogenous agents. *Photochem. Photobiol.*, **30**, 429-436 (1979).
7. Ljunggren, B.: Propionic acid derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic *in vitro*. *Photodermatol.*, **2**, 3-9 (1985).
8. Gary, A.E., Michele, T.S.: Photosensitized lysis of red blood cell by phototoxic antimalarial compounds. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 39-43 (1987).
9. Ljuggren, B., Moller, H.: Drug phototoxicity in mice. *Actal. Derm.*, **58**, 125-130 (1987).
10. Ljinggern, B., Moller, H.: Phototoxic reaction to chlorpromazine as studied with the quantitative mouse tail technique. *Acta. Derum.*, **56**, 373-376 (1976).
11. Lijunggern, B., Moller, H.: Phenothiazine phototoxicity; An experimental study on chlorpromazine and its metabolites. *J. Invest. Dermatol.*, **68**, 313-317 (1977).
12. Saucin, M.: Mechanisms of photosensitization by phenothiazine derivatives. *Acta. Int. Physiol. Biochem.*, **87**, 1051-1052 (1979).
13. Guy, F.W., Kays, H.K., Alvert, M.K.: Phototoxicity from benoxaprofen; *In vivo* and *in vitro* studies. *Photochem. Photobiol.*, **36**, 59-64 (1982).
14. Moore, D.E., Tamat, S.R.: Photosensitization by drugs; Photolysis of some chlorine-containing drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 172-177 (1989).
15. Marko, J., Vermeersch, G., Febvay-Garot, N., Lablache-Combier, A.: Photo-CIDNP in nucleic acid bases and their nucleotides induced by chlorpromazine and analogs. *Photochem. Photobiol.*, **42**, 213-221 (1985).
16. Tomas, A.C., Gary, A.E., Irene, E.K.: Photoaddition of chlorpromazine to guanosine-5-monophosphate. *Photochem. Photobiol.*, **43**, 607-613 (1986).
17. Guinter Kahn, M.M. and Barbara Fleischaker, B. S., M.T.(ASCP): Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. *J. Invest. Dermatol.*, **56**, 85-90 (1971).
18. Wilkinson, J.B. and Moore, R.J.: Sunscreen, suntan and anti-sunburn products, Harry's cosmeticology. Chemical Publishing Company, Inc., New York (1982).
19. Kim, B.H. and Back, K.H.: Comparative study on red blood cell hemolysis and yeast test by photosensitizing compounds. *Kor. J. Environ. Toxicl.*, **5** (2), 45-50 (1990).