J. Fd Hyg. Safety 13(3), 232 - 237(1998)

UVB조사에 의한 Phenothiazine의 광독성에 미치는 Ascorbic Acid의 영향

임연일 · 김종예 · 김봉희†
충남대학교 약학대학

Effect of Ascorbic Acid on the Phototoxicity of Phenothiazines by UVB Irradiation

Youn-Il Im, Jong-Yea Kim and Bong-Hee Kim†
College of Pharmacy, Chungnam National University, Teajeon 305-764, Korea

ABSTRACT— The purpose of this study is to examine the phototoxicity of four phenothiazine derivatives such as chlorpromazine, perphenazine, trifluoroperazine and promethazine, and to investigate the effects of ascorbic acid on their phototoxicity by UVB irradiation. Effects of the test compounds on RBCs were monitored with a spectrophotometer by the method of Kahn et al. The extent of photohemolysis by tested phenothiazine derivatives were increased with their concentration and toxic photoproducts were formed by chlorpromazine and promethazine with preir-radiated UVB. Photohemolysis postirradiated chlorpromazine and perphenazine and preir-radiated promethazine were decreased with the use of ascorbic acid significantly.

Key words □ Phenothiazines, Photohemolysis, Postirradiation, Preirradiation, Ascorbic acid, UVB

많은 약물들이 섭취 후 일광에 노출되면 광독성 및 광알러지를 나타내며 그 증상으로 홍반, 화상, 부종, 각화증, 편평, 및 기저세포암종을 일으키며,[1-3] 의약품, 생활일용품, 음료, 산업생산물, 향장품[4] 등에 대한 광독성및 광알러지의 유무를 밝히기 위해 많은 연구가 행해지고 있다.

약물에 의한 광감작은 어떤 화학물질 투여 후 빛에 연속적으로 노출되었을 때 생기는 바람직하지 않은 피부반응을 말한다. 이런 반응에서는 두 가지 다른 기전 즉 광독성과 광알러지를 거치는데 이들에 대해 자세한 기전은 잘 알려지지 않았으나, 그 첫 번째 단계는 이들 약물 또는 phototoproduct에 의해 빛이 흡수된다는 것으로 알려져 있다.

독성에 관련된 태양 스펙트럼은 290~700 nm이며, 이보다 짧은 파장은 상층 대기 중에 오존이나 산소 등에 의해 흡수되고, 긴 파장은 단지 조직에 열을 가할 뿐이다. 파장을 물리적, 독성학적 측면에서 분류하면 220~280 nm를 UVC로, 280~320 nm를 UVB, 320~400 nm를 UVA로 400~760 nm를 가시부로 정의한다. 자외선은 그 자체로도 피부에 여러 병변을 일으키는 것으로 알려져 있다. 파장이 짧을수록 광에너지의 양은 증가되고, 이는 구성분자간의 결합을 파괴할 정도로 커서 인체에 많은 변화를 가져온다. 가장 유해하다고 생각되는 UVC는 오존층에 의해 거의 흡수되고 UVA, UVB 만이 지표에 도달되며 자외선중 UVB는 1~10%를 차지한다. 피부에 대한 파장별 자외선의 영향을 비교해 보면, UVA는 진피의 유두층, 망상층까지 영향을 미치고 탄력섬유(elastin)와 콜라겐 (collagen)의 붕괴로 탄력 감소, 조기노화를 초래한다. 또 모세혈관의 확장 및 파괴로 피부의 근본조직을 와해시킨다. UVB는 살갗의 표피층에 작용하고 급속한 화상이나 홍반을 일으킨다. 더 진행되면, 멜라닌 색소 형성, 색소침착으로 선탠이 일어나고, 손상된 피부세포를 수복하여 각화이상을 일으키고, 각질층 중의 수분감소와 살갗이 거칠어지며 만성 노출시 피부주름이 생긴다.[7] 또한 DNA에 손상을 주며 glycosaminoglycan 이 증가되어 collagen이 변하게 된다.[8] 게다가 90년대 들어서면서부터 남반구에서 오존이 감소함에 따라 UVB조사량이 증가하는 것이 관측되었고,[5] 캐나다에서는 수년 동안의 오존감소에 의해 UV 조사량이 증가하고 있다는 것이 보고된 바 있다.[6] 따라서 UVB에 의한 광독성이 더 심각한 문제가 될 수 있다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

향정신성 의약품으로 사용되는 phenothiazine류의 신경안정제는 이 약물을 복용하는 환자에게서 광독성과 광알러지를 일으킨다고 보고되고 있다. Phenothiazine류의 약물중 chlorpromazine에 대한 연구가 가장 많이 되고 있어 그 구조와 독성관계,[11] toxic photoproduct의 형성,[12,13] free radical 생성,[14,15] 생세포와 광결합,[16,17] 등에 대한 연구가 많이 보고되고 있다. 일반적으로 phenothiazine류 약물은 구조상으로 볼 때 phenothiazine의 2번 위치에 -Cl, $-CF_3$, $-SCH_3$기가 있는 유도체들에서 광용혈성이 크나,[18] 각 약물의 광독성 강도는 Ljunggren, Marko, Muller, Widmere 등이 보고한 바와 같이 측정법에 따라서 상이한 결과를 나타낸다.

Ascorbic acid는 항산화제로서 체내에서 생성된 활성산소를 제거하고 lipid peroxidation을 억제하고 collagen, proteoglycans을 합성하는 등 많은 기능을 가지고 있다.[19]

이에 본 실험에서는 phenothiazine류 중 chlorpromazine, perphenazine, trifluoperazine, promethazine을 선택하여 UVB (312 nm) 조사에 대한 각 약물의 농도에 따른 용혈정도를 알아보았다. 각 약물의 UVB에 대한 적혈구 용혈현상의 기전을 알아보기 위해 각 약물의 photoproduct의 생성유무를 알아보았다. 그리고 이들 약물의 광용혈성 및 각 약물의 toxic photoproduct에 미치는 ascorbic acid의 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

실험에 사용한 chlorpromazine(CPZ), perphenazine(PPZ), trifluoperazine(TFZ), promethazine(PMZ)은 U.S.P를, 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급을 사용했고, 농축적혈구 packed red blood cell은 적십자 혈액원에서 구입하였고 4°C에서 1개월간 사용했다. 기기로는 UV spectrophotometer(Jasco V-500), UV irradiation(RMX-3W)를 사용하였다. 실험조건은 UVB 312 nm에서 1.5 J/cm^2 조사후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

약물의 농도에 따른 photohemolysis

Photohemolysis는 Kahn 등의 방법[18]에 준하여 측정하였다.

농축 적혈구(packed human red blood cells)를 생리식염수로 세척하여 적혈구 현탁액을 만들었다. 각 약물 CPZ, PPZ, TFZ, PMZ을 생리식염수로 농도가 12.5 μg/m*l*, 25 μg/m*l*, 50 μg/m*l*, 100 μg/m*l*되게 만들어 이 약물용액 5 m*l*와 적혈구 현탁액 20 μ*l*를 Quartz에 취하고 UV irradiator에서 1.5 J/cm^2 조사한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상층액을 취해서 540 nm에서 흡광도를 측정하여 100% hemolysis 용액에 대한 % hemolysis를 구하였다.

100% hemolysis 용액은 0.04% NH_4OH 5 m*l*에 적혈구 현탁액 20 μ*l*를 가해 상기와 같은 방법으로 하여 측정한 값으로 하였다.

Toxic photoproduct의 검토

각 약물 CPZ, PPZ, TFZ, PMZ을 생리식염수로 농도가 50 μg/m*l*가 되게 만들어 이 약물용액 5 m*l*와 적혈구 현탁액 20 μ*l*을 Quartz에 취하고 UVB를 조사(1.5 J/cm^2)하여 % hemolysis를 구한다.

따로 각 약물 CPZ, PPZ, TFZ, PMZ 농도 50 μg/m*l*의 용액을 Quartz에 취해 위와 같은 조건으로 UVB 조사(1.5 J/cm^2) 후 적혈구 현탁액을 가해 % hemolysis를 구하여 그 결과를 위와 비교하여 toxic photoproduct 생성 유무를 관찰하였다.

약물의 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 영향

각 약물 CPZ, PPZ을 50 μg/m*l* 농도와 ascorbic acid는 5 mg/100 m*l*, 10 mg/100 m*l*, 50 mg/100 m*l*, 100 mg/100 m*l* 용액을 인산완충 생리식염액(phosphate buffered saline)으로 만든다.

각 약물 3 m*l*와 각 농도의 ascorbic acid 3 m*l*와 적혈구 현탁액 20 μ*l*를 Quartz에 함께 취하고 UVB 조사(1.5 J/cm^2)하여 % hemolysis를 구하고, 각 약물에 대해 ascorbic acid 각 농도에 대한 % hemolysis를 비교하여 각 약물의 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 역할을 관찰하였다.

Toxic photoproduct 생성에 미치는 ascorbic acid의 영향

약물 CPZ 50 μg/m*l*, PMZ 100 μg/m*l* 농도와 ascorbic acid 5 mg/100 m*l*, 10 mg/100 m*l*, 50 mg/100 m*l*, 100 mg/100 m*l* 용액을 인산완충 생리식염액으로 만든다.

각 약물 3 m와 각 농도의 ascorbic acid 3 m*l*를 Quartz에 함께 취하고 UVB 조사(1.5 J/cm^2)하여 적혈구 현탁액을 가하고 암실에서 30분간 방치한 후 % hemolysis를 구하고, 각 약물에 대해 ascorbic acid 각 농도에 대한 % hemolysis를 비교하여 toxic photoproduct에 의한 RBC hemolysis에 미치는 ascorbic acid의 역할을 관찰하였다.

결과 및 고찰

약물 농도에 따른 photohemolysis

각 약물의 농도에 따른 photohemolysis는 Table 1과 같이 얻었다.

CPZ, PPZ, TFZ은 농도가 25 μg/m*l*일 때 급격한 pho-

tohemolysis를 나타내며 12.5 μg/ml일 때 보다 CPZ은 4.81배(4.04→19.44), PPZ은 18.15배(4.17→75.70), TFZ은 4.09배(13.17→53.89)로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 큰 영향을 나타내지 않았다. PMZ은 모든 농도에서 매우 낮은 photohemolysis를 보였다.

이 결과를 UVA조사시 약물의 광용혈작용과 비교해 볼 때 % hemolysis가 낮게 나타났다. 이는 UVA조사시에는 인산완충 생리식염액을 사용하여 일정한 pH를 유지시켰기 때문이며 그결과는 veronal 완충액을 사용했음에도 동일한 결과였다.[9] 본 실험에서는 생리식염수만을 사용하였으므로 시험물질이 용해시 pH변화에 따른 그 자체로 용혈이 일어나 상대적으로 수치가 적어진 것으로 생각된다. 또한 UVA 조사에서와 같이 UVB 조사에서도 약물의 농도에 따라 % hemolysis가 증가하였다(Table 1, 2).

Toxic photoproduct의 검토

약물의 UV에 의해 일으키는 photohemolysis는 두가지 기전으로 분류되어지는데 이는 UV에 의해 생성된 방출 에너지가 세포막을 peroxidation시켜 colloid osmotic hemolysis[1,4]를 일으키는 것과 UV에 의해 약물이 toxic photoproduct[13,14]를 형성하여 photohemolysis를 일으키는 것이다.

Toxic photoproduct의 생성여부를 검토하기 위해 Drug-RBC suspension을 만든 다음 UV를 조사한 경우와, 약물만을 조사한 후 RBC를 넣어 실험한 경우를 비교하였다. 결과는 Fig. 1과 같이 얻었다.

Table 1. Effect of dose of the drug in saline on red blood cell hemolysis by UVB irradiation

	Drug concentration (μg/ml)			
	12.5	25	50	100
CPZ	4.04±1.07	19.44±2.80	65.65±1.73	59.36±0.98
PPZ	4.17±0.49	75.70±3.47	63.16±2.21	70.38±1.06
TFZ	13.17±3.84	53.89±3.50	62.73±3.37	70.64±0.38
PMZ	0.92±0.09	1.56±0.19	2.54±0.04	6.47±1.12

※ UVB-312 nm, 1.5 J/cm^2

이 photohemolysis를 일으키는 두가지 기전을 실험결과와 비교하여 볼 때 CPZ은 Drug-RBC suspension뿐 아니라 약물만을 UVB조사한 뒤 RBC를 넣을때도 % hemolysis가 그다지 저하되지 않은 것으로 볼 때 CPZ는 colloid osmotic hemolysis뿐아니라 UVB조사에 의해 생성된 광독성 물질이 적혈구 용혈작용이 있다고 보여진다. 또한 PMZ는 같은 농도에서의 % hemolysis는 후자가 전자의 경우보다 더 높은 점으로 보아 toxic photoproduct의 형성에 의한 photohemolysis가 주가 아닌가 생각된다. TFZ과 PPZ은 약물만을 UVB조사 뒤 RBC를 넣을 때는 photohemolysis가 현저히 줄어드는 것으로 보아 toxic photoproduct의 형성보다는 colloid osmotic hemolysis에 의한 photohemolysis로 생각된다(Fig. 1, Table 3). 그러나 PPZ의 경우 UVA 조사시 preexposure한 경우 적혈구 용혈작용이 높게 나타났고 UVB 조사시에는 postexposure시 높게 나타나 자외선 파장

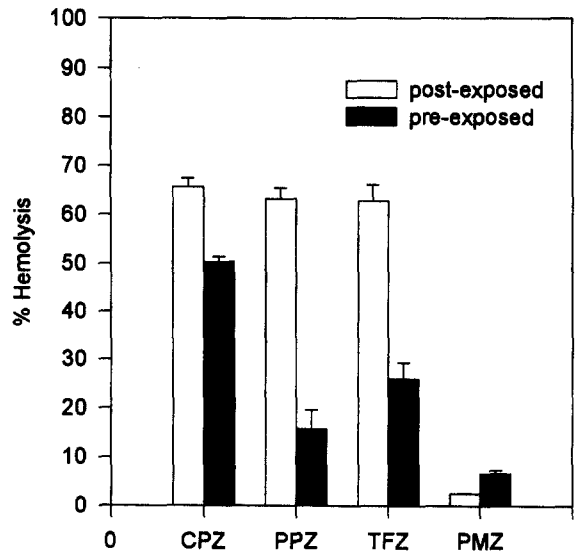

Fig. 1. Comparision of photohemolytic effect of phenothiazines induced by the exposure to UVB, before (preexposed) and after(postexposed) addition of RBC to the drug. Drugs (50 μg/ml), UVB (312 nm, 1.5 J/cm^2).

Table 2. Effect of dose of the drug in phosphate buffered saline on red blood cell hemolysis by UVA irradiation[9]

	Drug concentration (μg/ml)				
	1	10	25	50	100
CPZ	0.4±0.38	3.5±0.46	43.24±0.59	85.50±0.91	96.08±2.00
PPZ	1.48±0.38	6.52±0.42	80.70±1.55	85.28±1.05	96.38±1.37
TFZ	1.22±0.46	8.84±0.40	58.54±0.81	92.38±1.40	87.50±1.07
PMZ	0	0	0	0	0

※ UVA-The black light fluorescent for 10 min. at 37°C (350 nm, 2.5 mW/cm)
※ Values are the mean±S.D. of experiments

Table 3. Comparison of preexposed drug with postexposed drug irrdiated by UVA[10]

Drug conc. 50 μg/ml	CPZ	PPZ	TFZ
Postexposure[a]	83.95±10.31	18.74±8.94**	89.99±6.95**
Preexposure[b]	83.75±5.61	79.05±7.46	7.14±2.05

[a] Drug-RBC suspension were exposed to UVA (40W; 2 BLB fluorescent tube; at the distance of 10 cm) for 30 minutes.
[b] Drugs (50 μg/ml) were preexposed to UVA (40W; 2 BLB fluorescent tube; at the distance of 10cm) for 30 minutes and then 20 μl RBC were added to the preexposed drugs.
**p<0.01 Compared with preexposure using unpaired t-test
※ Values are the mean±S.D. of experiments

에 따라 그 작용기전이 다르게 나타났으므로 이에 대한 보다 자세한 실험이 요구된다.

Phenothiazines류 약물의 광독성에는 free radical이 중요한 역할을 하고 있으므로[21] 본 연구실에서는 CPZ, PPZ, TFZ, thioridazine(TRZ)의 UVA조사에 의한 광용혈작용시 free radical에 의한 적혈구막의 지질과산화 여부를 알아보고자 Malondialdehyde생성을 TBA법으로 조사한바 CPZ, PPZ는 약물농도 증가(1 μg/ml, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml)와 함께 TBA-MDA reactivity가 증가하였고 TFZ, TRZ는 약물농도가 10 μg/ml에서 TBA-MDA reactivity가 강하게 나타났었다.[21] 따라서 UVB조사시에도 free radical에 의한 적혈구 용혈작용으로 생각된다.

약물의 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 영향

CPZ, PPZ에 의한 photohemolysis에 미치는 ascorbic acid의 역할은 Table 4와 같이 얻었다.

실험결과 CPZ 및 PPZ 모두 ascorbic acid가 없을때에 비해 첨가한 최소농도(5 mg/100 ml)부터 유의성 있게 photohemolysis 감소시켰다. Ascorbic acid는 CPZ, PPZ의 photohemolysis를 감소시켰다(Table 4, 5).

Toxic photoproduct생성에 미치는 ascorbic acid의 영향

Phenothiazines류 약물의 광독성에는 free radical이 중요한 역할을 하고 있으며 또한 매우 반응성이 큰 물질들이 관여되고 있음이 간접적으로 알려져 왔다. Ascorbic acid는 항산화제로서 체내에서 활성산소를 제거하는 역할을 하고 lipid peroxidation을 억제하는 등 여러 기능을 하고 있다.[25] Toxic photoproduct의 생성에 미치는 ascorbic acid의 영향을 알아 보기 위해 toxic photoproduct의 생성에 의해 photohemolysis가 일어나는 CPZ, PMZ를 UV조사시킬 때 as-

Table 4. Effect of ascorbic acid on red blood cell hemolysis induced by irradiated UVB

Drug (50 μg/ml)	Ascorbic acid concentration (mg/100 ml)				
	0	5	10	50	100
CPZ	78.11±3.97	22.24±2.63*	19.26±3.03*	9.30±0.73*	8.73±0.62*
PPZ	79.28±3.19	29.66±5.39*	20.27±4.57*	14.76±3.51*	10.32±3.49*

*P<0.01 Compared with control(ascorbic acid concentration 0mg/100ml)
※UVB-312 nm, 1.5 J/cm^2

Table 5. Effect of ascorbic acid on red blood cell hemolysis induced by irradiated UVA[10]

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

※ Values are the mean±S.D. of experiments
※UVA-The black light fluorescent for 10 min. at 37°C (350 nm, 2.5 mW/cm)

Table 6. Effect of ascorbic acid on the photohemolysis by toxic photoproduct

Drug conc.	Ascorbic acid concentration (mg/100 ml)				
	0	5	10	50	100
CPZ 50 μg/ml	73.82±9.29	73.24±1.47	14.13±1.44	6.41±0.88	5.66±0.62
PMZ 100 μg/ml	17.56±0.25	6.66±2.56	3.67±0.41**	2.80±0.22**	3.40±0.70**

**P<0.05 Compared with control (ascorbic acid concentration 0mg/100ml), mean±S.D., n=3-4

corbic acid를 농도별로 첨가하여 UVB조사시킨후 RBC를 가해 % hemolysis를 구하였다. 그 결과 ascorbic acid의 농도에 따른 정도를 Table 6과 같이 얻었다. Ascorbic acid는 CPZ의 toxic photoproduct의 생성을 억제하고, PMZ의 경우 또한 유의성있게 억제시켰다(Table 6).

감사의 말씀

본 논문은 1996년도 충남대학교 약학대학 의약품개발연구소 연구비지원에 의한 연구결과로서 이에 감사드립니다.

국문요약

광독성 및 광알러지를 일으키는 물질인 phenothiazine계 약물중 chlorpromazine(CPZ), perphenazine(PPZ), trifluoperazine(TFZ), promethazine(PMZ)을 택하여 적혈구에서의 광용혈현상을 Kahn 등의 방법에 의해 UVB (UV irradiation RMX-3W, 1.5 J/cm^2)을 조사하여 약물 농도별로 측정한 결과 CPZ, PPZ은 UVB 조사에 의해 약물농도에 따라 현저히 적혈구 용혈현상이 증가 되었으며 이는 ascorbic acid에 의해 유의성있게 감소되었고, 각 약물의 광독성 물질 생성 여부와 이에 의한 용혈독성을 조사해보니 CPZ, PMZ에서 관찰되었고 ascorbic acid에 의해 그 현상이 감소되었다.

참고문헌

1. Edward, S. and Rina, S.: Drug-induced photosensitivity. *JAPA,* **13**(4), 200 (1973).
2. Furguson, H., Addo, A.A., MaGill, P.E., Wood-cock, K. R., Johson, B.E. and Frain-Bell, W.W.: A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. *Br. J. Dermatol.,* **107**, 429 (1982).
3. Klassen, C.C., Amdur, M.O. and Doull, J.: Casarett and Doull's Toxicology. 3rd. Macmillan, pp.412 (1986).
4. Harber, L.C. and Baer, R.L.: Pathogenic mechanism of drug-induced photosensitivity. *J. Invest. Dermatol.,* **58**(6), 327-342 (1972).
5. Seckmeyer, G.B., Mayer, R.E. and Bernhard, G.: UV-B in Germany Higher in 1993 than in 1992. *Geophy, Res. Lett.* **21**, 577 (1994).
6. Kerr, J.B. and Wardle, D.I.: Ozone and UV-B Monitoring Program in Canada in Private Communication (1994).
7. Donald, L.B., Daniel, P.H. and Thomas, V.O.: An animal model of solar aged skin : Histological, physical, acd visile changes in UV irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.,* **46**(3), 367-378 (1987).
8. Andrija, K., Wayne, W. and Albert, G. Jr.: Light-induced dermal toxicity : effects on the cellular and molecular level, Dermatotoxicology. 3rd edited by Francis, N.M. and Howard, I.M. pp. 377-412, Hemisphere Publishing Co. New York. (1987).
9. Baeck, K.H. and Kim, B.H.: Comparative Study on Red Blood Cell Hemolysis and Yeast Test by Photosensitizing Compound. *Kor. J. Environ.Toxicol.,* **5** Nos.1-2, 45-50 (1990).
10. Park, Y.A. and Kim, B.H.: Effects of Ascorbic Acid on the phototoxicity by phenothiazines. *Kor. J. Food Hygiene.,* **7**(4), 143 (1992).
11. Ljinggern, B. and Moller, H.: Phototoxic reaction to chlorpromazine as studied with the quantitative mouse tail technique. *Acta. Derma.,* **56**, 373-376 (1976).
12. Saucin, M.: Mechanism of photosensitization by phenothiazine derivatives. *Acta. Int. Physiol. Biochem.,* **87**, 1051-1052 (1979).
13. Guy, F.W., Kays, H.K. and Alvert, M.K.: Phototoxicity from benoxaprofen; *In vivo* and *in vitro* studies. *Photochem. Photobiol.,* **36**, 59-64 (1982).
14. Moore, D.E. and Tamat, S.R.: Photosensitization by drugs. *J. Pharm. Pharmacol.,* **32**, 172-177 (1989).
15. Lijunggern, B. and Moller, H.: Phenothiazine phototoxicity; An experimental study on chlorpromazine and its metabolites. *J. Invest. Dermatol.,* **68**, 313-317 (1977).
16. Marko, J., Vermeersch, G., Febvay-Garot, N. and Lablache-Combier, A.: Photo-CIDNP in nuclei acid bases and their nucleotides induced by chlorpromazine and analogs. *Photochem. Photobiol.,* **42**, 213-221 (1985).
17. Tomas, A.C., Gary, A.E. and Irene, E.K.: Photoaddition of chlorpromazine to guanosine-5-monophosphate. *Photochem. Photobiol.,* **43**, 607-613 (1986).
18. Kahn. G. and Fleischaker. B.: I. Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. *J. Inverst. Dermatol.,* **56**, 85-90 (1970).

19. Halliwell, B. and Gutteridge, J.: *M. C. Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 1 (1990).
20. Colin, F. and Garry, R.B.: Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines. *Environmental Health Perspectives*, **64**, 103-110 (1985).
21. Park. Y.A.: Effect of ascorbic acid on phototoxicity by phenothiazines, Master thesies, Chungnam National Univesity 36-38 (1992).