

Coenzyme Q₁₀ 유도체들의 항산화 및 세포독성 효과

최원식^{1*}, 남석우¹, 안은경¹, 어진용¹, 임상호²

Antioxidant and Cytotoxic Effects of Coenzyme Q₁₀ Derivatives

Won-Sik Choi^{1*}, Seok-Woo Nam¹, Eun-Kyung Ahn¹, Jin-Yong Eo¹
and Sang-Ho Lim²

요 약 Coenzyme Q₁₀과 그 유도체 coenzyme Q_n 6종을 합성하고, 이들 유도체에 대하여 상피세포(LLC-PK1 cell)를 이용한 항산화 효과와 NIH/3T3 세포를 이용한 세포독성 실험을 실시하였다. 그 결과, 합성한 coenzyme Q_n 유도체들이 coenzyme Q₁₀에 비해 우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 그 중 coenzyme Q_{3-C}가 모든 농도에서 107.7 ~ 135.9%로 가장 우수한 효과를 나타내었다. 또한, 모든 coenzyme Q_n 유도체들이 coenzyme Q₁₀과 유사한 세포독성을 나타내었다. Coenzyme Q_n의 n수에 따른 항산화 효과 및 세포독성 실험에서 isoprene unit의 수가 적은 유도체들에서 우수한 효과를 나타내었다.

Abstract Coenzyme Q₁₀ and six derivatives of coenzyme Q_n were synthesized and tested for their antioxidative effects occurred in proximal tubular epithelial cell (LLC-PK1 cell) and cytotoxicities using in NIH/3T3 cell. As the result, synthetic coenzyme Q_n derivatives showed a potent antioxidative effect compared to coenzyme Q₁₀. Among these synthetic compounds, coenzyme Q_{3-C} at ranged 0.04 to 0.4 mmol showed the 107.7 ~ 135.9% of cell viability in LLC-PK1 cell. In the test of NIH/3T3, all synthesized coenzyme Q_n derivatives showed the similar effect compared with coenzyme Q₁₀. A correlation between isoprene unit number of coenzyme Q_n derivatives and its biological effects, we suggest reduction of isoprene unit number of Q_n derivatives may be related to the increase of antioxidants effects and the reduction of cytotoxicities.

Key Words : Coenzyme Q_n, Antioxidative effects, Cytotoxicities

1. 서론

Coenzyme Q₁₀은 1957년 소의 심장에서 발견된 보조효소로 유비퀴논(ubiquinone) 또는 유비데카논(ubidecarnone)이라고 부르며, 인체의 모든 세포에서 발견되고 혈장에는 약 0.4-1 μmol/L 정도가 들어있다[1]. 심장, 간, 신장과 췌장에서 고농도로 발견되며, 인체 내의 에너지를 생산하는 미토콘드리아 내에서 발견된다[2]. 화학적 구조는 benzoquinone head group과 isoprenoid tail group으로 이루어져 있으며 isoprene unit에 의해 coenzyme Q_n으로 표시되며 n은 isoprene unit 수를 나타낸다. 이 중 생체 내에서 가장 많이 존재하는 것이 n=10이며, 탄소수가 50개인 coenzyme Q₁₀이다[3,4]. Coenzyme Q₁₀의 인체 내 작용을 살펴보면 호흡대사인 전자전달계에서 플라빈단백질과

시토크롬 C사이의 전자전달을 매개하고, 미토콘드리아의 에너지 생산에 관여하는 효소의 전자와 양성자를 운반하는 운반체로 작용하며, 직접적으로 에너지(ATP) 합성에도 관여한다[5,6]. 또한, 생체 내 에너지 생성과정에서 발생된 활성산소를 자유라디칼인 semiquinone radical을 형성하여 미토콘드리아를 보호한다[7-10]. 이러한 작용으로 활성산소에 의한 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산의 과산화반응과 체내의 과산화 지질의 축적을 방지함으로써 활성산소로 생겨나는 생체기능 저하 및 성인병을 예방한다[11-13]. 한편, coenzyme Q₁₀은 피부의 주름살 개선 및 미백 등의 효과가 입증되어 화장품으로도 널리 사용되고 있으며, 피부 내의 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈과 같은 색소들에 영향을 줌으로써 피부 탄력을 유지하는 콜라겐과 하이루론산 생성을 촉진시킨다[14].

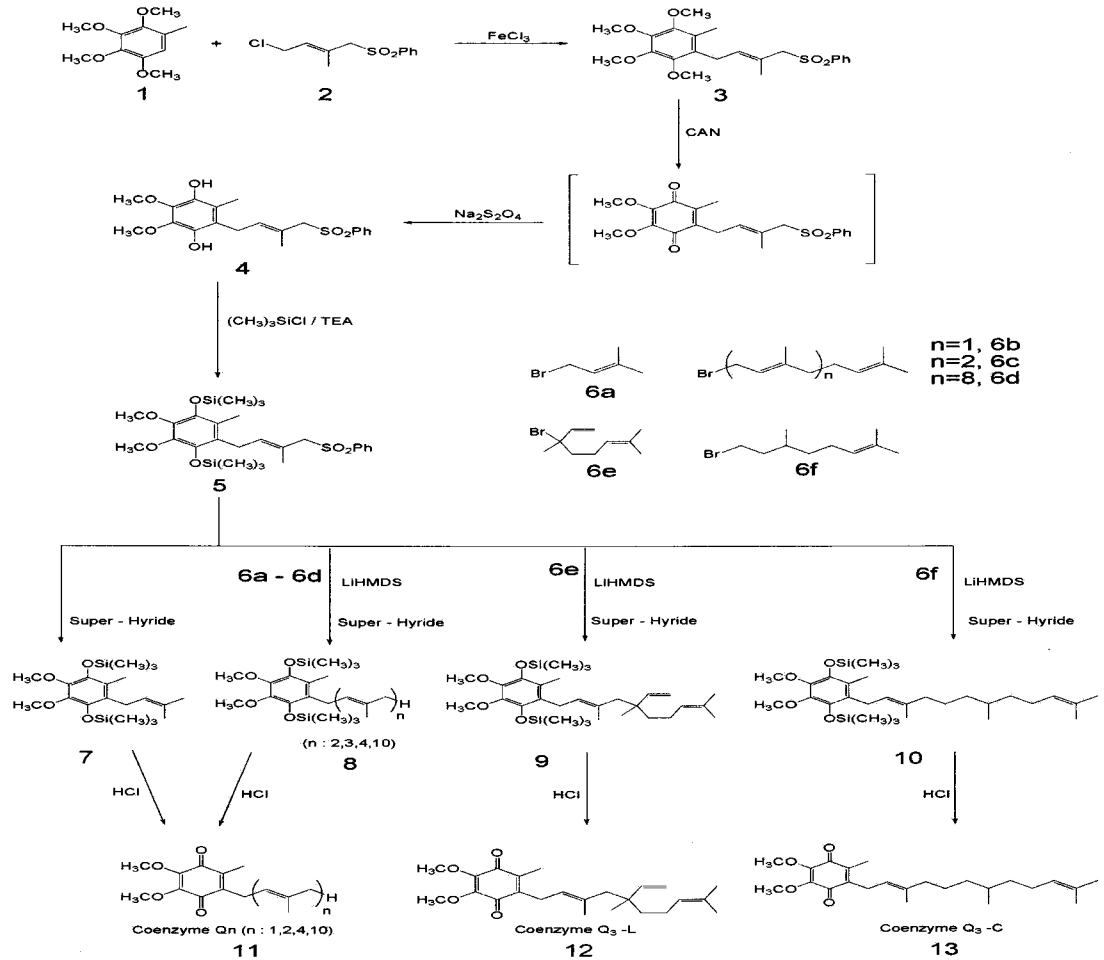
¹순천향대학교 자연과학대학 생명공학과

²남양유업(주) 중앙연구소

*교신저자: 최원식(wschoi@sch.ac.kr)

또한, 피부노화를 막아주고 피부세포의 독성물질을 분해하는 항산화작용이 비타민 E보다 매우 우수하여 활성산소 및 노폐물들의 생성을 억제한다[15,16]. 그러나, coenzyme Q_n 화합물들의 isoprene unit의 개수가 다른 유도체들에 대한 항산화 효과와 세포독성에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는

isoprene unit 수가 다른 coenzyme Q₁, Q₂, Q₃, Q₃-L, Q₃-C, Q₄와 Q₁₀을 scheme 1과 같이 합성하고[17], coenzyme Q_n 유도체들의 항산화력 측정[18]과 세포독성 검사(MTT)[19]를 실시하여 coenzyme Q_n의 n수에 따른 구조와 생리활성 관계를 알아보았다.



[Scheme 1] Synthesis of coenzyme Q_n derivatives

2. 재료 및 방법

2.1 시약

본 합성에 사용한 모든 시약은 Aldrich사의 제품을 이용하였으며 용매는 공업용 시약을 정제하여 사용하였다. 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는 Wako사의 제품을 사용하였다.

2.2 실험 기기

CO₂배양기는 Thermo Scientific사의 Forma series II water jaketed CO₂ incubator, 무균대는 대청사이언스사, 원심분리기는 Eppendorf사의 centrifuge 5810R, ELISA reader는 Oasis사의 UVM 340, 현미경은 Olympus사의 CKX41과 hemocytometer는 Marienfeld사의 제품을 사용하였다.

2.3 합성

Coenzyme Q_n 유도체들은 Scheme 1과 같이 합성하였다[17]. Coenzyme Q₁₀의 합성 방법은 다음과 같으며 coenzyme Q₁, coenzyme Q₂, coenzyme Q₃, coenzyme Q₃-L, coenzyme Q₃-C 및 coenzyme Q₄는 coenzyme Q₁₀과 같은 방법으로 제조하였다.

2.3.1 2,3,4,5-Tetramethoxy-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl) toluene(3)의 합성

50 ml 둥근바닥 플라스크에 염화메틸렌(10 ml)을 가하고 2,3,4,5-tetramethoxytoluene(1)(1.00 g, 4.71 mmol)과 4-chloro-2-methyl-1-benzenesulfonyl-2-butene(2)(0.80 g, 3.27 mmol)을 용해시키고 무수 염화철(III)(0.13 g, 0.80 mmol)을 상온에서 가한 후, 반응물을 12시간동안 환류시켰다. 반응액 온도를 25℃로 조절하고 초산(2.10 ml)을 가하고 20분간 교반 후 2 N 염산(4.00 ml)을 넣고 20분간 교반하였다. 유기층을 분리하고 증류수(10 ml)로 세척 후 무수 황산마그네슘으로 건조하고 감압 농축하였다. 농축물에 아세톤(5.70 ml)을 가하고 2시간 동안 -10℃에서 3시간 교반한 후 얻어지는 백색 결정의 목적물(1.32 g, 96%)을 얻었다. IR(KBr disk, cm⁻¹) 1558, 1359, 1356; ¹H NMR(CDCl₃, δ) : 1.8(s, 3H), 2.1(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.7(s, 12H), 4.0(s, 2H), 5.7(t, 1H), 7.7(s, 5H).

2.3.2 3,4-Dimethoxy-2,5-dihydroxy-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl)toluene(4)의 합성

아세톤(10 ml)에 2,3,4,5-tetramethoxy-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl)toluene(3)(1.00 g, 2.38 mmol)을 용해하고 0℃로 온도를 조절한 후 암모늄 이질산세륨(IV)(0.33 g, 0.6 mmol)을 가하였다. 1시간 동안 15-20℃에서 반응시킨 후 염화메틸렌(15 ml)과 증류수(15 ml)를 가하여 20분간 교반 후 층분리를 하였다. 분리된 유기층에 포화 차아황산나트륨 용액(15 ml)을 넣은 후 상온에서 1시간 동안 교반하고 포화 소금물(20 ml)을 가하여 유기층을 추출하였다. 유기층을 무수 황산 마그네슘으로 건조시킨 후 감압 농축시켜 목적물(0.90 g, 96%)을 얻었다. IR (KBr disk, cm⁻¹) : 1558, 1359, 1356, 1172, ¹H NMR(CDCl₃, δ) : 1.7(s, 3H), 2.2(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.7(s, 6H), 4.0(s, 2H), 5.1(t, 1H), 7.7(s, 5H) 9.0(s, 2H)

2.3.3 3,4-Dimethoxy-2,5-bis(trimethylsilyloxy)-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl)toluene(5)의 합성

50 ml 둥근바닥 플라스크에 3,4-dimethoxy-

2,5-dihydroxy-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl)toluene(4)(2.00 g, 5.10 mmol)과 염화메틸렌(20 ml)을 가하여 상온에서 완전히 용해시킨 후 트리메틸아민(4.3 ml)을 가하였다. 30℃ 이하에서 trimethylchlorosilane(4.10 ml, 32.30 mmol)을 30분 동안 가하고 1시간 교반하였다. 반응액에 13% 탄산수소나트륨 용액(10 ml)을 가하고 30분간 교반 후 유기층을 분리하였다. 유기층을 증류수(10 ml)로 세척 후 무수 황산 마그네슘으로 건조시키고 여과하여 감압 농축하였다. 농축물에 에탄올(3 ml)을 가하여 1시간 동안 온도를 -5℃로 유지하였다. 생성된 백색 결정물을 여과하고 진공 건조하여 목적물(2.60 g, 95%)을 얻었다. IR (KBr disk, cm⁻¹) : 1554, 1500, 1357, ¹H NMR(CDCl₃, δ) : 0.1-0.15(s, 18H), 1.8(s, 3H), 2.1(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.8-3.9(s, 6H), 4.0(s, 2H), 5.7(t, 1H), 7.7(s, 1H)

2.3.4 Solanesyl bromide(6)의 합성

100 ml 둥근바닥 플라스크에 질소 기류 하에서 solanesol(4.10 g, 6.50 mmol)을 가하고 hexan(20 ml)과 테트라히드로퓨란(3 ml)을 가하여 완전히 녹인 후 반응 온도를 -5℃로 조절하였다. 삼브롬화인(1.76 g, 6.50 mmol)에 테트라히드로퓨란(1.60 ml)을 혼합한 용액을 10분간 서서히 가한 후 피리딘 1~2방울 가하였다. 온도를 0℃로 조절하여 45분 동안 교반하였다. 반응용액 온도를 -10℃로 조절한 후 증류수(20 ml)와 초산에틸(15 ml)을 가하여 상온에서 30분간 교반시킨 후 유기층을 분리하고 10% NaHCO₃ 용액(2 ml)을 가하여 유기층을 세척하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 감압 농축하여 solanesyl bromide(3.40 g, 84%)를 얻었다. IR (KBr disk, cm⁻¹) : 1653, 1201, 571, ¹H NMR(CDCl₃, δ) : 1.5-1.6(d, 6H), 2.0-2.1(d, 24H), 2.1-2.3(m, 32H), 4.0(d, 2H), 5.0-5.1(t, 8H), 5.5(t, 1H)

2.3.5 3,4-Dimethoxy-2,5-bis(trimethylsilyloxy)-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl)toluene(7)의 합성

50 ml 둥근바닥 플라스크에 lithium triethyloro-hydride(Super hydride, 6.0 ml, 63.5 mmol)를 가하여 -5℃로 유지하고 3,4-dimethoxy-2,5-bis(trimethylsilyloxy)-6-(isoprenyl-4-benzenesulfonyl)toluene(5)(1.00 g, 2.38 mmol)이 용해된 테트라히드로퓨란(2.0 ml)을 10분 동안 가하였다. 이 반응액에 [1,2-bis(diphenylphosphino) ethane]dichloropalladium(II)(0.03 g, 0.05 mmol)를 가하고 온도를 40℃로 유지하면서 12시간 교반하였다. hexan(9 ml)과 소금물(6 ml)을

가하고 30분간 교반한 다음 유기층을 분리하고 진한 염산(0.1 ml)을 가하여 1시간 교반하였다. 유기층을 분리하여 증류수로 세척한 다음 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 농축하여 오일상인 목적물(1.13 g, 84%)을 얻었으며 이 화합물을 정제하지 않고 다음 반응에 사용하였다. IR (KBr disk, cm^{-1}): 3400, 1554, 1470, 1354, ^1H NMR(CDCl_3 , δ): 0.2(s, 18H), 1.6-1.7(t, 6H), 2.2(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.7-3.8(s, 6H) 5.7(t, 1H).

2.3.6 Coenzyme Q10의 합성

헥산(10 ml)과 무수 에탄올(20 ml) 혼합 용매에 실릴 화합물(1.00 g, 3.96 mmol)을 가하여 용해시키고 염화구리(II) 이수화물 (2.17 g, 12.70 mmol), 진한 염산(0.38 ml) 및 증류수(4 ml)를 순서대로 가하여 3시간 교반 후 유기층을 분리하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 감압 농축하였다. 농축액을 실리카겔 크로마토그래피법(초산에틸과 헥산 1:9)으로 정제하여 coenzyme Q₁₀(0.85 g, 85%)을 얻었다. 다른 coenzyme Q_n 화합물들도 위와 같은 방법으로 제조하였다.

2.4 세포배양

세포배양은 배양하고자하는 세포와 배지를 petri dish에 넣은 후 CO₂, 37°C 배양기에서 배양하고 현미경과 hemocytometer를 이용하여 세포배양 상태와 세포수를 측정하였다. 세포에 영양분을 공급하기 위해 Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium 89%, fetal bovine serum 10%, antibiotics 1%로 제조한 배지를 5% CO₂, 37°C 배양기에서 보관하였다. 배지 9 ml에 세포배양액 1 ml를 가하여 총 부피가 10 ml가 되도록 하여 5분간 원심분리($\times 1000$ rpm)한 뒤 상등액을 제거하고 침전물에 배지 1 ml를 가하여 현탁액을 제조하였다. 배지 9 ml가 들어있는 petri dish(ϕ -100)에 위에서 제조한 세포 현탁액 1 ml를 가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였다.

2.5 Hemocytometer를 이용한 세포수의 측정

배양한 세포수를 측정하기 위하여 배양한 세포를 phosphate buffer saline용액 2 ml로 2회 세척하고 trypsin-EDTA 1 ml와 배양액(5% fetal bovine serum) 4 ml를 가하여 뭉쳐있는 세포를 균일하게 부유시킨 후 현탁액 10 μl 를 취하여 hemocytometer의 V-모양의 홈에 가하였다. 현미경으로 관찰하여 각 모서리에 있는 사각형(1x1 mm) 내의 세포수를 측정하여 4로 나눈 값을 평균 세포수로 하였다. 측정된 세포수를 식(전체세포수 = 평균

세포수 $\times 10^4 \times$ 희석농도)에 대입하여 배양한 세포수를 구하였다. 실험에 필요한 세포수는 계산에 의해 구한 세포수를 희석하여 사용하였으며 실험하고자 하는 크기의 well plate에 희석한 세포와 Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium을 가하여 5% CO₂, 37°C의 배양기에서 24시간 배양 후 다음 생리활성 실험에 사용하였다[20].

2.6 항산화력 측정

항산화력 측정은 근위세뇨관 상피세포(LLC-PK1 cell)의 생존율을 측정하였다[18]. 근위세뇨관 상피세포(LLC-PK1 cell)를 5% CO₂, 37°C 하에서 24시간 배양 후 hemocytometer로 측정하여 1.5×10^6 cells/ml이 되도록 배양액의 세포농도를 조절하였다. 이를 96 well plate에 세포수가 well당 1.2×10^4 cells/ml이 되도록 옮겨준 후 5% CO₂, 37°C 하에서 2시간 동안 배양하였다. 시료는 화합물 Coenzyme Q₁, Q₂, Q₃, Q₃-L, Q₃-C, Q₄와 Q₁₀을 각각 DMSO로 용해시켜 0.4, 0.2, 0.1과 0.04 mmol 농도로 제조하였다. 96 well plate에 배양 중인 세포의 배양액을 버리고 위에서 각 농도별로 제조한 시료 100 μl 와 2,2'-azobis (2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH) 용액 10 μl 와 dulbecco's modified eagle's medium 90 μl 를 혼합한 후 24시간 동일 조건에서 배양하였다. 대조물질은 시료 100 μl 대신 같은 양의 DMSO용액을 가하여 동일 조건에서 배양하였다. 배양 후 thiazdyl blue tetrazolium bromide 1 mg을 dulbecco's modified eagle's medium 1 ml에 용해시킨 용액 50 μl 를 96 well plate에 각각 가해준 뒤 5% CO₂, 37°C 하에서 4시간 보관하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고 DMSO 100 μl 를 가하여 상온에서 5분 교반하면 보라색을 띠게 된다. 이 액을 가지고 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 대조물질과 각 시료들의 흡광도 값을 측정하였다.

2.7 세포 독성 검사(MTT 측정)

세포 독성 검사는 MTT 측정 방법[19]을 변형하여 측정하였다. 세포주(NIH/3T3)를 5% CO₂, 37°C 하에 24시간 배양 후 hemocytometer로 측정하여 1.2×10^6 cells/ml이 되도록 배양액의 세포농도를 조절하였다. 이를 96 well plate에 세포수가 well당 1.2×10^4 cells/ml이 되도록 옮겨준 후 5% CO₂, 37°C 하에서 24시간 동안 배양하였다. 시료는 화합물 coenzyme Q₁, Q₂, Q₃, Q₃-L, Q₃-C, Q₄와 Q₁₀에 DMSO를 가하여 40 mmol 시료를 제조하였고 이를 희석하여 4.0, 0.4와 0.04 mmol로 제조하였다. 위에서 배양한 96 well plate에 배양 중인 세포의 배양액을 버린 뒤

각각의 Coenzyme Q_n 시료 용액 100 μ l와 무수 에탄올 10 μ l와 dulbecco's modified eagle's me- dium 90 μ l를 혼합한 후 8시간 동일 조건에서 배양하였다. 대조물질은 시료 100 μ l 대신 같은 양의 DMSO용액을 가하여 동일 조건에서 배양하였다. 배양 후 thiazdyl blue tetrazolium bromide 5 mg을 dulbecco's modified eagle's medium 1 ml에 용해시킨 용액 10 μ l와 dulbecco's modified eagle's medium 90 μ l를 가해진 뒤 동일 조건에서 배양하였다. 이와 같이 배양한 배양액을 제거하고 DMSO 100 μ l를 가하여 상온에서 5분 교반하면 보라색 용액이 된다. 이

액을 가지고 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 대조 물질과 각 시료들의 흡광도 값을 측정하였다.

3. 결과

3.1 합성

합성된 coenzyme Q_n 화합물들은 IR 및 ¹H-NMR등에 의해 확인하였으며, 그 결과는 표 1에 요약하였다.

[표 1] 합성된 coenzyme Q_n 화합물들의 IR 및 ¹H-NMR 스펙트럼

Compounds	IR(KBr disk, cm ⁻¹)	NMR(CDCl ₃ , δ)
Coenzyme Q ₁	1660, 1645	1.6-1.7(t, 6H), 2.1(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.8-3.9(s, 6H), 4.9(t, 1H)
Coenzyme Q ₂	1660, 1647	1.6-1.7(d, 6H), 1.8(s, 3H), 2.0-2.1(d, 4H), 2.1(s, 3H), 3.2(d, 2H), 4.0-4.1(d, 6H), 5.0(t, 1H), 5.2(t, 2H)
Coenzyme Q ₃	1660, 1645	1.6-1.7(t, 6H), 1.8-1.9(s, 6H), 1.9(s, 3H), 2.0-2.1(m, 8H), 2.6(d, 2H), 3.5-3.6(d, 6H), 5.0(t, 1H), 5.2(t, 2H)
Coenzyme Q ₃ -L	1663, 1650	0.9(m, 2H), 1.4(s, 3H), 1.5(d, 2H), 1.8(s, 3H), 1.8-1.9(s, 6H), 2.0(m, 2H), 2.1(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.7-3.8(d, 6H), 4.9(t, 1H), 5.0(t, 1H), 4.9-5.1(t, 3H)
Coenzyme Q ₃ -C	1660, 1643	0.8-0.9(d, 3H), 1.2-1.3(s, 6H), 1.8(s, 3H), 1.8-1.9(s, 6H), 2.0(m, 1H), 2.0-2.1(m, 4H), 2.3(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.9-4.0(d, 6H), 4.9(t, 1H), 5.0(t, 1H)
Coenzyme Q ₄	1660, 1642	1.6-1.7(t, 6H), 1.7-1.8(s, 9H), 2.0-2.1(m, 12H), 2.3(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.7-3.8(d, 6H), 4.9(t, 1H), 5.2(t, 3H)
Coenzyme Q ₁₀	1660, 1642	1.6-1.7(t, 6H), 1.7-1.8(s, 27H), 2.0-2.1(m, 36H), 2.3(s, 3H), 3.2(d, 2H), 3.8-3.9(d, 6H), 4.9(t, 1H), 5.2(t, 3H)

3.2 항산화력 측정

활성산소가 세포 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화반응이 유발되어 체내에 과산화지질이 축적되는 것에 대한 coenzyme Q_n 유도체들의 항산화력 측정 실험을 실시하였다. 지질과산화 유발물질인 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH)는 생체 내에서 혈류를 타고 산소분자와 반응하여 탄소 라디칼을 형성하고 이어서 과산화 라디칼을 생성하여 생체막의 구조를 파괴하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 실험에서는 근위세뇨관 상피세포(LLC-PK1 cell)에 AAPH와 합성한 coenzyme Q_n 유도체들을 처리하여 세포파괴에 대한 세포 생존율 측정을 통해 coenzyme Q_n 유도체들의 항산화력 효과를 확인하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 coenzyme Q₁의 0.4, 0.2, 0.1과 0.04 mmol 농도에서 세포 생존율은 각각 115.3, 104.7, 93.7과 81.5%를 나타내었다. Coenzyme Q₂는 130.0, 126.1, 121.5와 103.1%를 나타

내었고, coenzyme Q₃는 132.2, 126.5, 120.1와 101.4%의 세포 생존율을 나타내었으며, coenzyme Q₃-L은 127.8, 122.3, 119.1와 101.6%를 나타내었다. Coenzyme Q₃-C는 135.9, 128.5, 126.8과 107.7%의 세포 생존율을 나타내었고, coenzyme Q₄는 130.5, 125.8, 120.3과 104.4%, coenzyme Q₁₀은 111.0, 102.3, 86.6과 73.3%를 나타내었다.

위와 같은 결과로 coenzyme Q₂, coenzyme Q₃, coenzyme Q₃-L, coenzyme Q₃-C와 coenzyme Q₄는 모든 농도에서 coenzyme Q₁₀ 보다 우수한 항산화 효과를 나타내었고, coenzyme Q₁은 0.4, 0.2 mmol 농도에서 coenzyme Q₁₀과 비슷한 과산화지질(RO· 또는 HO·)에 대한 항산화 효과를 나타내었다. 특히, coenzyme Q₃-C의 경우 모든 농도에서 coenzyme Q_n 유도체 중 가장 우수한 효과를 나타내었다. 또한, 결사슬의 isoprene unit이 불규칙적으로 배열되거나 isoprene unit의 형태가 직선구조의 형태가 아닐 때 우수한 항산화 효과를 확인할 수 있었다.

[표 2] Coenzyme Q_n의 항산화력

Conc. (mmol)	Cell viability(%)								
	Control	Q ₁	Q ₂	Q ₃	Q ₃ -L	Q ₃ -C	Q ₄	Q ₁₀	p-value
0.04	100	81.5±2.64	103.1±4.23	101.4±3.31	101.6±1.06	107.7±4.28	104.4±2.74	73.3±2.46	< 0.03
0.1	100	93.7±1.78	121.5±6.33	120.1±2.88	119.1±3.51	126.8±3.30	120.3±3.66	86.6±1.25	< 0.01
0.2	100	104.7±5.34	126.1±4.27	126.5±6.49	122.3±4.48	128.5±6.42	125.8±2.01	102.3±7.28	< 0.008
0.4	100	115.3±3.90	130.0±1.38	132.2±5.21	127.8±0.98	135.9±3.24	130.5±3.87	111.0±1.16	< 0.05

Unit: Mean±S.D., %

3.3 세포독성 검사

NIH/3T3 세포주에 대해 합성한 coenzyme Q_n 유도체의 세포독성검사 결과는 표 3에 나타내었다. 그 결과 시료의 농도가 0.04, 0.4, 4.0, 40 mmol 에서 coenzyme Q₁은 각각 133.4, 174.8, 239.1과 282.3%의 세포 생존율을 나타내었고, coenzyme Q₂는 111.0, 167.2, 231.5와 277.0%를 나타내었다. coenzyme Q₃는 104.4, 166.6, 225.6과 269.7%의 세포 생존율을 나타내었으며, coenzyme Q₃-L은 105.7, 166.2, 225.9와 271.0%를 나타내었다. Coenzyme Q₃-C는 106.3, 166.9, 226.8과 271.3%의 세포 생존율을 나타내었

고, coenzyme Q₄는 103.5, 164.0, 224.0과 263.4%, coenzyme Q₁₀은 100.9, 163.4, 220.8과 255.2%를 나타내었다. 위와 같은 결과로 합성한 coenzyme Q_n 유도체의 세포독성은 나타나지 않았고, coenzyme Q₁, coenzyme Q₂, coenzyme Q₃, coenzyme Q₃-L, coenzyme Q₃-C와 coenzyme Q₄는 모든 농도에서 coenzyme Q₁₀과 비슷하거나 우수한 세포 생존율을 나타내었다. 또한, Coenzyme Q_n의 isoprene unit의 수가 적을수록 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다.

[표 3] Coenzyme Q_n 유도체의 세포독성 검사

Conc. (mmol)	Cell viability(%)								
	Control	Q ₁	Q ₂	Q ₃	Q ₃ -L	Q ₃ -C	Q ₄	Q ₁₀	p-value
0.04	100	133.4±1.35	111.0±0.31	104.4±2.71	105.7±2.29	106.3±5.62	103.5±3.54	100.9±3.85	< 0.05
0.4	100	174.8±2.97	167.2±3.17	166.6±4.63	166.2±4.48	166.9±3.67	164.0±2.73	163.4±2.86	< 0.007
4.0	100	239.1±4.47	231.5±5.39	225.6±2.27	225.9±3.21	226.8±3.83	224.0±4.71	220.8±6.07	< 0.002
40	100	282.3±3.51	277.0±6.73	269.7±4.77	271.0±3.49	271.3±4.37	263.4±4.89	255.2±5.92	< 0.005

Unit: Mean±S.D., %

4. 결론

Coenzyme Q₁₀은 소의 심장에서 발견된 보조효소로 활성산소가 원인인 성인병을 예방하거나 고혈압, 동맥경화, 울혈성 심부전증, 협심증, 근육이영양증 등의 효과가 있어 치료 목적으로 사용되고 있으며, 주름살 개선, 미백효과와 자외선 차단 등의 기능성 화장품으로 널리 사용되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 coenzyme Q₁₀과 isoprene unit의 개수가 다른 n=1-4와 10인 여러 coenzyme Q_n 유도체들을 합성하였다. 합성한 coenzyme Q_n 유도체들을 구조별로 나열하면 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinone (coenzyme Q₀), 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-isoprenyl-1,4-benzoquinone(coenzyme Q₁), 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-geranyl-1,4-benzoquinone(coenzyme Q₂), 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-farnesyl-1,4-benzoquinone(coen-

zyme Q₃), 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(isoprenyl-4-linoloyl)-1,4-benzo-quinone(coenzyme Q₃-L), 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(isoprenyl-4-citronellyl)-1,4-benzo-quinone(coenzyme Q₃-C), 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone(co-enzyme Q₄)와 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-deca-prenyl-1,4-benzoquinone(coenzyme Q₁₀)과 같다.

또한, coenzyme Q_n을 제조하기 위해 현재까지 이 분야의 제조에 알려져 있지 않은 중간체를 사용하였다. 즉, 합성 중간체로 hydroquinone head group의 -OH기를 보호하는데 실란화합물을 사용하여 실릴옥시 화합물로 제조해 사용하였고, 그 결과 제조공정의 단축, 수율 증대 및 고순도로 목적물을 제조할 수 있었다. 합성한 coenzyme Q_n 유도체들의 생리활성 검증은 항산화력 측정, 세포독성 검사를 실시하여 coenzyme Q_n의 n수에 따른 구조와 생리활성 관계를 알아보았다. 그 결과 항산화력 측정에서는

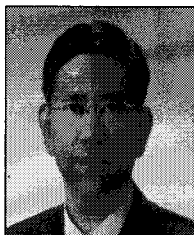
coenzyme Q₁₀과 비교하여 coenzyme Q₂, coenzyme Q₃, coenzyme Q₃-L, coenzyme Q₃-C와 coenzyme Q₄는 모든 농도에서 우수한 항산화 효과를 나타내어 coenzyme Q_n의 isoprene unit이 불규칙적으로 배열되거나, isoprene unit의 형태가 직선구조의 형태가 아닐 때 우수한 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 세포독성 검사에서는 coenzyme Q₁₀과 비교하여 coenzyme Q₁, coenzyme Q₂, coenzyme Q₃, coenzyme Q₃-L, coenzyme Q₃-C, coenzyme Q₄와 coenzyme Q₁₀는 모든 농도에서 매우 우수하거나 비슷한 세포 생존율을 나타내었으며, 이 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다. 또한, coenzyme Q_n의 isoprene unit의 n수가 적을수록 세포독성 효과가 더 우수하였음을 확인하였다.

참고문헌

- [1] Crans, F. L.; Hatefi, Y.; Lester, R. L.; Widmer, C. "Isolation of a quinone from beef heart mitochondria", *Biochem. Biophys. Acta*, 25, pp. 220-221, 1957.
- [2] Catherine, F. C. "New advances in coenzyme Q biosynthesis", *Protoplasma*, 213, pp. 134-147, 2000.
- [3] Wolf, D. E.; Hoffman, C. H.; Trenner, N. R.; Arison, B. H.; Shunk, C. H.; Linn, B. O.; McPherson, J. F.; Folkers, K. "Structure studies on the coenzyme Q group", *J. Am. Chem. Soc.*, 80, pp. 4752-4758, 1958.
- [4] Meganathan, A. "Biosynthesis of the isoprenoid quinones, menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone(coenzyme Q)", In *Escherichia coli and Salmonella*. Am. Soc. Micro, pp. 642-656, 1996.
- [5] Szarkowska, L. "The restoration of DPNH oxidase activity by coenzyme Q(ubiquinone)", *Arch. Biochem. Biophys.*, 113(3), pp. 519-525, 1966.
- [6] Kaikkonen, J.; Nyssonen, K.; Tuomainen, T. P. "Determinants of plasma Coenzyme Q₁₀ in humans", *FEB S. Lett.*, 443(2), pp. 163-165, 1999.
- [7] Britta, S.; Robert, K. P. "Microbial ubiquinones; multiple roles in respiration gene regulation and oxidative stress management", *SGM*, 145, pp. 1817-1830, 1999.
- [8] Ernster, L.; Dallner, G. "Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function", *Biochem. Biophys. Acta*, 1271, pp. 195-204, 1995.
- [9] Crane, F. L.; Navas, P. "The diversity of coenzyme Q function", *Molec. Aspects Med.*, 18, pp. 81-86, 1997.
- [10] James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. "Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q", *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, pp. 47-56, 2004.
- [11] Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. "Metabolism and function of coenzyme Q", *Biochim. Biophys. Acta*, 1660, pp. 171-199, 2004.
- [12] Hundal, T.; Forsmark, P.; Ernster, L.; Andersson, B. "Antioxidant activity of reduced plastoquinone in thylacoid membranes during strong illumination", *EBC C. Short Report*, 7, pp. 6-8, 1992.
- [13] Hoppe, U.; Bergemann, J.; Diembeck, W.; Ennen, J.; Gohla, S.; Jarris, I.; Jacob, J.; Jielholz, J.; Mei, W.; Pollet, D.; Schachtschabel, D.; Sauermann, G.; Schreiner, V.; Stab, F.; Steckel, F. "Coenzyme Q₁₀, cutaneous antioxidant and energizer", *Biofactors*, 9(2-4), pp. 371-378, 1999.
- [14] Podda, M.; Traber, M. G.; Weber, C.; Liang jun, Y.; Paker, L. "UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin", *Free Rad. Biol. And Med.*, 24, pp. 55-65, 1998.
- [15] Frederick M. R.; Ruth, A. S.; John B. W.; "Effects of coenzyme Q₁₀ treatment on antioxidant pathway in normal and streptozotocin induced diabetic rats", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 15, pp. 41-46, 2001.
- [16] Wright, H.; Laureta, P.; Richard, R. W.; James M. M.; "Uptake, recycling, and antioxidant actions of α -Lipoic acid in endothelial cells", *Free Rad. Biol. Med.*, 33, pp. 83-93.
- [17] 최원식, 어진용, 남석우, 김재훈, 이영행. "Coenzyme Qn 유도체들의 합성", *대한화학회지*, 제 51권 6호, pp. 585-590, 2007.
- [18] Yokozawa T, Cho E. J.; Hara Y.; Kitani K. "Antioxidative activity of green tea treated with radical inhibitor 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride", *J. Agric. Food Chem.*, 48, pp. 5068-5073, 2000.
- [19] T. Mosmann. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay:", *J. Immunol. Meth.*, 65, pp. 55-63, 1983.
- [20] Gordon, P. R.; Mansur, C. P.; Gilchrist, B. A. "Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factor", *J. Invest. Dermatol.* 92, pp. 565, 1998.

최 원 식(Won-Sik Choi)

[정회원]



- 1974년 2월 : 고려대학교 화학과 (이학사)
- 1977년 2월 : 고려대학교 화학과 (이학석사)
- 1985년 2월 : 고려대학교 화학과 (이학박사)
- 1982년 3월~1989년 2월 : 강릉대학교 화학과 교수
- 1989년 3월~현재 : 순천향대학교 생명공학과 교수

<관심분야>

유기화학, 유기합성, 천연물화학

어 진 용(Jin-Yong Eo)

[준회원]



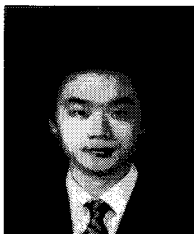
- 2004년 2월 : 순천향대학교 유전 공학과(이학사)
- 2006년 2월 : 순천향대학교 유전 공학과(이학석사)

<관심분야>

유기화학, 천연물화학, 유기합성

남 석 우(Soek-WooSik Choi)

[정회원]



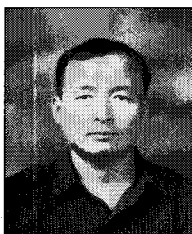
- 2007년 2월 : 순천향대학교 유전 공학전공(이학사)
- 2009년 2월 : 순천향대학교 생명 공학과(이학석사)
- 2009년 3월~현재 : 순천향대학교 생명공학과(박사과정)

<관심분야>

유기화학, 유기합성, 천연물화학

임 상 호(Sang-Ho Lim)

[정회원]



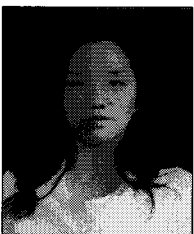
- 1990년 2월 : 충남대학교 농화학 과(이학사)
- 1995년 2월 : 충남대학교 농화학 과(이학석사)
- 2006년 3월~현재 : 충남대학교 농화학과(박사과정)
- ~현재 : 남양유업(주) 선임연구원

<관심분야>

식품공학, 천연물화학

안 은 경(Eun-Kyung Ahn)

[준회원]



- 2008년 2월 : 순천향대학교 유전 공학전공(이학사)
- 2008년 3월 ~ 현재: 순천향대학교 생명공학과(석사과정)

<관심분야>

유기화학, 천연물화학, 유기합성