

Bilirubin의 전압전류법적 파라미터에 미치는 압력의 영향

裴俊雄[†] · 李興洛 · 金敬浩 · 朴泰明

경북대학교 자연과학대학 화학과

(1990. 1. 11 접수)

Effect of High Pressure on Voltammetric Parameters of Bilirubin

Zun-Ung Bae[†], Heung-Lark Lee, Kyung-Ho Kim, and Tae-Myung Park

Department of Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

(Received January 11, 1990)

요 약. 미소 백금전극을 작업전극으로 사용하여 0.1 M TEAP-DMSO 용액 중에서 Bilirubin(BR)의 산화반응의 전압전류법적 파라미터에 미치는 압력의 영향을 조사하였다. 1기압에서 1,800기압까지 압력을 증가함에 따라 산화파의 봉우리 전위는 양전위쪽으로 이동하였다. 또 압력의 증가에 따라 봉우리 전류는 계속적으로 감소하였다. BR의 산화전류는 확산 지배적인 전류임을 알 수 있었다. 압력증가에 따라서 산화반응의 가역성은 거의 영향을 받지 않았다. 또한 실험 압력범위내(1~1,800기압)에서 산화파의 봉우리 전류와 Bilirubin의 농도 사이에는 좋은 직선성이 성립하였다.

ABSTRACT. The pressure effect of voltammetric parameters for the oxidation of Bilirubin in 0.1 M TEAP-DMSO solution at micro Pt electrode has been investigated. With increasing the pressure from 1 to 1,800 bars, the peak potential of oxidation wave shifted to the more positive potential. The peak current-becomes considerably smaller with increasing the pressure. The oxidation currents of Bilirubin was found to be diffusion controlled over all pressure ranges. The reversibility of oxidation step did not change with increasing pressure. The linear relationships were observed over all pressure ranges (1-1,800 bars).

서 론

Bilirubin(BR)은 주황색의 담즙색소로서 주로 간, 골수 및 비장의 reticuloendothelial system에서 hemoglobin의 분해에 의해서 생기며 serum albumin과 결합하여 혈류를 통해 간으로 이동되어 diglucuronide와 conjugation되어 쓸개로 이동 된 다음 체외로 배설된다. 그러나 이러한 conjugation system에 이상이 생길때, 특히 hemoglobin의 분해가 왕성한 신생아의 경우 serum albumin과 BR의 결합능력이 포화되면 free BR이나 colloidal BR이 존재하여 신생아 황달을 일으키거나, 심한 경우 뇌의 lipophilic tissue에 들어가 뇌질환을 일으키기도 한다.¹⁻³ 이런 BR의 특성 때문에 많은 임상학자들이 분광광도법

으로 BR을 정량 해오고 있다^{4,5}. 또한 BR이 체내에서 생성 및 분해되는 과정이 산화, 환원반응 임으로 BR의 전기화학적 연구도 많이 보고되었다⁶⁻⁸. 그러나 이러한 연구는 모두 상압하에서 이루어졌으며 고압하에서 수행된 연구는 거의 없다. 전압전류법에 고압을 도입하면 감극제와 용액의 압력에 따른 물리적, 화학적 변화를 조사할 수 있다. 이러한 연구를 통하여 용액반응의 압력 의존성을 연구할 수 있다. 본 연구실에서는 몇 가지의 단순 금속이온^{9,10}과 금속지시약으로 널리 쓰이는 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol(PAN)과 4-(2-pyridylazo)-resorcinol(par)¹¹ 및 금속 착이온¹²의 전극반응에 대한 압력의 영향을 고압하에서 플라로그래피로 조사한 바 있다. 본 논

문에서는 미소 백금전극을 작업전극으로써 DMSO 용매 중에서 BR의 산화반응의 전압전류법적 파라미터인 봉우리전위, 봉우리전류, 전류유형, 전극반응의 가역성 등을 1기압에서 1,800 기압까지의 압력 범위에서 조사하였다.

실 험

측정장치. 고압 전압전류법에서 전압전류곡선을 측정하는 장치는 고압발생기, 압력측정기, 항온조, 전해용기 및 electroanalyzer로 구성되어 있다. 이들 각각의 구조와 재질은 이미 전보¹⁰에 발표한 내용과 같다. 한편 본 실험에 사용한 작업전극으로는 약 1 mm되는 미소 백금선을 썼고, 보조전극으로는 나선형의 백금선($\phi 0.7$ mm)을 썼으며, 기준전극으로는 KCl의 농도를 1N로 한 표준 칼로멜 전극을 썼다. 이상과 같은 3전극을 사용하여 용액저항에 의한 Ohmic IR 강하를 자동보상하였다. 한편 전압전류의 측정기기는 PAR model 173 Potentiostat/Galvanostat, PAR model 174 Polarographic Analyzer, PAR model Universal Programmer로 구성된 Electrochemical system 이다. 산화반응에 관여하는 전자수는 PAR model 380 controlled potential coulometry system을 사용하여 일정전위 전기량법으로 구하였다.

시 약. 본 실험에서 용매로 쓴 DMSO의 정제 및 보관 방법은 Coetzee의 방법¹³에 따랐으며, 지지전해질로는 tertaethylammonium perchlorate (TEAP)를 Kolthoff 등의 방법¹⁴으로 합성 및 정제하여 썼다. BR은 Sigma제를 DMSO에 녹여 460 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 몰흡광계수가 60,000~61,000 범위내임을 확인하여 썼으며, 1.0×10^{-3} M의 저장용액을 만들어 냉장실에 보관하고 실험시 들여서 썼다. 그 외의 모든 시약은 특급품을 정제하지 않고 그대로 썼다.

전압전류곡선의 기록. DMSO 용매 중에서 0.1 M TEAP를 지지전해질로 썼으며, BR의 농도는 2.0×10^{-4} M에서 1.0×10^{-3} M 범위내에서 변화시켰다. 가전압 범위는 $+0.2 \sim +0.7$ volts vs. N.C.E.이며, 다음과 같은 순서로 전압전류곡선을 측정 하였다. 곧 전해셀에 용액을 채운 다음, 정제한 고순도 질소를 30분 동안 통과시켜 용존산소를 제거한 후, teflon

tube의 마개를 막고 고압용기에 연결한다. 항온조에서 1시간 동안 정치한 후, 전압전류곡선을 측정, 기록하여 1기압의 값으로 하였다. 또한 측정전 지지전해액만을 채운 후 가전압 범위에서 전압을 여러번 왕복 주사하여 전극을 충분히 활성화시켜 측정시 재현성에 유의하였다. 압력을 300기압 단위로 올리면서 전압전류곡선을 측정하였다. 산화과정에 관여하는 전자수의 측정은 백금망을 작업전극으로 하여 일정한 농도(2.0×10^{-4} M)의 BR 용액 일정량(10 ml)을 정전위 전기량 측정용 전해조에 넣고 질소를 통과 시키면서 BR의 산화반응의 한계전류를 나타내는 전위인 $+0.55$ volt vs. N.C.E.에서 전해하여 소요된 전기량을 구한 다음, 동일한 조건에서 구한 지지전해액만을 전해할 때 소비된 전기량을 보정하여 Faraday식에 적용하여 전자수를 구하였다.

결과 및 고찰

BR의 전압전류곡선. DMSO 용액 중에서 8.0×10^{-5} M BR의 전압전류곡선을 1기압에서 1,800기압까지의 압력범위에서 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. G.O는 galvanic current가 0인 점을 나타낸다. 또 산화전류의 유형을 조사하기 위해 BR의 농도와 전압주사속도를 변화시키면서 측정한 전압전류곡선을

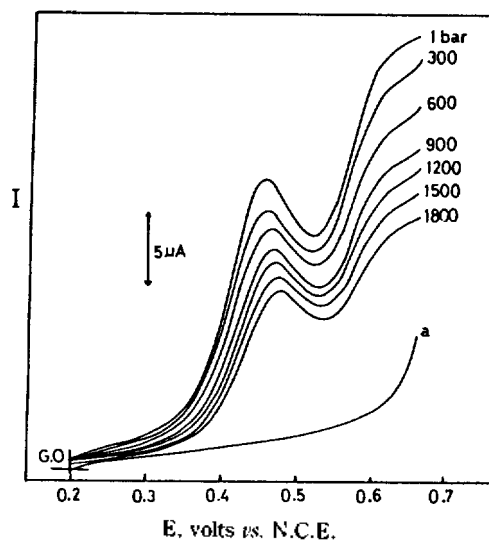


Fig. 1. Voltammograms for the oxidation of 8.0×10^{-4} M Bilirubin under various pressure at 25 °C a: supporting electrolyte (0.1M TEAP) only.

Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

붕우리 전위. 압력을 바꾸어 가면서 측정한 $8.0 \times 10^{-4} M$ BR의 붕우리 전위를 Table 1에 나타내었다. Table 1로부터 알 수 있는 바와 같이 압력이 증가함에 따라 붕우리 전위값은 양전위쪽으로 이동하고 있다. 일반적으로 용액의 조성이 일정하면 전극전위는 일정하다. 그러나 압력의 변화로 반응의 가역성이 바뀌거나 용매의 유전상수가 변하면 전극전위가 변하게 된다¹⁵. 2,000기압 까지의 압력으로 원자의 크기나 분자의 원자간격을 변화시킬 수는 없으나 이온의 용존상태나 용매화 부피는 바뀔 것이므로 전극반응에 있어서도 압력증가에 따른 전극전위의 변화가 생길 것으로 예상된다. 평형론적 입장에서 압력변화에 따른 전극전위의 변화, ΔE 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$nF(\partial E/\partial P)_{T,\mu} = -\Delta V = -(\Sigma V_p - \Sigma V_r)$$

여기에서 μ 는 이온강도, ΔV 는 산화, 환원반응을 일으키는 화학종의 partial molar volum의 차이이다. 본 연구의 결과, 압력이 증가함에 따라 붕우리 전

위가 양전위쪽으로 이동하고 있다. 이것은 반응물 질인 BR이 압력증가에 따라 용매화 에너지가 더욱 커지고 용매화된 이온이 더욱 안정하게됨을 뜻한다. 25°C에서 BR의 경우, 압력증가에 따른 붕우리 전위의 변화는 $11 \mu V/\text{bar}$ 정도 양전위쪽으로 이동하였다. 이 값은 본 연구실에서 조사한 유기 착화체의 압력에 따른 반과전위의 변화값,¹¹ 곧 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol($36 \mu V/\text{bar}$), 4-(2-pyridylazo)-resorcinol($60 \mu V/\text{bar}$) 그리고 금속착이온의 변화값,¹² $\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}$ 은 $63 \mu V/\text{bar}$, $\text{Cd}(\text{en})_2^{2+}$ 은 $29 \mu V/\text{bar}$, $\text{Zn}(\text{en})_2^{2+}$ 은 $37 \mu V/\text{bar}$ 보다 작은 값이다. G.H. Hills¹⁶ 등의 수용액 중에서 Cu(II) 이온의 단위압력 변화에 따른 전극전위의 변화값인 $1 \sim 10 \mu V/\text{bar}$ 과는 거의 유사하다.

붕우리 전류. Table 2에는 농도와 압력을 변화시키면서 측정한 BR의 산화과의 붕우리 전류값 나타내었다. Table 2에서 알 수 있듯이 압력이 증가함에 따라 붕우리 전류가 계속적으로 감소하는 경향을 나타내고 있다. 압력변화에 따른 전류값의 변

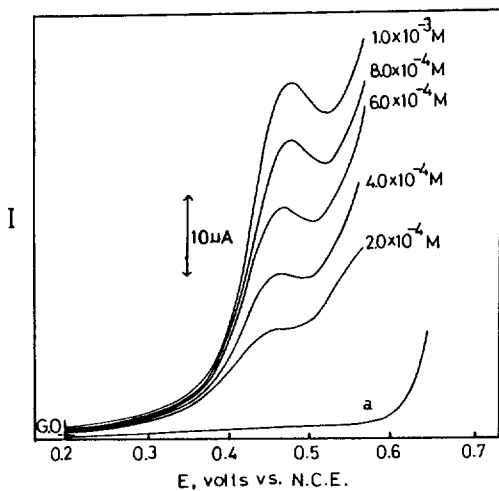


Fig. 2. Voltammograms of various concentrations of Bilirubin in 0.1M TEAP-DMSO solution at 25°C and 1 bar.

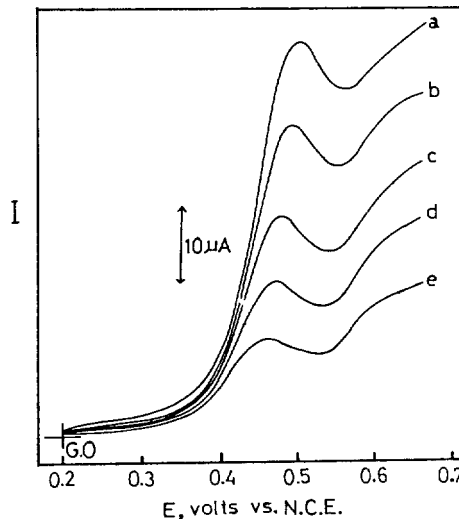


Fig. 3. Voltammograms of $1.0 \times 10^{-3} M$ Bilirubin in 0.1M TEAP-DMSO solution with various scan rate at 25°C a: 300, b: 200, c: 100, d:50, e: 20 (mV/sec)

Table 1. Peak potentials of $8.0 \times 10^{-4} M$ Bilirubin in 0.1M TEAP-DMSO solution by varying pressure at 25°C, voltage scan rate: 50 mV/sec.

p(bar)	1	300	600	900	1200	1500	1800
E_p (mV)	458	460	465	468	470	475	480

Table 2. Peak current of various BR concentration in 0.1M TEAP-DMSO solution by varying pressure at 25°C, voltage scan rate: 50 mV/sec.

C($\times 10^{-4}$ M)	P(bar)						
	1	300	600	900	1200	1500	1800
2.0	6.4	5.5	4.9	4.2	3.9	3.2	2.0
4.0	9.3	8.6	8.2	7.4	7.0	6.3	3.6
8.0	17.6	15.5	14.7	13.0	12.0	11.0	10.4
10.0	20.0	18.0	17.4	16.3	15.2	14.0	11.2

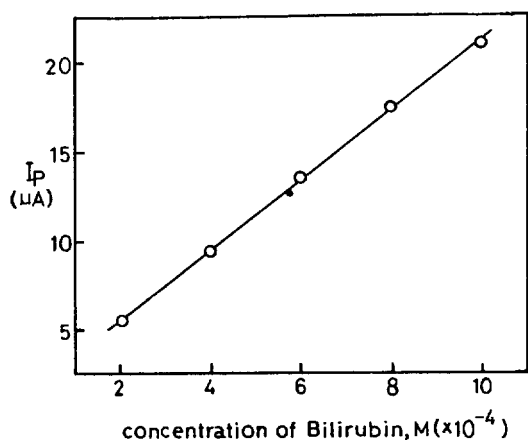


Fig. 4. Relationship between peak current(I_p) and concentration of Bilirubin scan rate: 50 mV/sec.

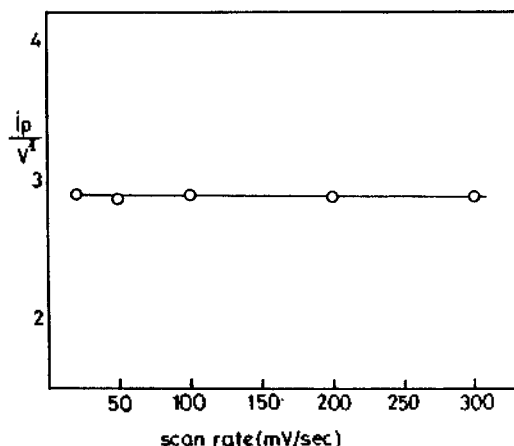


Fig. 5. Peak current function, $I_p/V^{1/2}$ with various scan rates for 1.0×10^{-3} M Bilirubin in 0.1M TEAP-DMSO solution at 25°C and 1 bar.

화는 주로 밀도, 점성도, 유전상수, 전기전도도 등과 같은 시료용액의 물성 변화에 기인한다. 압력변화에 따른 용액의 압축률의 변화는 매우 작으므로(5×10^{-4} /atm) 보통 무시한다⁶. 그러나 액체의 점성도는 압력이 증가함에 따라 증가하며 전류값의 감소원인이 된다. 한편 유전상수는 압력이 높아질수록 증가하여 전류값의 증가요인이 된다. 또 압력증가에 따라 이온의 확산계수가 증가하여 이온의 전기전도도가 증가하게 되므로 전류값은 증가하게 된다. 이상의 내용들과 Table 2의 결과를 종합해보면, 압력증가에 따른 시료용액의 점성도의 증가가 전류값을 감소시키는 주된 요인으로 작용한 것으로 추정된다. 그러나 용액물성의 압력에 따른 변화값을 정확히 알 수 없으므로 위의 여러 인자들이 전류값에 미치는 정확한 기여도는 알 수 없다.

산화전류의 유형. 미소 백금전극 하에서 BR의 산화과정에서 발생하는 전류의 유형을 조사하였다. 곧 BR의 농도와 전위 주사속도를 변화시키면서 선

형주사 전압전류곡선을 그리고, 여기에서 봉우리 전류(I_p)를 구하여 농도 및 전위주사속도(V)의 평방근 사이의 관계를 Fig. 4와 5에 나타내었다. Fig. 4에서 원점을 지나지 않는 것은 전류전류가 보정되지 않았기 때문이다. 이들 그림에서 알 수 있는 바와 같이 산화파의 봉우리 전류는 농도와 $v^{1/2}$ 에 비례하였다. Nicholson¹⁹에 의하면 반응이 가역적이든 비가역적이든 확산지배적일 때 봉우리 전류는 반응물질의 농도와 전위주사속도(V)의 평방근에 비례한다고 하였다. 따라서 본 실험결과로부터 BR의 산화전류는 확산지배적인 전류임을 알 수 있다.

산화파의 가역성. 선형주사 전압전류법으로 산화파의 가역성을 다음과 같이 조사하였다. 곧 1기압에서 1,800기압까지의 압력범위에서 8.0×10^{-4} M BR의 선형주사 전압전류곡선인 Fig. 1에서부터 E_p 와 $E_{p,2}$ 를 구하여 아래의 식²⁰으로부터 전이계수(α) 값을 계산하여 Table 3에 나타내었다.

Table 3. The transfer coefficients (α) of the oxidation process of Bilirubin at various pressures.

P(bar)	1	300	600	900	1200	1500	1800
α	0.42	0.39	0.38	0.41	0.41	0.42	0.40

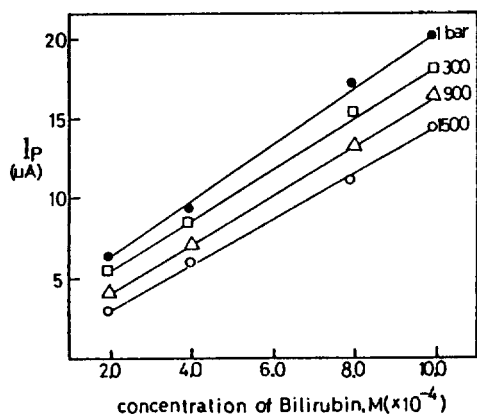


Fig. 6. Calibration curves for the voltammetric determination of Bilirubin under various pressures.

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{1.857RT}{\alpha n_a F} = \frac{47.7}{\alpha n_a} \text{ mV, at } 25^\circ\text{C}$$

Table 3에 의하면 전이계수(α)값은 압력변화에 거의 영향을 받지 않음을 알 수 있다. 한편 일정전위 전극분해법으로 구한 산화파에 관여하는 전자수는 2개였다.

고압하에서의 정량성. 일정한 압력하에서 BR의 농도를 변화시키면서 산화파의 봉우리 전류값을 측정하여 얻은 검정선을 Fig. 6에 나타내었다. 검정선(Fig. 6)이 원점을 지나지 않는 것은 잔류전류가 보정되지 않았기 때문이다. Fig. 6에서 알 수 있는 바와 같이 1,800기압까지의 고압하에서도 선형주사 전압전류법으로 실험농도범위인 $2.0 \times 10^{-4}M$ 에서 $1.0 \times 10^{-3}M$ 까지의 BR을 정량할 수 있음을 알 수 있다.

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학육성연구비와 관학재단의 지원으로 수행되었으므로 이에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. K. S. Lee and L. M. Gartner, *Pediatr. Res.*, **10**, 782 (1976).
2. C. C. Kuenzle, N. G. Gumarasamy, and K. J. Wilson, *J. Biochem.*, **251**, 801 (1976).
3. T. R. Koch and O. O. Akingbe, *Clin. Chem.*, **27**, 1295 (1981).
4. B. T. Doumas, B. W. Ferry, E. A. Sasse, and J. V. Straumfjord, Jr., *Clin. Chem.*, **19**, 984 (1973).
5. Ronald H. Laessing, Thomas H. Schwartz, and Thomas A. Paskey, *Clin. Chem.*, **18**, 48 (1972).
6. C. H. Slifstein and M. Ariel, *Electroanal. Chem.*, **447** (1973).
7. J. D. Van Norman, *Anal. Chem.*, **45**, 173 (1973).
8. J. D. Van Norman and R. Szentirmay, *Anal. Chem.*, **46**, 1456 (1974).
9. H. L. Lee, Z. U. Bae, and J. H. Yun, *J. Kor. Chem.*, **28**, 315 (1984).
10. Z. U. Bae, H. L. Lee, and H. S. Bak, *ibid.*, **33**, 399 (1989).
11. H. L. Lee, Z. U. Bae, and J. H. Yun, *ibid.*, **29**, 197 (1985).
12. H. L. Lee, Z. U. Bae, and J. H. Yun, *ibid.*, **31**, 444 (1987).
13. J. E. Coetzee, *Anal. Chem.*, **34**, 1139 (1962).
14. I. M. Kolthoff and J. E. Coetzee, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 870 (1957).
15. P. Delahay, "New Instrumental Methods in Electrochemistry", Chap. 4, Interscience, New York, 1954.
16. G. J. Hills and P. J. Oviden in P. Delahay, and C. W. Tobias (Eds.), "Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering: vol. 4, Interscience, New York, 1966.
17. M. Sato and T. Yamada, *Rev. Polarogr. (Kyoto)* **23**, 113 (1977).
18. G. J. Hills in R. S. Bradley (Eds.), "Advances in High Pressure Research", vol. 2, Academic Press, London-New York, 225-255, (1969).
19. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964).
20. A. J. Brad and L. R. Faulkner, "Electrochemical Methods", p.223, John Wiley, and Sons, 1980.