

Bilirubin의 전기화학적 환원거동

裴俊雄[†] · 李興洛 · 鄭美植 · 朴泰明

경북대학교 자연과학대학 화학과

(1991. 1. 11 접수)

Electrochemical Reduction Behavior of Bilirubin

Zun Ung Bae[†], Heung Lark Lee, Mi Sik Jung, and Tae Myung Park

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

(Received January 11, 1991)

요 약. pH 7.8의 인산 완충용액에서 Bilirubin의 전기화학적 환원거동을 직류 폴라로그래피, 시차 펄스 폴라로그래피, 순환 전압전류법 및 정전위 전기량법으로 조사하였다. 직류 폴라로그래피에서 반파전위가 -1.32 V와 -1.51 V vs. Ag/AgCl인 2개의 환원파를 확인하였고, 각 환원파의 전류유형은 제 1환원파는 확산지배적인 전류였으며 제 2환원파는 반응성전류가 약간 포함된 확산전류였다. 그리고 각 환원단계는 모두 비가역적이었다. 또한 Bilirubin의 농도가 3.4×10^{-4} M 이하일 때 나타나는 전방파가 흡착에 의한 전류임을 확인하였다. 환원반응에 관여하는 전자수는 제 1단계에서는 2개였으며, 제 2단계에서는 1개였다.

ABSTRACT. The electrochemical reduction behavior of Bilirubin (BR) in phosphate buffer (pH 7.8) solution was studied by DC polarography, differential pulse polarography, cyclic voltammetry and controlled potential coulometry. In DC polarogram, two reduction waves of BR were found. The half wave potentials of two reduction waves were -1.32 and -1.51 volts vs. Ag/AgCl respectively. The current type of 1st reduction wave was diffusion-controlled and the 2nd reduction wave was diffusion current containing a little kinetic current. The electrochemical reduction process of BR at each reduction step was all irreversible. The prewave appeared at lower concentration than 3.4×10^{-4} M, this prewave was identified as adsorption prewave. And the number of electron transferred in reduction steps, n_{app} was two for the 1st reduction step and one for the 2nd reduction step.

서 론

Bilirubin(이하 BR로 줄임)은 주로 간, 골수 및 비장의 reticuloendothelial cell에서 hemoglobin의 효소분해에 의해서 생기는 생성물이며 주황색의 tetrapyrrole 구조를 하고 있는 bile pigment의 일종이다¹. 이렇게 생성된 BR은 serum albumin과 결합하여 혈류를 따라 간으로 이동한다. 간에서는 diglucuronate와 결합하여 물에 잘 녹을 수 있는 glucuronic acid ester를 형성하여 Bilirubin diglucuronide가 된다. 이것은 다시 쓸개로 이동된 다음 urine으로 배출된다². 그러나 BR과 serum albumin과의 결합능력이 포화되어 독성이 강한 free

BR이나 colloidal BR이 존재하게 되면 황달을 일으키거나 심한 경우 뇌의 lipophilic tissue에 들어가 치명적인 뇌질환을 일으키기도 한다³. 이러한 임상적인 중요성으로 BR의 연구는 많이 보고되고 있다. With⁴, Bodchier⁵와 Hargreaves 등⁶은 BR에 관한 연구결과를 총설로 보고하고 있다. 또한 BR의 생성 및 분해과정이 산화·환원반응을 거침으로 BR의 전기화학적 연구도 여러 연구자들에 의하여 보도되었다⁷⁻¹⁰. 그러나 이와 같은 연구는 BR의 환원파를 확인하는 정도에 그쳤으며, 환원전류의 유형이나 환원반응의 가역성 등에 대한 연구는 수행되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 pH 7.8의 인산

완충용액 중에서 BR의 환원과정을 좀 더 상세하게 조사하였다. 즉 각 환원파의 전류유형과 환원반응의 가역성 여부를 조사하고 BR의 농도가 $3.4 \times 10^{-4} M$ 보다 묽을 때 나타나는 흡착파를 여러 가지 방법으로 확인하였으며 또한 각 환원단계에 관여하는 전자수도 구하였다.

실 험

시약. BR은 다음과 같은 방법으로 정제하였다. BR(Pfanstiechl laboratories Inc.)을 $CHCl_3$ (hot)에 녹이고 실온으로 냉각시켜 $0.1 M NaHCO_3$ 로 3번 씻은 후 Na_2SO_4 로 건조시키고 여과한다. Rotary evaporator로 $CHCl_3$ 을 1/3정도 날려 보내고 메탄올에서 재결정하여 여과한 후, dry gun을 사용하여 건조한다. 재결정한 BR의 순도는 $CHCl_3$ 에 녹여 최대 흡수파장인 $452 nm$ 에서 흡광도를 측정하여 몰흡광계수가 $57,000 \sim 60,000$ 범위 내임을 확인하여 사용하였다. 완충용액 조제에는 Junsei제 특급시약인 KH_2PO_4 와 NaOH를 정제하지 않고 그대로 썼다.

장치. 실험에서 사용한 폴라로그래피는 PAR model 174 Polarographic Analyzer를 사용하였다. 각 환원단계에 관여하는 전자수는 PAR model 380 controlled potential coulometry system을 사용하여 구하였다. 측정은 3전극 방식을 이용하여 용액저항에 의한 Ohmic IR 강하를 자동 보상하였으며, 보조전극으로는 백금선을, 기준전극으로는 Ag/AgCl 전극을 사용하였으며, 흡광도 측정에는 Shimadzu UV-260 double-beam spectrophotometer를 사용하였으며, pH 측정에는 Fisher Accumet Model 525 Digital pH/ion meter를 사용하였다. Data 처리에는 Apple II microcomputer를 이용하였다.

폴라로그래피의 측정. $0.02 M NaOH$ 용액에 녹인 BR의 저장용액에 인산 완충용액을 가하여 pH를 7.8로 맞추고 폴라로그래피를 측정하기전 20분 동안 정제한 고순도 질소를 통과시킨 후 측정할 때에도 질소기체를 용액표면으로 통과시켜 산소가 녹아드는 것을 막았으며, 용기는 aluminium foil로 싸서 BR의 광에 의한 분해를 막았고 항온조를 사용하여 25 ± 0.2 °C의 일정온도에서 측정하였다. 환원반응에 관여하는 전자수의 측정은 3차 증류한 고순도의 수온을 작

업전극으로 사용하였다. 일정한 농도($7.0 \times 10^{-5} M$)의 BR용액 일정량(10 ml)을 정전위 전기량측정 전해용기에 넣고, 각 환원파의 plateau potential인 $-1.35, -1.60 V vs. Ag/AgCl$ 에서 전해하여 소요된 전기량을 구하여 동일한 조건에서 지지전해액만의 용액을 전해할 때 소비된 전기량을 보정하여 Faraday식에 적용하여 전극반응에 관여하는 전자수를 구하였다.

결과 및 고찰

BR의 폴라로그래피. pH 7.8의 인산 완충용액 중에서 적하수은전극을 써서 $0.0 \sim -1.8 V vs. Ag/AgCl$ 의 전압범위에서 $4.5 \times 10^{-4} M$ 의 BR의 직류폴라로그래피와 시차펄스 폴라로그래피를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 그림에서의 G.O는 galvanic current가 0인 점을 나타낸다. 이 그림에서 알 수 있는 바와 같이 BR은 반파전위가 각각 $-1.32, -1.51 V vs. Ag/AgCl$ 인 2개의 환원파를 나타내었다. 또 각 환원파에 대한 환원전류의 유형과 가역성을 조사하기 위하여 달린 수은전극에서 전위 주사속도를 변화시키면서 측정된 순환 전압전류곡선을 Fig. 2에 나타내었다.

환원전류의 유형. BR이 환원될 때 나타나는 전류의 유형을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을

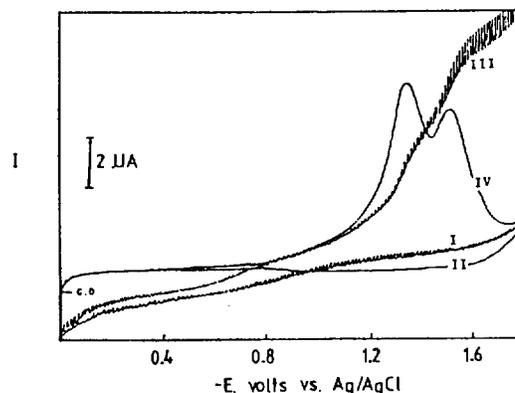


Fig. 1. DC (III) and differential pulse polarogram (IV) of $4.5 \times 10^{-4} M$ Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at $25^\circ C$. curve (I), (II) are residual current of phosphate buffer solution only.

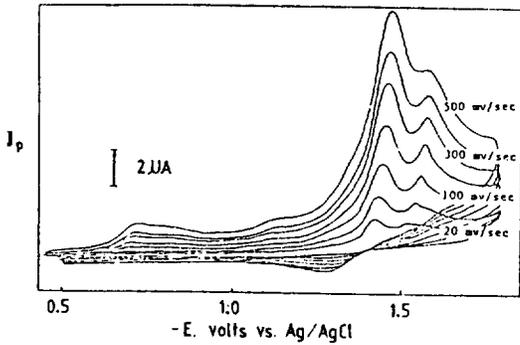


Fig. 2. Cyclic voltammograms of $4.5 \times 10^{-5} M$ Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution with various scan rates at 25°C.

Table 1. DC polarographic $i_d/h^{1/2}$ values of Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at 25°C

h (cm)	$i_d/h^{1/2}$ ($\mu A/cm^{1/2}$)	
	1 st · wave	2 nd · wave
50.0	0.20	0.26
55.0	0.21	0.28
60.0	0.23	0.31
65.0	0.23	0.31
70.0	0.24	0.37
75.0	0.24	0.24

Temperature coefficient

1st · wave: 1.3% (15~25°C), 2nd · wave: 2.7% (15~25°C)

하였다. 곧 수은주의 높이(h)를 변화시키면서 환원파의 환원전류를 구하여 이 환원전류값이 수은주의 높이의 평방근에 비례하는지 그 여부를 조사하여 Table 1에 나타내었다. Table 1을 보면 수은주의 높이가 55.0~75.0 cm 범위에서 제 1환원파는 $h^{1/2}$ 에 비례하므로 확산전류임을 알 수 있다. 그러나 제 2 환원파는 $h^{1/2}$ 에 비례하지 않으므로 확산지배적이라 할 수 없다. 또 환원전류의 온도계수($di_d/i_d T \times 100\%$)로부터 환원전류의 유형을 조사하였던 바, 15~25°C의 온도범위에서 제 1환원파는 온도계수가 1.3%로 확산지배적이었으나 제 2환원파는 2.7%로 반응성전류가 약간 포함된 것으로 생각된다¹¹. 한편 순환 전압전류법으로 전류의 유형을 조사할 수도 있다¹². 순환 전압전류그램에서 환원전류가 확산지배적일 때 봉우리전류(i_p)는 반응물질의 농도와 전위주사속도(V)의 평방근에 비례한다. BR의 농도변

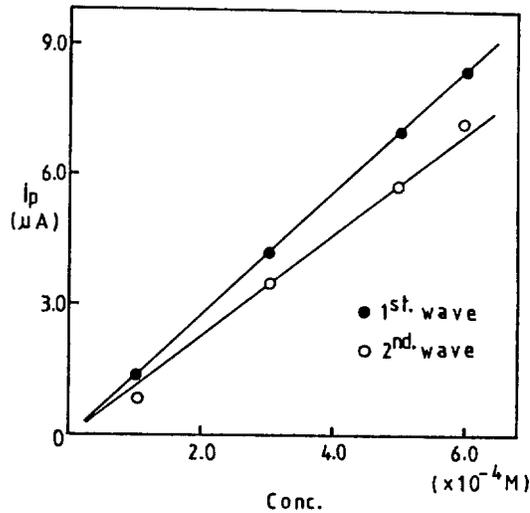


Fig. 3. Relationship between peak current (i_p) and concentration of Bilirubin, scan rate: 200 mV/sec.

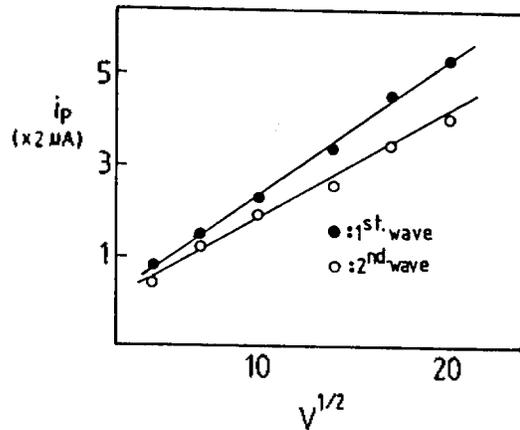


Fig. 4. Relationship between current (i_p) and $V^{1/2}$ for $4.5 \times 10^{-4} M$ Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at 25°C.

화와 전위주사속도 변화에 따른 봉우리전류의 변화를 Fig. 3과 4에 나타내었다. Fig. 3과 4에서 알 수 있는 바와 같이 제 1환원파는 BR의 농도와 $V^{1/2}$ 에 비례하며 제 2환원파는 BR의 농도증가에 따른 비례관계에서는 약간 벗어나나 $V^{1/2}$ 에는 비례하였다. 이상의 실험결과들로부터 pH 7.8의 인산 완충용액 중에서 BR의 환원전류는 제 1환원파에서는 확산지배적이며 제 2환원파는 약간의 반응성 전류가 포함된 확산전류인 것으로 생각된다.

일정전위 전기분해. 각 환원단계에 관여하는 전

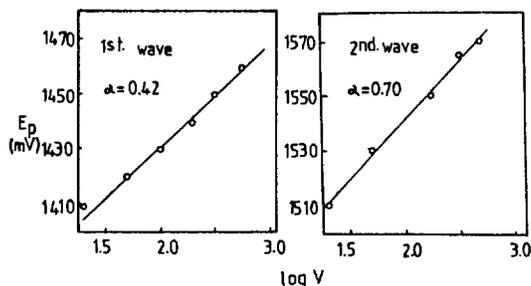


Fig. 5. The plots of cathodic peak potential of the each reduction step (E_p) with $\log V$ for $4.5 \times 10^{-4} M$ Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at $25^\circ C$.

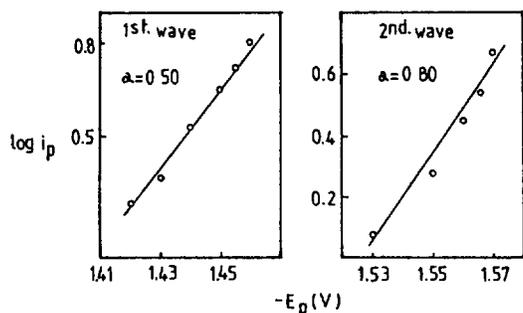


Fig. 6. The plots of peak current ($\log i_p$) with cathodic peak potential (E_p) of each reduction step for $4.5 \times 10^{-4} M$ Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at $25^\circ C$.

자수를 구하기 위하여 $7.0 \times 10^{-5} M$ 의 BR용액 10 ml를 전해용기에 넣고 질소를 통과시키면서 각 환원과의 한계전류를 나타내는 전압범위인 -1.35 와 $-1.60 V$ vs. Ag/AgCl에서 전기분해 하였다. 일정전위 전기분해시 작업전극은 Hg-pool을 사용하였으며, 기준전극은 Ag/AgCl이며 보조전극은 백금전극을 사용하였다. 용액을 완전히 전기분해 시키는데 필요한 전기량(Q)을 측정하여 이 값을 Faraday식에 적용하여 전극반응에 관여하는 전자수를 구하였다. 그 결과 BR의 환원반응에 관여하는 전자수는 1단계에서는 2개이며 2단계에서는 1개라는 것을 알 수 있었다.

환원파의 가역성. 순환 전압전류법에서 전위주사속도(V)를 변화시키면서 봉우리전위(E_p)와 봉우리전류(i_p)를 측정하여 E_p 와 $\log V$ 사이의 관계와 $\log i_p$ 와 E_p 의 관계를 도시하면 직선이 얻어진다(식 1, 2). 이 직선의 기울기값으로부터 전이계수(α)를 구

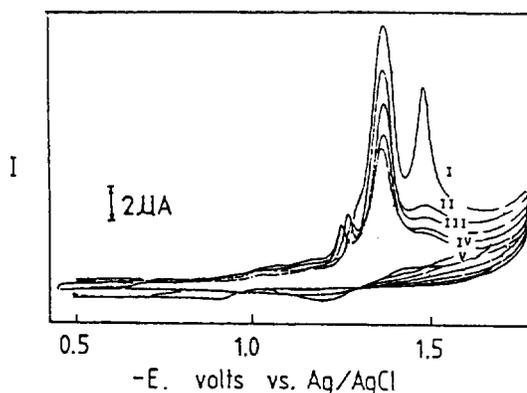


Fig. 7. Cyclic voltammograms of various concentration for Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at $25^\circ C$, scan rate: 200 mV/sec. (I) $6.5 \times 10^{-4} M$ (II) $3.4 \times 10^{-4} M$ (III) $1.5 \times 10^{-4} M$ (IV) $1.2 \times 10^{-4} M$ (V) $5.0 \times 10^{-5} M$.

Table 2. Cyclic voltammetric data for $1.5 \times 10^{-4} M$ Bilirubin in phosphate buffer (pH 7.8) solution at $25^\circ C$

Scan rate (mV/sec)	i_p (μA)	i_p/cv
20	0.25	0.012
50	0.65	0.013
100	1.25	0.012
200	2.15	0.011
500	3.40	0.011

c: concentration of BR, v: scan rate (mV/sec).

할 수 있고, 이 값으로부터 반응의 가역성을 설명할 수 있다¹¹.

$$E_p = E^{o'} - \frac{RT}{\alpha n_p F} \left\{ 0.78 + \ln \left(\frac{D_n^{1/2}}{k} \right) + \ln \left(\frac{\alpha n_p F v}{RT} \right)^{1/2} \right\} \quad (1)$$

$$i_p = 0.227 n F A C_o^* K_o \exp \left\{ - \left(\frac{\alpha n_p F}{RT} \right) (E_p - E^{o'}) \right\} \quad (2)$$

Fig. 5와 6에는 전위주사속도를 20 mV/sec에서 500 mV/sec로 변화시키면서 순환 전압전류곡선을 측정하여 위의 식들로부터 계산한 전이계수값(α)을 나타내었다. 이 두 방법으로 구한 전이계수값(α)은 서로 비슷하며, 실험결과로부터 두 환원반응의 가역성이 모두 좋지 않음을 알 수 있다.

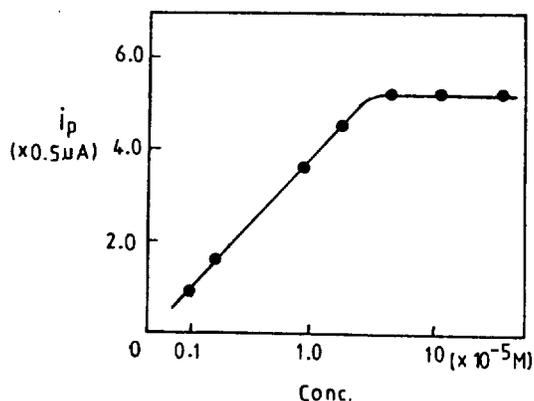


Fig. 8. Relationship between peak current (i_p) of pre-wave and Bilirubin concentration.

흡착파의 확인. pH 7.8의 인산 완충용액에서 BR의 농도를 $6.5 \times 10^{-4} M$ 에서 $5.0 \times 10^{-5} M$ 까지 변화시키면서 순환 전압전류그램을 측정하여 Fig. 7에 나타내었는데, BR의 농도가 $3.4 \times 10^{-4} M$ 이하에서는 $-1.26 V$ vs. Ag/AgCl의 전위에서 전방파가 나타났다. 이 전방파의 전류유형을 조사하기 위하여 전위주사속도를 20 mV/sec에서 500 mV/sec까지 변화시키면서 봉우리전류(i_p)를 측정하여 i_p/cv 의 값을 Table 2에 나타내었다. 또 BR의 농도변화에 따른 봉우리전류(i_p)를 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 이상의 결과들을 보면, 전방파는 E_p 에 대해 봉우리모양이 대칭적이었으며 i_p/cv 는 일정한 값을 나타내었다. 그리고 $3.2 \times 10^{-7} M$ 에서 $2.0 \times 10^{-5} M$ 의 농도범위에서는 농도변화에 대해 i_p 가 선형관계를 이루다가 그 이상의 농도범위에서는 농도가 증가하여도 i_p 는 일정한 값을 나타내었다. 따라서 BR의 농도가 $3.4 \times 10^{-4} M$ 이하일 때 나타나는 전방파는 흡착에 의한 전류임을 확인할 수 있었다¹².

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원으로 수행된 바, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. J. D. Van Norman and R. Szentirmay, *Anal. Chem.*, **46**, 1456(1974).
2. R. Broderson, "Bilirubin", K. P. M. Heirwegh and Brown, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL (1982).
3. C. C. Kuenzle, N. G. Gumarasamy, and K. J. Wilson, *J. Biochem.*, **251**, 801(1976).
4. T. K. With, "Bile pigment; Chemical, Biological and Clinical Aspects", Academic Press, New York, N. Y. (1968).
5. I. A. D. Bouchier and B. H. Billing, "Bilirubin Metabolism", Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburg (1967).
6. T. Hargreaves, "The Liver and Bile Metabolism", Appletoncentury crofts, New York, N. Y. (1968).
7. B. Tvarooha, *Cas. Lek. Cesk.*, **100**, 27(1961).
8. J. D. Van Norman and M. M. Hmans, *Anal. Chem.*, **46**, 926(1974).
9. T. R. Koch and O. O. Akingbe, *Clin. Chem.*, **27**, 1295(1981).
10. J. Saar and C. Yarnitzky, *Isr. J. Chem.*, **23**, 249 (1983).
11. P. Zuman, "Organic Polarographic Analysis", Pergamon Press, London. 1964.
12. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706(1964).
13. A. M. Bond, "Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry", Marcel Dekker, New York, 1980.