

N,N-Dimethylformamide 용액 중에서 Zn(II)-Bilirubin 착물의 전기화학적 거동

裴俊雄* · 李興洛 · 朴泰明† · 徐戊龍‡

경북대학교 자연과학대학 환경공업과

†순천공업전문대학 환경공업과

‡경상대학교 자연과학대학 화학과

(1993. 2. 12 접수)

Electrochemical Behavior of Zn(II)-Bilirubin Complex in N,N-Dimethylformamide

Zun-Ung Bae*, Heung-Lark Lee, Tae-Myung Park†, and Moo-Lyong Seo‡

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

†Department of Environmental Engineering, Sooncheon Junior Technical College,
Sooncheon 540-260, Korea

‡Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-70, Korea

(Received February 12, 1993)

요 약. DMF 용액 중에서 zinc(II) 이온과 copper(II) 이온의 bilirubin과의 착물형성 여부를 조사하고 Zn(II)-bilirubin(이하 Zn(II)-BR로 줄임) 착물의 전기화학적 성질을 여러가지 전기화학적인 방법으로 조사하였다. Zn(II)는 DMF 용액 중에서 bilirubin과 착물을 형성하였으나, Cu(II)는 bilirubin과 착물을 형성하지 않고 오히려 bilirubin의 산화를 촉진시켰다. Zn-BR 착물은 3단계의 환원과정을 거치며, 제 1파와 제 2파의 환원전류는 반응성 전류가 약간 포함된 환산전류이었으며, 제 3파의 환원전류는 확산지배적인 전류이었다.

ABSTRACT. The complexation of bilirubin with zinc (II) and copper (II) ions was studied spectrophotometrically. In the zinc (II)-bilirubin (Zn-BR) system, complex is formed, but the copper (II) ion oxidizes bilirubin to biliverdin and then to the further oxidation products. The electrochemical reduction behavior of Zn-BR complex has been investigated with DC polarography and cyclic voltammetry. The three polarographic waves were obtained for the reduction of Zn-BR complex in DMF solution. The reduction current of the third wave was diffusion current, but that of the first and the second waves contained a little kinetic current.

서 론

Bilirubin(BR)은 간, 골수 및 비장에서 hemoglobin의 분해에 의하여 생기는 물질로서, 이 물질이 혈액 중에 일정량 이상 존재할 경우 황달이나 뇌 질환을 일으키게 된다¹. 따라서 많은 임상학자들이 BR에 관한 연구들을 해오고 있다. BR의 연구를 대별하면 BR 자체의 구조 및 화학적 성질에 관한 연구²⁻⁵, BR과 albumin의 결합에 관한 연구^{6,7}, BR의 광화학적 연구^{8,9}, BR의 전기화학적 연구¹⁰⁻¹³, 그리고

BR과 금속의 착물에 관한 연구¹⁴⁻¹⁶ 등이 있다.

본인 등은 BR과 BR의 대사과정에 관여하는 여러가지 물질의 전기화학적 성질을 조사하고, 이를 근거로 한 BR의 전압전류법적 정량에 관한 연구를 수행하여 그 일부를 보고한 바 있다¹⁷⁻¹⁹.

간(肝)에서 Zn(II)이 관여하는 효소반응에 BR이 존재하면 효소의 기능이 억제된다고 알려져 있다²⁰. BR과 금속이온과의 착물형성에 대한 분광학적 연구는 많이 수행되어져 왔다^{14,15,21,22}. Velapoldi 등²³은

수용액 중에서 여러가지 전이금속 이온과 BR과의 착물형성의 안정성을 분광학적으로 연구한 결과, 단지 Sm(III)만이 안정한 사각평면 착물을 형성한다고 하였다. Norman 등²⁴은 분광학적인 방법과 백금전극을 사용한 전기화학적 방법으로 조사한 결과, DMF 용액 중에서 tetramethylguanidine(TMG)과 같은 강한 염기성 물질이 존재할 때 zinc(II) 이온과 BR이 착물을 형성한다고 하였다. 또한 Savage 등¹⁶은 DMSO 용액 중에서 Zn는 BR과 2:1의 착물을 형성한다고 하였다. 이처럼 이들 착물에 대한 연구는 대부분 분광학적인 방법으로 착물형성 여부에 대한 연구에 그치고 있으며 전기화학적인 연구는 체계적으로 수행되고 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 DMF 용액 중에서 zinc(II) 이온과 copper(II) 이온의 BR과의 착물형성과 이들 착물의 전기화학적인 성질을 조사하였다.

실 험

시 약. 본 실험에 사용한 용매인 DMF(N,N-dimethylformamide)의 정제는 Thomas의 방법²⁵에 따랐다. 지지 전해질로는 tetraethylammonium perchlorate(TEAP)를 썼으며, TEAP의 합성 및 정제는 Kolthoff 등의 방법²⁶에 따랐다. Bilirubin은 Sigma 제를 몰흡광계수를 측정하여 $60,000 \pm 600$ 범위내임을 확인하여 사용하였다²⁷. 금속염으로는 Kanto제 특급 zinc acetate와 copper acetate를 사용하였다. Tetramethylguanidine(TMG)는 Aldrich제 특급시약을 썼다.

장 치. 본 실험에서 흡광도 측정에는 Shimadzu, Double-beam Spectrophotometer UV-260을 썼으며, 직류폴라로그래프와 순환전압전류그래프의 측정에는 PAR Model 174A Polarographic Analyzer, Model 175 Universal Programmer 및 Model 173 Potentiostat/Galvanostat을 썼다. 측정에 사용한 전극 구성은 3전극 방식을 써서 용액저항에 의한 Ohmic IR drop을 자동보상하였다. 작업전극은 수은전극(PAR Model 303 SMDE), 기준전극은 Ag/Ag⁺(0.1 M AgNO₃ in DMF) 전극을, 보조전극으로는 백금선을 썼다. 전해액의 온도를 조절하기 위하여 Neslab RTE-210 항온조를 썼다.

용액 중에 녹아 있는 산소를 제거하기 위하여

정제한 고순도 질소를 용액 중으로 불어 넣었다. 질소의 정제는 고순도의 시판 질소(99.9%)를 ammonium metavanadate와 zinc amalgam의 염산용액으로 된 환원용기, pyrogallol 염기성 용액, 진한 황산용액, 실리카겔, 오산화인, 실리카겔 층의 순서로 통과시켜, 질소속에 남아 있을 산소와 수분을 제거하였다. 이렇게 정제한 질소를 DMF 용매층의 트랩을 통과시켜 질소기류가 미리 시료 용매로 포화되게 하여 시료 용액속으로 유입되게 하였다.

결과 및 고찰

Zn(II)-BR과 Cu(II)-BR 착물의 UV-Vis 스펙트럼.

BR은 TMG와 같은 proton binding substance가 존재하는 용액조건하에서 여러가지 금속이온과 착물을 형성하는 것으로 알려져 있다²⁸. 따라서 BR이 zinc(II) 및 copper(II) 이온과 착물을 형성하는지를 조사하기 위하여 TMG가 8배 포함된 $5.0 \times 10^{-4} M$ BR의 DMF 용액에 $1.0 \times 10^{-3} M$ 의 zinc(II) 및 copper(II) 이온을 첨가하여 측정된 UV-Vis 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다. 이 그림에서 알 수 있는 바와 같이 zinc(II) 이온이 BR 용액에 첨가된 경우 452 nm의 BR 자체의 흡수봉우리는 사라지고 520 nm에서 Zn(II)-BR 착물형성에 의한 흡수봉우리가 나타났다. 이 결과는 Norman²⁴의 실험결과와 일치한

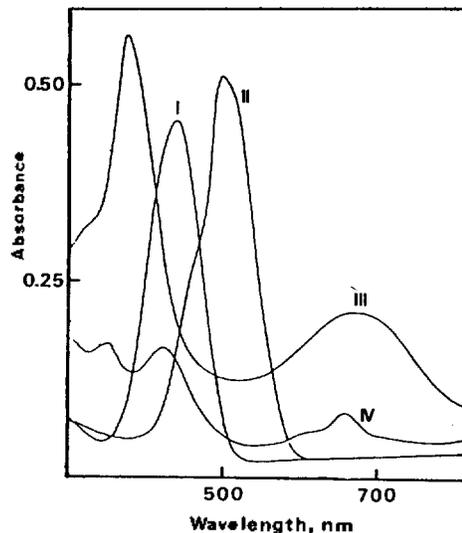


Fig. 1. UV-Vis spectra of bilirubin (I), Zn-BR (II), biliverdin (III) and Cu-BR (IV).

다. 그러나 BR 용액에 copper(II) 이온이 첨가될 경우에는 452 nm의 BR의 흡수봉우리는 사라지나 500 nm 부근에서 나타나는 BR-금속착물의 특징적인 흡수봉우리는 나타나지 않고, 650 nm와 360 nm 및 430 nm에서 새로운 흡수봉우리가 나타났다. 한편 Norman 등^{29,30}은 BR의 산화된 형태인 biliverdin의 흡수봉우리는 650 nm에서 나타나며, biliverdine이 더욱 산화된 purpurin의 흡수봉우리는 425 nm와 358 nm에서 나타난다고 보고한 바 있다.

따라서 BR 용액에 Cu(II) 이온을 첨가할 때 생성되는 새로운 흡수봉우리가 BR의 산화생성물인 biliverdine과 purpurin의 흡수봉우리이므로 copper(II) 이온은 BR과 착물을 형성하지는 않고 BR의 산화를 촉진시키는 것으로 생각된다.

Zn-BR 착물의 직류폴라로그래프와 순환전압전류그래프. $7.0 \times 10^{-2} M$ TEAP가 지지 전해질로 포함된

DMF 용액 중에서 $7.0 \times 10^{-4} M$ BR의 직류폴라로그래프와 순환전압전류그래프를 $-0.9 \sim -2.3$ volt vs. Ag/Ag⁺의 가전압 범위에서 측정하여 Fig. 2와 3에 나타내었다.

그리고 같은 용매, 같은 가전압 범위에서 $1.0 \times 10^{-3} M$ Zn(II) 용액과 $5.0 \times 10^{-4} M$ BR이 포함된 Zn(II)-BR 착물(지지제로는 0.1 M TEAP 용액)의 직류폴라로그래프와 순환전압전류그래프는 Fig. 4와 5에 나타내었다. 여기서 G.O.는 galvanic current가 0인 점을 나타낸다. 이들 그림에서 알 수 있는 것은 DMF 용매 중에서 free BR과 Zn(II)-BR 착물 모두 세 단계의 환원과정을 거치며, 각 물질의 반과전위는 free BR의 경우 각각 $-1.31, -1.80, -2.01$ volt vs. Ag/Ag⁺이며, Zn(II)-BR 착물의 경우 각각 $-1.40, -1.82, -2.03$ volt vs. Ag/Ag⁺이었다. 실험결과에서

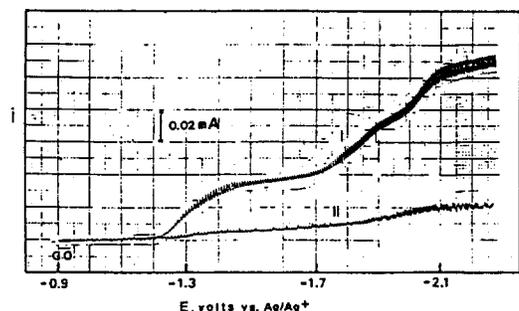


Fig. 2. DC polarogram of $7.0 \times 10^{-4} M$ bilirubin (I) and residual current (II) in $7.0 \times 10^{-2} M$ TEAP-DMF solution at $250^\circ C$.

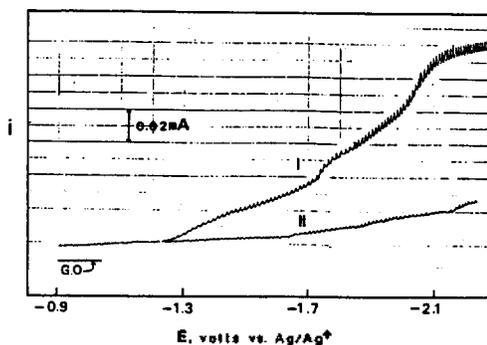


Fig. 4. DC polarogram of Zn-BR complex (I) and residual current (II) in TEAP-DMF solution at $25^\circ C$, $[Zn^{2+}] = 1.0 \times 10^{-3} M$, $[BR] = 5.0 \times 10^{-4} M$.

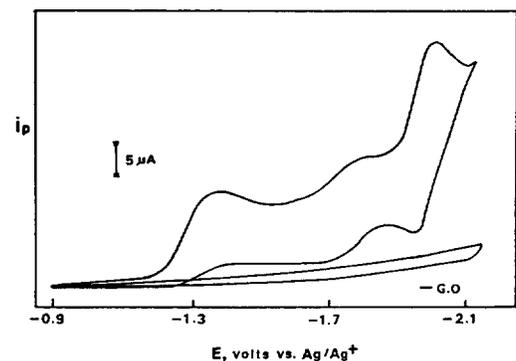


Fig. 3. Cyclic voltammogram of $7.0 \times 10^{-4} M$ bilirubin in $7.0 \times 10^{-2} M$ TEAP-DMF solution, scan rate: 200 mV/sec.

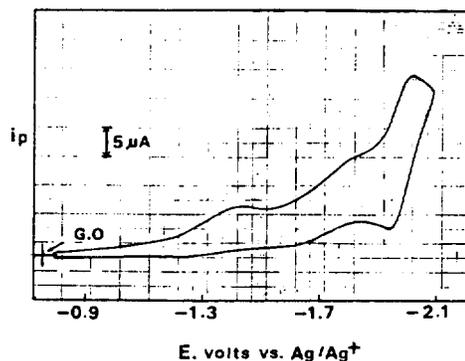


Fig. 5. Cyclic voltammogram of Zn-BR complex in 0.1 M TEAP-DMF solution at $25^\circ C$ scan rate: 100 mV/sec. $[Zn^{2+}] = 1.0 \times 10^{-3} M$, $[BR] = 5.0 \times 10^{-4} M$.

Table 1. DC polarographic $i_d/h^{1/2}$ ($\mu\text{A}/\text{cm}^{1/2}$) values of Zn-Bilirubin complex in TEAP-DMF solution at 25 °C^a

	$E_{1/2}$ (volt vs. Ag/Ag ⁺)	
	BR	Zn-BR
1st wave	-1.31	-1.40
2nd wave	-1.80	-1.82
3rd wave	-2.01	-2.03

^a[Zn]: $1.0 \times 10^{-3} M$, [Bilirubin]: $5.0 \times 10^{-4} M$.

Table 2. Temperature coefficient of DC polarographic current of Zn-Bilirubin complex in TEAP-DMF solution at 25 °C^a

Reduction step	Temp. coefficients (1/i·di/dT)(%)	Temp. range (°C)
1st wave	2.01	
2nd wave	1.85	20~30
3rd wave	1.47	

^a[Zn]: $1.0 \times 10^{-3} M$, [Bilirubin]: $5.0 \times 10^{-4} M$.

알 수 있듯이 Zn(II)-BR 착물의 반파전위가 free BR이 반파전위보다 약간 음전위쪽으로 이동하였다. 이것은 BR이 Zn와 불안정하기는 하나 착물을 형성함을 의미한다¹⁵. 그리고 Fig. 5에 나타난 Zn(II)-BR의 순환전압전류그램을 보면, 세 개의 환원파(봉우리 전위: -1.42, -1.82, -2.03 volt vs. Ag/Ag⁺)와 한 개의 산화파(-1.94 volt vs. Ag/Ag⁺)를 보였다. 제 1환원파와 제 2환원파는 재산화파가 없으나 제 3 환원파는 재산화파가 있으므로 제 3환원파는 비교적 가역적인 환원과정임을 알 수 있다.

환원전류의 유형. DMF 용액 중에서 Zn(II)-BR 착물이 환원될 때 발생하는 전류가 어떤 유형의 전류인지를 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 곧 수은주의 높이(h)를 50~75 cm로 바꾸어 가면서 $1.0 \times 10^{-3} M$ Zn(II)과 $5.0 \times 10^{-4} M$ BR이 포함된 Zn(II)-BR 착물의 직류폴로그래를 -0.9 ~ -2.3 volt vs. Ag/Ag⁺의 가전압 범위에서 그려, 각 환원단계에서의 한계전류값을 측정하고 이 값이 수은주 높이의 평방근($h^{1/2}$)에 비례하는지 그 여부를 조사하여 Table 1에 나타내었다. Table 1의 실험결과를 보면, 수은주의 높이가 50~75 cm의 범위에서 제 1환원파와 제 2환원파의 $i_d/h^{1/2}$ 의 같은 비례관계

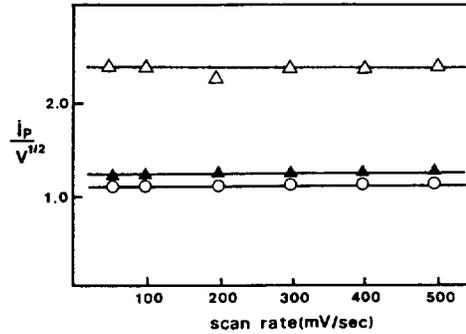


Fig. 6. Peak current function ($i_p/v^{1/2}$) with various scan rates for Zn-BR complex in 0.01 M TEAP-DMF solution at 25 °C. ○: 1st wave, ▲: 2nd wave, △: wave-aap.

에서 조금 벗어나지만, 제 3환원파의 $i_d/h^{1/2}$ 은 일정하였다. 또 환원전류의 유형을 한계전류의 온도계수 ($di_d/i \cdot dT \times 100\%$)로부터 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 이 표에 의하면, 20~30 °C의 온도 범위에서 제 1환원파와 제 2환원파 및 제 3환원파의 온도계수는 각각 2.01%, 1.85%와 1.47%였다. 이러한 실험결과로부터 제 3환원전류는 수은주 높이의 평방근에 비례하고 온도계수도 이론치(1.3~1.6%)에 근접하므로 확산지배적이라 할 수 있다. 그러나 제 1 환원전류와 제 2환원전류는 이론치에서 조금 벗어나므로 약간의 반응성 전류가 포함된 확산지배적인 전류라고 생각한다^{32,33}. 만약 환원전류가 반응성 전류이면 온도계수의 값이 5.0~20.0%가 된다.

한편 순환전압전류법으로도 환원전류의 유형을 조사할 수도 있다³⁴. 전극반응이 가역적이든 비가역적이든 환원전류가 확산지배적일 때, 봉우리전류(i_p)는 반응물질의 농도(C)와 전위주사속도의 평방근($v^{1/2}$)에 비례한다. 따라서 본 연구에서는 전위주사속도를 50 mV/sec에서 500 mV/sec까지 변화시키면서 봉우리 전류(i_p)의 변화를 측정하여 i_p 와 $v^{1/2}$ 의 관계를 구하여 Fig. 6에 나타내었다. 이 그림으로부터 알 수 있는 바와 같이 Zn(II)-BR 착물의 모든 환원파는 전위주사속도의 평방근에 비례하는 관계가 성립하였다.

이상의 실험결과들을 종합하여 볼 때, DMF 용액 중에서 Zn(II)-BR 착물의 제 1환원단계와 제 2환원 단계의 환원전류는 반응성전류가 약간 포함된 확산 전류이었으며, 제 3환원단계의 환원전류는 확산지배

적인 전류임을 알 수 있었다.

결 론

DMF 용액 중에서 zinc(II) 이온은 BR과 착물을 형성하였으나, copper(II) 이온은 BR과 착물을 형성하지 않고, 단지 BR을 biliverdin을 거쳐서 purpurin까지 산화시켰다. Zn(II)-BR 착물을 DMF 용액 중에서 3단계의 환원단계를 거치며 각 환원파의 반파전위는 -1.31 , -1.80 그리고 -2.03 volt vs. Ag/Ag⁺이었다. 그리고 각 환원파의 전류유형을 조사한 결과, 환원 제 1단계와 제 2단계의 환원전류는 반응성 전류가 약간 포함된 확산전류이었으나, 환원 제 3단계의 환원전류는 확산 지배적인 전류이었다.

본 연구는 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의하여 연구되었음을 밝히며 이에 감사함을 전합니다.

REFERENCES

1. W. O. Smith, *Photochem. Photobiol.*, **33**, 961 (1981).
2. R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, and B. N. Ames, *Science*, **235**, 1043 (1987).
3. D. A. Lightner, J. K. Gawronski, and K. Gawronska, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2456 (1985).
4. D. Kaplan and G. Navon, *J.C.S. Perkin II*, 1374 (1981).
5. C. D. Tran and G. S. Beddard, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**(24), 6741 (1982).
6. B. Honore, *J. Biol. Chem.*, **252**(31), 14939 (1987).
7. Y.-Z. Hsieh and M. D. Morris, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**(1), 62 (1988).
8. D. A. Lightner and A. F. McDonagh, *Acc. Chem. Res.*, **17**, 417 (1984).
9. A. F. McDonagh and L. A. Palma, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6865 (1982).
10. J. M. Ribo, J. A. Farrera, and J. Claret, *Experientia*, **46**, 63 (1990).
11. J. Wang, D. B. Luo, and P. A. M. Farias, *J. Electroanal. Chem.*, **185**, 61 (1985).
12. F. Moussa, G. Kanoute, C. Herrenknecht, P. Levellain, and F. Trivin, *Anal. Chem.*, **60**, 1179(1988).
13. P. Longhi, P. Manitto, D. Monti, and S. Rondini, *Anal. Chimica Acta*, **26**(4), 541 (1981).
14. G. M. McCullars, S. O'Reilly, and M. Brennan, *Clin. Chim. Acta*, **74**(1), 33 (1977).
15. J. D. Van Norman and E. T. Yatski, *Bioinorg. Chem.*, **9**, 349 (1978).
16. I. Sovago, B. Harman, I. Kolozsvari, and F. Matyuska, *Inorg. Chim. Acta*, **106**(4), 181 (1985).
17. Z. U. Bae, Y. T. Park, S. H. Lee, M. S. Song, and M. S. Jung, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **11**, 77 (1990).
18. Z. U. Bae, H. R. Lee, T. M. Park, and K. H. Kim, *J. Korean Chem. Soc.*, **34**, 340 (1990).
19. Z. U. Bae, H. R. Lee, T. M. Park, and M. S. Jung, *ibid.*, **35**, 374 (1991).
20. R. Flitman and M. H. Worth, *J. Biol. Chem.*, **241**, 669 (1966).
21. C. C. Kuenzle, R. R. Pelloniand, and M. H. Weibel, *Biochem. J.*, **130**, 1147 (1972).
22. D. W. Hutchinson, B. Johnson, and A. J. Knell, *Biochem. J.*, **133**, 399 (1973).
23. R. A. Velapoldi and O. Menis, *Clin. Chem.*, **17**, 1165 (1971).
24. J. D. Van Norman and R. Szentirmay, *Anal. Chem.*, **46**(11), 1456 (1974).
25. A. B. Thomas and E. G. Rochow, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1843 (1957).
26. I. M. Kolthoff and J. F. Coetzee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1852 (1957).
27. W. Meinke, *Anal. Chem.*, **43**(6), 23A (1971).
28. J. D. Van Norman and R. Szentirmay, *Bioinorg. Chem.*, **4**, 37 (1974).
29. J. D. Van Norman, *Anal. Chem.*, **45**, 173 (1973).
30. B. Zak, N. Moss, A. Boyle, and A. Zlatkis, *Anal. Chem.*, **26**, 1220 (1954).
31. J. D. Van Norman and M. M. Humans, *Anal. Chem.*, **46**(7), 926 (1974).
32. P. Zuman, "Organic Polarographic Analysis", p. 24, Pergamon press, London, 1964.
33. I. M. Kolthoff, "Polarographic Techniques", p. 125, 138 and 203, Interscience press, New York, 1955.
34. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964).