

글루타치온과 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 접합 화합물에 관한 라만분광학적 연구

鄭東巧 · 韓機玉 · 裴鮮建 · 劉壽晶* · 趙仁鎭†

군산대학교 자연과학대학 화학과

† 전북대학교 자연과학대학 화학기술학부

(1996. 8. 7 접수)

Raman Spectroscopic Study of the Conjugated Complex between Glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

Donggyo Chung, Keun-Ok Han Yu, Sun-Kun Bae, Soo-Chang Yu*, and In Ho Cho

Department of Chemistry, Kunsan National University, Chonbuk 573-701, Korea

† School of Chemical Science and Tech., Chonbuk National University, Chonbuk 561-756, Korea

(Received August 7, 1996)

글루타치온(GSH)은 생체조직 대부분의 세포 안에서 높은 농도를 유지하며 생체조직의 산화를 방지해주는데 있어서 중요한 역할을 담당하고 있기 때문에 생화학분야에서 많은 관심의 대상이 되고 있다.¹⁻⁴ 한 예로 환원형 GSH는 수정체내에 존재하는 단백질의 -SH 작용기가 산화됨을 방지함으로써 수정체가 투명하게 유지되는데 매우 큰 역할을 담당하고 있어 그의 양을 측정하려는 여러 시도가 있어 왔다.⁵⁻⁷ 여러 시도중 최근에는 GSH에 대한 선택성이 우수한 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)라는 표지 화합물질을 이용한 UV-visible 흡수분광법이 많이 이용되고 있다.⁷ 이 방법은 CDNB의 chloride와 GSH의 sulfhydryl 작용기가 반응을 일으켜 GS-DNB라는 conjugation(접합) 화합물을 형성할 때 340 nm에 UV-visible 흡수 특성밴드가 나타나게 되는데, 이 밴드를 monitoring함으로써 GSH를 정량하는 원리를 이용한 것이다. CDNB는 원래 GSH S-transferase(GST)라는 효소의 작용으로 GSH와 접합을 형성하기 때문에 CDNB를 이용하면 GSH같은 sulfhydryl 작용기를 갖는 cystein이나 mercaptoethanol과 같은 화합물들로부터 선택적으로 분리하여 정량할 수 있는 장점이 있는 것으로 알려져 왔다. 그러나 UV-visible 흡수분광법은 GS-DNB의 접합

화합물의 생성유무 및 정량적인 정보를 제공하는데는 우수하나, 어느 작용기를 통해서 일어나는 지와 GSH에 대한 선택성은 우수한지에 대한 분자수준에서의 정보를 제공하는데는 한계가 있다. 반면에, 진동분광학적 방법은 지문영역의 작용기 변화를 monitoring함으로써 어느 작용기를 통해서 화학반응이 진행되었는지를 쉽게 알 수가 있으므로,⁸ CDNB와 chloride와 GSH의 sulfhydryl 작용기간의 반응을 살펴보는 데 아주 적합한 방법이라 하겠다. 그럼에도 불구하고 이러한 문제를 해결하려는 시도로써 어떠한 진동분광학적 연구도 아직 보고된 바가 없다. 이에 본 실험에서는 라만분광학적 방법을 도입하여 GS-DNB 접합 형성여부와 CDNB와 GSH 선택성에 대하여 연구하게 되었다.

실 험

먼저 CDNB의 GSH와의 접합 화합물의 생성유무를 알아보기 위하여 CDNB, GSH, 그리고 GST를 Sigma로부터 구입하여, 문헌의 protocol⁷에 따라 in vitro 상에서 실험을 했다. CDNB와 GSH를 물 비가 1:1이 되게 섞은 후 GST를 첨가시켜, 수용액에 약 30분간 incubation(항온처리)시킨 뒤, UV-visible 흡

수 스펙트럼에서 최대흡광점 340 nm 밴드의 생성을 확인하였다. 이때 항온처리 과정 중에 일어날 수 있는 GSH의 산화를 최대한 억제시키기 위해 항온처리 매질에 N₂ 기체를 불어넣어 산소의 접근을 차단하였다. GSH와 GS-DNB 접합 화합물은 용액상태에서는 라만산란이 대단히 작아 라만 스펙트럼을 얻기가 어려우므로 동결건조기(일신 FD5510)에 시료를 건조시킨 뒤 라만 스펙트럼들을 얻었다. GS-DNB 화합물을 확인하는데 비교를 위한 기준물질로서 물비로 1:1인 GSH와 CDNB의 혼합물 시료에 GST를 첨가시키지 않고 접합을 시킬 때와 똑같은 항온처리 과정을 거쳐 얻었다. 실험에 필요한 UV-visible 흡수분광기는 Gilford의 Response™를 사용하였고, 동결건조기로는 일신 FD5510을 사용하였다. 라만 분광기는 현미경이 부착된 Renishaw system 2000^o를 사용하였고 시료는 glass slide 위에 올려 놓은 뒤 배율이 20X인 대물렌즈를 사용하여 스펙트럼을 얻었다. 스펙트럼의 분해능은 4 cm⁻¹, 정확성은 ± 2 cm⁻¹가 되게 하였으며, 입사광의 파장으로는 HeNe 레이저로부터 나오는 632.8 nm(5 mW)를 사용하였다. 전체 scan 수는 5 정도이며, 얻은 스펙트럼중 필요한 것은 background correction을 거쳤다.

결과 및 고찰

CDNB와 GSH와의 혼합물 및 접합 화합물에 대한 스펙트럼이 각각 Fig. 1의 (a)와 (b)에 나타나 있다. Fig. 1의 스펙트럼을 보면 800~1700 cm⁻¹과 2400~3000 cm⁻¹의 두 영역으로 나뉘어져 있는데 800~

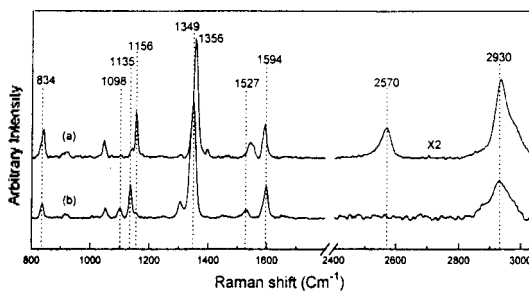


Fig. 1. 물비 1:1인 CDNB와 GSH의 혼합물(a)과 접합 화합물(b) 시료들을 동결건조시킨 뒤 얻은 라만 스펙트럼. 2400~3000 cm⁻¹ 영역은 2배로 확대하였음. 입사광: 632.8 nm, power: 5 mW, 분해능: 4 cm⁻¹.

1700 cm⁻¹ 사이에 존재하는 대부분의 밴드들은 주로 CDNB로부터 나온 것이고 2400~3000 cm⁻¹ 사이에 존재하는 밴드들은 GSH로부터 나온 것이다. Fig. 1의 (a)는 단지 혼합물에 대한 스펙트럼이고, Fig. 1의 (b)는 접합 화합물에 대한 것이므로 밴드들의 intensity(세기)와 진동수 이동이 서로 다를 수 있다. 1098, 1135, 1156, 그리고 2570 cm⁻¹에 해당되는 밴드들은 GS-DNB 화합물이 생성되었음을 말해주는 특성밴드들인데, 이 밴드들에 대한 assignment(지정)는 잠정적으로 각각 aryl C-S, 벤젠, aryl C-Cl, 그리고 S-H 신축모드로 하였다.⁸

각 밴드들의 변화를 알아보기 위해 먼저 1098 cm⁻¹ 밴드를 살펴보았다. 이 밴드는 Fig. 1의 (a)에는 존재하지 않다가 Fig. 1의 (b)에 나타나게 되었는데, 밴드의 위치가 문헌⁸에 보고된 aryl C-S 신축모드의 그것과 거의 일치될 뿐만 아니라 원래 CDNB에는 존재하지 않다가 GSH와 접합이 형성됨에 따라서 생성된 것으로 보아서 접합 화합물의 aryl C-S 신축모드라고 말할 수가 있다. 따라서 이 사실은 접합 화합물이 GSH의 sulfhydryl terminal을 통해서 일어났음을 암시하고 있다. 접합이 GSH의 sulfhydryl terminal을 통해 일어났음을 직접 확인할 수 있는 모드로서 Fig. 1의 (a)에 나타났다가 Fig. 1의 (b)에서 소멸된 2570 cm⁻¹에 해당되는 밴드를 들 수 있는데, 이것은 S-H의 신축모드에 해당되며 GS-DNB가 형성될 때 S-H의 결합이 끊어져 밴드가 소멸된 것으로 생각할 수가 있다. 1135 cm⁻¹ 밴드의 지정은 아직 정확히 알 수는 없으나 벤젠고리에 속하는 모드중 접합의 형성여부에 따라 증감되는 밴드로 추정된다.⁸ 반면에 1156 cm⁻¹ 밴드는 접합이 형성됨에 따라 소멸되는 것으로 미루어 보아, aryl C-Cl의 신축모드로 간주되고 있다. 이 밴드의 변화로부터는 CDNB의 chloride가 반응에 참여했음을 알 수가 있다. 따라서 위의 변화된 밴드들로부터 GS-DNB 접합 화합물이 sulfhydryl 작용기와 CDNB의 chloride 사이의 반응으로 생성되어졌다고 결론지을 수가 있다.

이 밴드들에 대한 지정의 타당성을 좀더 상세히 알아보기 위해 Fig. 2의 (a), (b) 및 (c)에 각각 CDNB 교체, 물비 2:1인 CDNB와 GSH의 접합 화합물, 그리고 물비 1:1인 CDNB와 GSH의 접합 화합물에 대한 스펙트럼을 얻어 비교해 놓았다. 밴드들의 세기

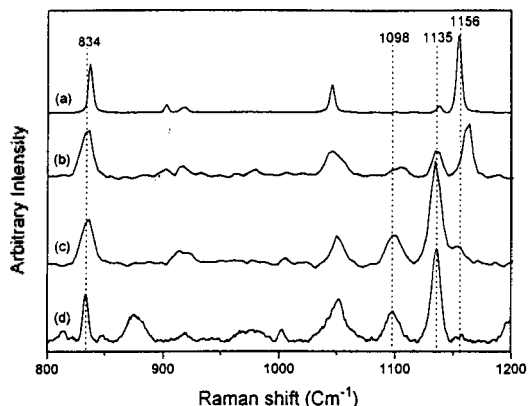


Fig. 2. 834 cm^{-1} 밴드를 규격화시킨 뒤 $800\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 영역을 확대한 라만 스펙트럼 (a) CDNB 고체, (b) 몰비 2:1인 CDNB와 GSH의 접합 화합물, (c) 몰비 1:1인 CDNB와 GSH의 접합 화합물, (d) 몰비 1:1인 CDNB와 cystein의 접합 화합물. 입사광: 632.8 nm , power: 5 mW , 분해능: 4 cm^{-1} .

변화를 살펴보기 위하여 벤젠모드에 속하면서 반응에 참여하지 않는 834 cm^{-1} 밴드의 세기를 똑같이 한 후에 다시 scale하여 나타내었다. Fig. 2의 (b)와 (c)에 나타난 바와 같이 GSH의 농도를 변화시켰을 때 여러 밴드들의 변화가 수반됨을 볼 수가 있는데, GSH의 농도를 증가시키기에 따라 aryl C-S 신축모드로 지정된 1098 cm^{-1} 밴드의 세기가 증가되어 나타났다, 반면에 aryl C-Cl 신축모드로 지정된 1156 cm^{-1} 밴드는 감소되어 나타났다. 따라서 위에 언급한 진동모드들에 대한 지정은 타당성이 있다고 볼 수가 있다.

CDNB의 GSH 선택성을 보기 위하여 GSH 대신 cystein을 이용해 똑같은 항온처리과정을 거쳐 얻은 스펙트럼이 Fig. 2의 (d)에 나타나 있다. 예상했던 것과는 달리, cystein과 반응을 한 CDNB의 밴드들은 GSH의 경우에서와 똑같이 나타나 있음을 알 수가 있는데 이 결과는 문헌⁷에 보고된 내용과는 다르게 cystein도 CDNB와 접합을 형성함을 나타내 주고 있다. 본 연구의 결과와 문헌⁷에 나타난 결과가 다르게 나타난 것은 아마도 접합되는 조건이 다르기 때문일 것으로 생각된다. 문헌⁷에 나타난 실험의 결과는 접합시간을 약 30분으로 한 뒤 용액상태에서 바로 스펙트럼을 얻었으나, 본 실험은 항온처리시킨

뒤, 용액상태에서는 라만산란이 작기 때문에, 동결 건조기에서 건조시키는 과정을 한번 더 거쳤는데 아마도 건조시키는 과정중 농도의 증가로 인하여 발생하는 chemistry가 낮은 농도의 용액 중에서 일어나는 그것과는 달라서 결과가 다르게 나타난 것으로 생각되어진다. 좀더 명확한 원인규명을 위해, 항온처리 시간별 및 GSH의 농도별 접합상태를 검토해 보아야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, GSH의 정량을 위한 CDNB 접합 방법의 검증을 진동분광학에 속하는 라만분광법을 통하여 처음으로 시도하여 접합은 CDNB의 chloride와 GSH의 sulfhydryl 작용기간의 반응을 통해서 일어남을 확인하였다. 또한 문헌⁷에 보고된 결과와 다르게 CDNB가 cystein 과도 접합 화합물을 형성한, 본 라만분광학적 실험결과는 CDNB가 GSH를 정량하는데 광범위한 조건에서 보편적으로 사용되기 위해서는, 보다 체계적인 연구가 필요함을 나타내주고 있다.

이 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성연구비 (BSRI 94-3431)의 지원에 의한 것이며 이에 감사를 드린다.

인 용 문 헌

1. Ansari, N. H.; Srivastava, S. K. *Curr. Eye Research* **1982/1983**, *2*, 271.
2. Truscott, R. J. W.; Augusteyn, R. C. *Exp. Eye Res.* **1977**, *25*, 139.
3. Kinoshita, J. H.; Merola, L. O. *Ciba Fdn. Symp.* **1973**, *19*, 173.
4. Cohen, G.; Hochstein, P. *Biochemistry* **1963**, *2*, 1420.
5. Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
6. Yu, S.-C. *J. Korean Chem. Soc.* **1996**, *40*, 135.
7. Saxena, M.; Singhal, S. S.; Awasthi, Y. C. *Exp. Eye Res.* **1992**, *54*, 461.
8. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wilberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd Ed.; Academic Press: San Diego, U. S. A., 1990.
9. Williams, K. P. J.; Pitt, G. D.; Smith, B. J. E.; Whitley, A.; Batchelder, D. N.; Hayward, I. P. *J. Raman Spectrosc.* **1994**, *25*, 131.