

속 보

생리학적 조건에서의 Peroxo Vanadium(V) 화합물인
 $\text{VO}(\text{O}_2)(\text{nta})^{2-}$ 와 Cysteine의 반응

원태진

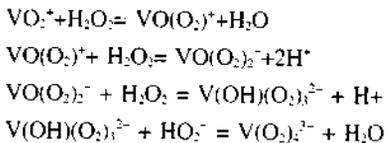
창원대학교 자연과학대학 화학과
(1999. 10. 27 접수)

Reactions of Peroxo Vanadium(V), $\text{VO}(\text{O}_2)(\text{nta})^{2-}$
and Cysteine in Physiological Conditions

Tae-Jin Won

Department of Chemistry, Changwon National University,
Changwon, Kyungnam 641-773, Korea
(Received October 27, 1999)

당뇨병 치료제로는 현재 사용되고 있는 인슐린 (insulin) 주사가 가장 효과적이다. 그러나 인슐린은 주사를 통하여 인체에 주입되기 때문에 육체적 그리고 정신적 고통이 따른다. 1985년 바나듐(vanadium) 화합물이 체내에서 인슐린과 유사한 성질을 갖는다고 발표된 이후에 인슐린과 유사한 성질을 갖는 새로운 바나듐 화합물들이 개발되고 있다.¹ 특히 바나듐 화합물들은 주사가 아닌 경구 투약이 가능하기 때문에 주목을 받고 있다. 이들은 5가의 바나듐 옥사이드 화합물의 형태를 갖고 있다.^{2,4} 이 화합물에 과산화수소(H_2O_2)의 첨가는 인슐린과 유사한 효과를 크게 증가시킨다고 보고되었다.² 수용액 안에서 5가의 바나듐 옥사이드 화합물과 과산화수소의 혼합은 peroxo vanadium(V) 화합물들을 형성한다.⁵



Peroxide 리간드는 과산화수소의 농도와 수용액의 pH에 따라 1개에서 최고 4개까지 η^2 -type으로 바나듐 금속이온에 결합한다. 그러나 peroxo vanadium 화합물은 생리학적 조건에서 매우 불안정하여 치료제로서 사용되어질 수 없으므로 안정한 peroxo vanadium 화

합물의 개발이 필요하였다. Peroxo vanadium 화합물에 chelate의 첨가는 안정한 peroxo vanadium 화합물을 형성한다. Pyridine-2-carboxylate와 pyridine-2,6-dicarboxylate 등과 같은 킬레이트들이 결합하고 있는 peroxo vanadium 화합물인 $\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{pic})^{2-}$ 와 $\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{dip})^-$ 은 생리학적 조건에서 매우 안정하며 인슐린과 유사한 효과를 갖는다고 보고되었다.^{6,7} 최근에 수용액 안에서 매우 안정한 peroxo vanadium 화합물인 $\text{K}_2\text{VO}(\text{O}_2)_3(\text{nta})$ 가 보고되었다.⁸ (nta=nitritotriacetate) 이 화합물은 pentagonal bipyramidal의 구조로 7배위 자리를 갖고 있으며 하나의 oxo group과 η^2 -type으로 결합하고 있는 peroxide, 그리고 네자리 리간드 nta³⁻가 바나듐 이온에 안정하게 결합되어 있다. 이들 peroxo vanadium 화합물에 관하여 발표된 논문들 중에서 현재까지 생리학적 조건에서의 반응에 대한 속도론적 연구가 보고된 적이 없다. 따라서 본 논문에서는 peroxo vanadium 화합물인 $\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{nta})^{2-}$ 의 생리학적 조건(pH 7.4)에서의 안정성을 측정하고 생물학적 thiol 중의 하나인 cysteine과의 반응 생성물을 확인하였으며 속도론적 연구를 통하여 $\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{nta})^{2-}$ 와 cysteine과의 반응속도상수 및 가능한 반응경로를 제안하였다. 물론 이 실험 결과로부터 이 물질이 체내에서 인슐린과 같은 효과를 나타내는지를 예측할 수 는 없으나 생리학적 조건에서 peroxo vanadium 화합물의 생분자와의 반응에 대한 화학적 성질을 이해한다는 측면에서 중요

한 연구라고 생각되어진다.

실 험

시약 및 기기. 사용된 시약, V_2O_5 , KOH, nitrilotriacetic acid, L-cysteine, cystine, K_2PO_4 들은 Aldrich에서 구입하여 정제없이 사용하였다. 본 연구에서 IR 분광기와 UV-Vis 분광기는 FT-IR Nicolet Impact 410과 Shimadzu UV-2401 PC가 사용되었다.

$K_2[VO(O_2)(nta)]$ 의 합성. 본 연구에서는 문헌에 보고된 합성법⁶과 다른 방법에 의하여 $K_2[VO(O_2)(nta)]$ 의 단일결정을 얻었다. V_2O_5 (2 g)와 KOH(4 g)를 20 mL의 물에 넣고 약 70°C로 가열하여 투명한 연한 초록색의 용액이 얻어졌다. 이 용액에 nitrilotriacetic acid(4.2 g)를 조금씩 첨가하면 진한 청녹색의 용액으로 변한다. 이 용액을 얼음물 속에서 약 5°C 정도로 냉각한다. 이 용액에 30%의 H_2O_2 를 한 방울씩 첨가하여 붉은 오렌지 색의 용액을 얻었다. 이 용액에 약 10 mL의 에탄올을 첨가하고 붉은 오렌지 색을 띠는 평면사각형의 결정이 형성될 때까지 약 5-6일간 실온에서 증발시킨다. 이 결정은 물에 잘 녹으며 산성과 중성의 수용액 안에서 매우 안정하여 2주 이상 흡광도의 변화가 없었다. 수용액 안에서 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 는 429 nm에서 흡광도를 나타낸다. ($\epsilon_{429}=340 M^{-1}cm^{-1}$)

속도론적 실험. 모든 속도론적 실험은 25°C에서 질소가스가 채워진 pH 7.4의 phosphate 완충용액(0.1 M) 안에서 진행되었다. $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 와 cysteine의 반응은 429 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. Cysteine 및 반응 생성물들은 429 nm에서 흡광도를 나타내지 않는다.

반응 생성물의 분석. 알려진 양의 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 와 과량의 cysteine 을 질소가스가 채워진 25 mL의 수용액(pH 7.4) 안에서 반응시킨 후 cysteine의 반응 후 생성물인 백색의 침전물을 거름종이를 이용하여 수거하여 증류수로 세척한 후 오븐에서 건조시켜 그 양을 측정하였으며 reference 물질인 cystine과 생성물의 IR 스펙트럼을 비교함으로써 cysteine의 반응 후 생성물을 확인하였다. (IR(KBr) 1583, 1487, 1406, 852, 545, 465 cm^{-1}) 또한 오렌지색의 용액인 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 는 반응후 청록색으로 변하는데 이 청록색의 바나듐 product는 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 의 합성과정 중에 형성되는 $VO_2(nta)^{2-}$ 와 일치한다.

결과 및 고찰

pH 7.4의 수용액 안에서 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 와 cysteine은 매우 느리게 반응한다. 본 연구에서는 initial rate method⁷를 사용하여 반응속도상수를 결정하였다. Fig. 1에서와 같이 $[VO(O_2)(nta)^{2-}][cysteine]$ vs. initial rate의 그래프는 직선을 나타내며 따라서 이 반응은 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 와 cysteine에 대하여 각각 1차 반응이며 아래의 속도식으로부터 $(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ 의 2차 속도상수($M^{-1}s^{-1}$)를 결정하였다. Table 1에서 각 실험 조건들과 초기속도(initial rate)들을 나타내었다.

$$-d[VO(O_2)(nta)^{2-}]/dt = k[VO(O_2)(nta)^{2-}][cysteine]$$

Cysteine의 반응 후 생성물은 IR 분광기를 이용한 분석에 의하여 산화된 cysteine라디칼의 dimer 형태인 cystine으로 확인되었다. 이 결과는 인슐린과 유사한 효과를 내는 물질(insulin-mimic)인 $K_2VO(O_2)_2(pic)$ 와 cysteine의 반응결과와도 동일하다.⁷ 생성물의 정량 분석실험에서 $VO(O_2)(nta)^{2-}$ 용액에 약 6배 과량의

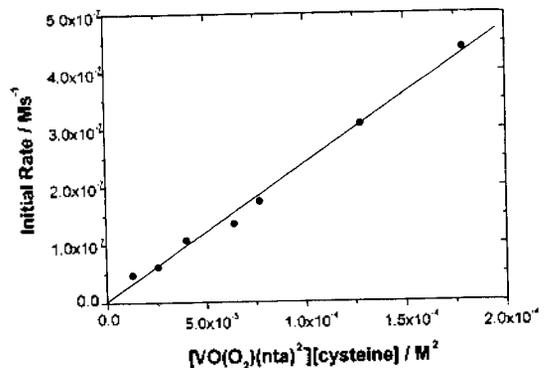


Fig. 1. The Plot of $[VO(O_2)(nta)^{2-}][cysteine]$ vs. Initial Rate.

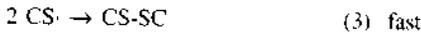
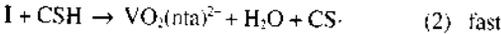
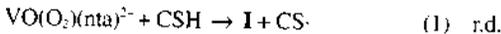
Table 1. The Observed Initial Rates for Reactions of $VO(O_2)(nta)^{2-}$ and Cysteine in Physiological Condition

$[VO(O_2)(nta)^{2-}]/M$	$[Cysteine]/M$	Initial Rate/ Ms^{-1}
2.56×10^{-3}	0.005	0.48×10^{-7}
2.56×10^{-3}	0.01	0.62×10^{-7}
2.00×10^{-3}	0.02	1.08×10^{-7}
2.56×10^{-3}	0.03	1.75×10^{-7}
2.56×10^{-3}	0.05	3.09×10^{-7}
2.56×10^{-3}	0.07	4.40×10^{-7}
1.28×10^{-3}	0.05	1.36×10^{-7}

experimental conditions: pH 7.4 (0.1 M phosphate buffer), T=25°C

cysteine을 반응시킨 후 생성된 cystine의 양은 사용된 VO(O₂)(nta)²⁻의 몰수와 일치함을 보인다. ([cystine]/[VO(O₂)(nta)²⁻])=(0.91+0.03) 즉, 하나의 VO(O₂)(nta)²⁻는 2개의 cysteine을 산화시키고 산화된 두 개의 cysteine 라디칼이 dimer, 즉 하나의 cystine을 형성한다. 그러나 관찰된 속도식에서는 cysteine에 대하여 1차반응을 보인다. 따라서 실험 결과들을 종합해 볼 때 다음과 같은 반응 메커니즘을 제안할 수 있다.

Proposed Mechanism

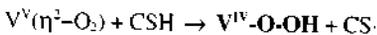


CSH = cysteine, I = intermediate.

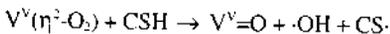
CS· = oxidized cysteine radical.

CS-SC=cystine, r.d.=rate determined step

첫 번째 반응 (1)에서 VO(O₂)(nta)²⁻가 cysteine을 산화시켜 cysteine 라디칼을 형성하고 자신은 중간체를 형성한다. 그리고 이 중간체는 반응 (2)에서 또 다른 cysteine을 빠르게 산화시킨다. 이 반응경로에서 반응 (1)이 속도결정 단계이며 빠른 반응 (2)는 관찰된 반응 속도에 영향을 주지 않으며 실험 결과와 같이 VO(O₂)(nta)²⁻와 cysteine에 대하여 각각 1차 반응을 보인다. 본 연구에서 중간체를 확인하지는 못하였으나 예측해 볼 수 있는 가능한 중간체중 하나는 peroxide를 통한 중심금속의 환원에 의하여 형성될 수 있는 η¹-type의 peroxide 리간드를 가진 6배위의 VO(O₂H)(nta)²⁻이다.



즉, cysteine으로부터 peroxide 리간드로 수소원자전이에 의하여 중심금속의 산화상태가 5가에서 4가로 환원되며 이 중간체의 peroxide 리간드는 또다른 cysteine의 수소원자전이 반응에 의하여 H₂O와 바나듐의 oxo group으로 환원될 수 있다. 이와 유사한 중간체가 2-propanol의 acetone으로의 산화반응에서 제안된 적이 있다.¹⁰ 또한 열역학적으로 적은 가능성을 갖고 있으나, hydroxyl 라디칼의 형성도 생각해 볼 수 있다.



이 경우에는 peroxide 리간드트로의 수소원자전이 후 peroxide 리간드의 O-O bonding의 homolytic cleavage

에 의한 hydroxyl 라디칼의 형성을 예측할 수 있다. Butler는 VO²⁺와 H₂O₂의 반응에서 VO²⁺의 산화에 의한 hydroxyl 라디칼의 형성 가능성에 대하여 보고한 적이 있다.¹¹ 이들 중간체의 확인 및 반응형태에 대한 연구는 현재 진행 중에 있다.

인슐린과 같은 효과를 보이는 peroxo vanadium 화합물들을 유사한 형태의 peroxo transition metal 화합물(non-insulin mimic)들과 비교할 때 반응성에서는 유사성(산화제로서 전자전이 또는 산소전이)을 보이나⁶ 속도론적으로는 매우 느린 반응을 보인다.¹¹ 따라서 만약 peroxo vanadium 화합물의 산화반응이 인슐린과 유사한 효과를 내는 주된 반응경로라면 이 물질의 인슐린과 유사한 효과는 산화반응속도가 결정적인 역할을 하고 있다고 생각할 수 있다. 즉 생체 안에서 반응속도가 그 물질의 특성을 결정하는데 매우 중요한 역할을 할 수 있으며, 따라서 신약개발 분야의 연구에서 속도론적 연구, 즉 반응속도에 관한 연구 또한 중요한 과제라고 생각되어 진다.

인 용 문 헌

1. Heyliger, C. E.; Tahiliani, A. G.; McNeill, J. H. *Science* **1985**, 227, 1474.
2. Kadota, S.; Fantus, I. G.; Deragon, G.; Guyda, H. J.; Posner, B.I. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 8252.
3. Fantus, I. G.; Kadota, s.; Deragon, G.; Foster, B.; Posner, B. I. *Biochemistry* **1989**, 28, 8864.
4. Watanabe, H.; Nakai, M.; Komazawa, K.; Sakurai, H. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 876.
5. Won, T. J.; Barnes, C.L.; Schiemper, E. O.; Thompson, R. C. *Inorg.Chem.* **1995**, 34, 4499.
6. Shaver, A.; Ng, J. B.; Hall, D. A.; Soo Lum, B.; Posner, B. I. *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 3109.
7. Posner, B.I.; Faure, R.; Burgess, J. W.; Bevan, A. P.; Lachance, D.; Zhang-Sun, G.; Fantus, I. G.; Ng, J. B.; Hall, D. A.; Soo Lum, B.; Shaver, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 4596.
8. Wei, Y. G.; Zhang, S. W.; Huang, G. Q.; Shao, M. C. *Polyhedron* **1994**, 13, 1587.
9. Espenson, J. H. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*; McGraw-Hill, Inc.: New York, U. S. A., 1995; p 8.
10. Butler, A.; Clague, M. J.; Meister, G. E. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 625.
11. Won, T. J.; Sudam, B. M.; Thompson, R. C. *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 3804.