

## 자외선 공명 라만분광법을 이용한 Doxorubicin과 Adenine의 상호작용 연구

이철재 · 정맹준\*  
상주대학교 응용화학공학부  
(2008. 1. 21 접수)

### The Study of Doxorubicin and its Interaction with Adenine by UV-Resonance Raman Spectroscopy

Chul-Jae Lee and Maeng-Joon Jung\*

School of Applied Chemical Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea  
(Received January 21, 2008)

**요 약.** 항암제인 독소루비신과 아데닌과의 상호작용을 알아보기 위하여  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ 의 수용액상 농도 범위에서 1 : 2의 부피비로 혼합하여 조사하였다. 자외선 공명라만 분광법과 표면증강 라만 분광법을 이용하여 수용액상에서 독소루비신 분자의 아데닌 분자에 대한 결합 자리를 알아 본 결과 독소루비신 분자는 아데닌 분자의 7번 위치의 질소와 상호작용 가능성을 확인할 수 있었다.

**주제어:** 독소루비신, 아데닌, 구아닌, 자외선 공명라만 분광법, 표면증강 라만 분광법

**ABSTRACT.** The interaction of the antitumour agent, doxorubicin, with adenine is investigated in an aqueous solution at a concentration of  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  with volume ratios of 1:2. A UV-resonance Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy are used to determine the binding sites of doxorubicin to adenine and the structural variations of doxorubicin-adenine complexes in an aqueous solution. We identified that the possibilities of doxorubicin interacted with the N7 positions of adenine.

**Keywords:** Doxorubicin, Adenine, Guanine, UV-Resonance Raman Spectroscopy, Surface Enhanced Raman Spectroscopy

## 서 론

공명 라만 산란(Resonance Raman Scattering : RRS)은 시료에 주사 하는 복사선이 시료의 전자전이 에너지 영역에 포함되어 시료에 의해 복사선의 에너지가 흡수되어지면 그 결과 시료가 전자적으로 들뜬 상태로 전이되며 라만 산란이 발생하게 된다.<sup>1-3</sup>

이러한 조건에서는 들뜬 상태의 전자가 바닥상태로 이완되면서 형광을 동반하게 되고 일반 라만 산란에 비해 산란 복사선의 세기가  $10^2$ - $10^4$  배정도 증폭된다. 따라서 일반 라만 산란의 경우 시료의 측정 한계 농도가 0.1 M 정도이나 공명 라만 산란의 경우

에는 일부 시료를  $10^{-8}$  M의 농도까지 측정이 가능하다. 이러한 장점을 활용하여 공명 라만 산란을 미량 분석의 측정에 효과적으로 활용할 수 있다. 또한 공명 라만 산란으로 증폭되는 신호는 분자 구조 내에서도 전자 전이가 일어나는 모드만이 선별적으로 증폭되고 특히, 대칭진동에 의한 모드가 주로 증폭되므로 복잡한 구조를 가진 물질의 경우에도 일반 라만 산란에 비해 단순한 라만 스펙트럼이 얻어지기 때문에 스펙트럼의 해석과 물질의 구조 및 특성 분석이 용이한 장점이 있다.

시료에 주사한 에너지에 의해 전자의 에너지가 여기 되었다가 바닥상태로 이완되는 과정에서 대부분

의 경우 형광을 수반하므로 형광에 의한 방해 요인이 심각하여 정상적으로 라만 스펙트럼을 측정하는 것이 불가능한 경우가 나타나기도 한다. 이렇게 형광에 의한 방해는 표면강화 라만 분광법을 이용하여 해결할 수 있다. 표면 강화 라만 산란(Surface Enhanced Raman Scattering : SERS)은 거칠게 처리된 특정 금속 표면에 흡착되어 있거나 수백 나노미터 이내의 거리에 위치해 있을 때 발생하는 라만 산란의 일종으로 이때 라만 산란의 세기는 일반 라만의 세기와 비교하여  $10^4$ ~ $10^6$ 배 혹은 그 이상 증가되는 현상을 말하며 이러한 현상을 이용하여 지친 금속표면에 흡착된 분자의 흡착양식이나 표면화학반응 등의 연구에 많이 이용되고 있다.<sup>4-6</sup> 또한, 생화학물질의 분석에는 자외선 영역의 파장을 여기 파장으로 이용한 자외선 공명 라만 분광법이 형광에 의한 방해 요인을 효과적으로 해결한 연구 논문들이 많이 보고되고 있다.<sup>7-10</sup>

자외선 공명라만 분광법과(UV-RRS)와 표면증강라만 분광법(SERS)을 생화학 물질의 분석에 이용한 것으로는 DNA 내부의 염기쌍과 층간삽입의 형태로 상호 작용하여 항암작용을 일으키는 것으로 알려진 독소루비신(Doxorubicin)이라는 물질이다.<sup>11-12</sup> 그러나 아직까지 독소루비신 분자가 DNA 내부의 염기쌍과의 층간삽입 메커니즘은 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 단지 DNA 내부의 아데닌과 구아닌 분자와의 상호작용으로 층간삽입 되는 것으로 보고되고 있다.<sup>13</sup>

특히, 아데닌 분자는 핵산의 뉴클레오티드 형성에 사용되는 2개의 퓨린 염기 중의 하나로 티민과 결합하여 핵산의 구조를 안정하게 하며 리보오스나 디옥시리보오스와 결합하여 아데노신의 구조를 이루게 된다. 또한, 3개의 인산염 그룹이 추가 될 경우 생물체의 에너지원인 ATP(Adenosinetriphosphate)를 이루게 된다. 이러한 생물학적 에너지원의 중요성을 고려해 볼 때 아데닌의 반응성에 대한 분자 구조적 연구는 매우 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 자외선 공명라만 분광법과 표면증강라만 분광법을 이용하여 아데닌 분자와 독소루비신 분자와의 반응성을 알아보고자 한다.

**실 험**

**시 약**

본 실험에 사용된 silver nitrate, Adenine 및 Doxorubicin

은 Aldrich사 제품을, Hydrogen peroxide와 D-glucose, Sulfuric Acid 등은 Junsei사 제품을 구입하여 더 이상의 정제 과정 없이 사용하였다.

**SERS 측정을 위한 silver mirror substrate의 제조**

12 mm×25 mm 유리판을 진한 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액과 30 wt% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 3:1 비율로 혼합한 용액에서 세척하고 다시 3차 증류수로 수회 세척한 후 건조하여 배양접시에 넣는다. 여기에 5 wt% 실버암모니아용액(AgNO<sub>3</sub> 0.5 g을 28 wt% NH<sub>4</sub>OH 10 mL에 녹인 용액; [Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>(aq))과 5 wt% D-glucose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 용액을 10 mL 혼합한 후 60~70 °C의 온도로 약 1시간 동안 물증발을 수행한다. 이렇게 만들어진 silver mirror substrate를 3차 증류수로 수회 세척한 후 공기 중에서 건조하여 본 실험에 사용하였다.

**측정에 사용된 시료 용액의 제조**

측정에 사용된 아데닌분자의 시료용액은 초순수를 이용하여 10<sup>-3</sup> M 수용액으로 제조한 후 저온 배양기의 온도를 5 °C로 유지한 후 24시간 방치한 다음 측정에 사용하였다. 또한 독소루비신 분자의 시료용액은 0.1 M 농도의 수용액을 제조한 후 용액의 최종 농도가 1.0×10<sup>-4</sup> M이 되게 묽혀서 실험에 사용하였다. 또한 아데닌의 독소루비신에 대한 반응성을 알아보기 위해서 10<sup>-3</sup> M의 아데닌 용액과 10<sup>-4</sup> M의 독소루비신 용액을 2:1의 부피비로 혼합한 다음 저온 배양기의 온도를 5 °C로 유지한 후 24시간 방치한 후 측정에 사용하였다.

**기 기**

분석에 사용된 라만분광기는 Jobin-Yvon Horiba HR800 모델의 마이크로 라만 분광기를 이용하여 single monochromator로 스캔한 후 액체질소로써 약 -133 °C로 유지되는 CCD 3000V 검출기를 586 컴퓨터에 인터페이스하여 Labspec 4.01 프로그램으로 스펙트럼 자료를 얻었다. 사용된 레이저는 Coherent Innova 90C Fred™ 모델의 Ar 이온 레이저를 사용하여 514.5 nm 파장의 빛을 시료에 조사하여 표면증강 라만 스펙트럼을 얻었다. 그리고 측정 시 confocal hole 크기, 레이저의 세기 그리고 시료의 스캔 시간은 각각 400 μm, 5 mW 그리고 10초당 20회씩 반복하여 측정하였다. 또한, 자외선 공명라만 스펙트럼에

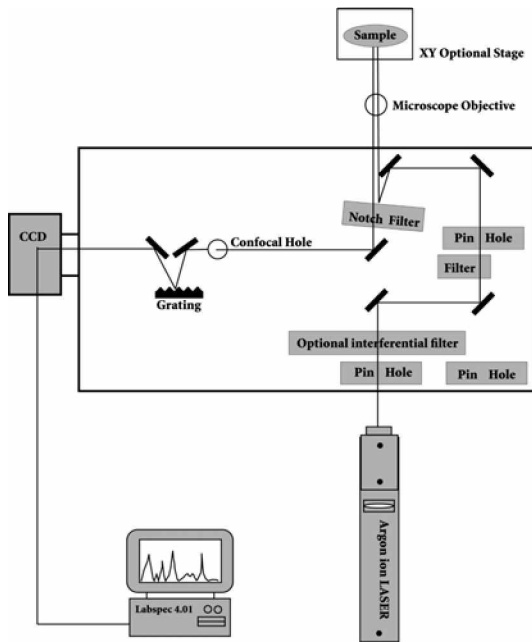


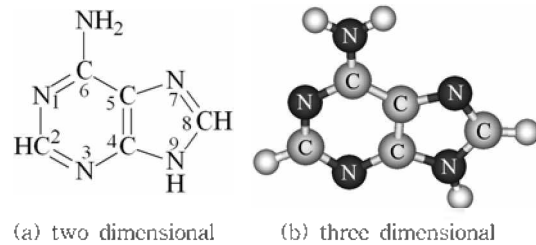
Fig. 1. Layout of Jovin-Yvon Horiva HR800 Raman system.

서는 SHG(Second Harmonic Generation) optics를 사용하여 257 nm 파장의 빛을 시료에 조사하여 자외선 공명라만 스펙트럼을 얻었으며 이 경우 사용된 confocal hole 크기, 레이저의 세기 그리고 시료의 스캔 시간은 각각 600  $\mu\text{m}$ , 1mW 그리고 10초당 20회 반복하여 측정하였다. 그리고 이 라만분광기의 측정 시 분해능은  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ 이며 Fig. 1에 본 실험에 사용되어진 라만 시스템의 모식도를 나타내었다. 또한 UV-visible 스펙트럼은 Shimadzu UV-360 모델을 사용하였다.

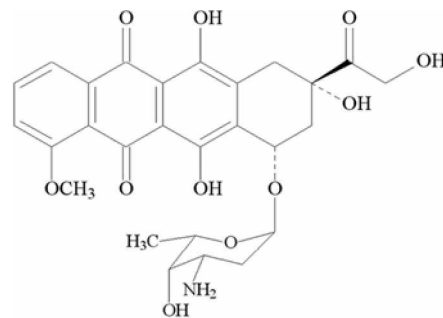
## 결과 및 고찰

### 아데닌과 독소루비신 분자의 UV-Visible 흡수스펙트럼

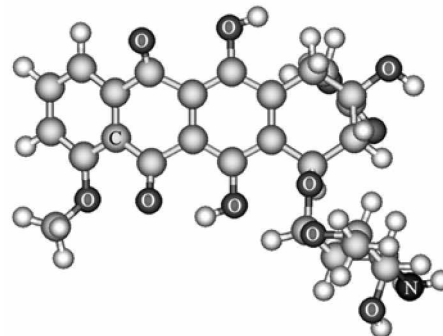
본 실험에 사용된 아데닌과 독소루비신 분자의 2차원과 3차원 구조를 각각 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 또한, 아데닌과, 독소루비신 그리고 독소루비신-아데닌 혼합용액의 UV-Visible 흡수 곡선을 알아보기 위하여 Fig. 4에 각각의 자외선 흡수 스펙트럼을 나타내었다. 우선, Fig. 4에 나타낸 바와 같이 아데닌과 독소루비신 분자의 최대 흡수파장( $\lambda_{max}$ )이 각



(a) two dimensional (b) three dimensional  
Fig. 2. The chemical structure of adenine by HyperChem 6.0 Geometry optimization.



(a) two dimensional



(b) three dimensional

Fig. 3. The chemical structure of doxorubicin by HyperChem 6.0 Geometry optimization.

각 298 nm, 486 nm에서 나타났다. 또한 독소루비신-아데닌 혼합 용액의 UV-Visible 흡수 스펙트럼을 살펴보면 486 nm의 독소루비신 분자의 흡수 띠가 거의 사라지고 298 nm의 흡수 띠만 관측됨을 알 수 있다.

### 아데닌과 독소루비신 분자의 SERS 및 UV-RRS 스펙트럼

Fig. 4에 나타난 UV-Visible 스펙트럼의 측정 결과

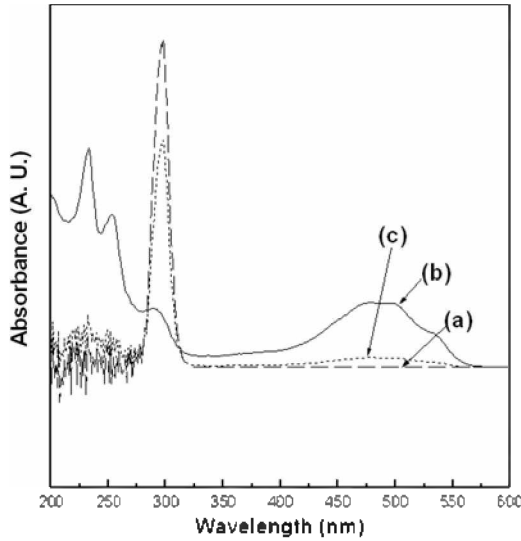


Fig. 4. The UV-visible absorption spectra of (a) the adenine, (b) the doxorubicin and (c) the doxorubicin-adenine mixing solution.

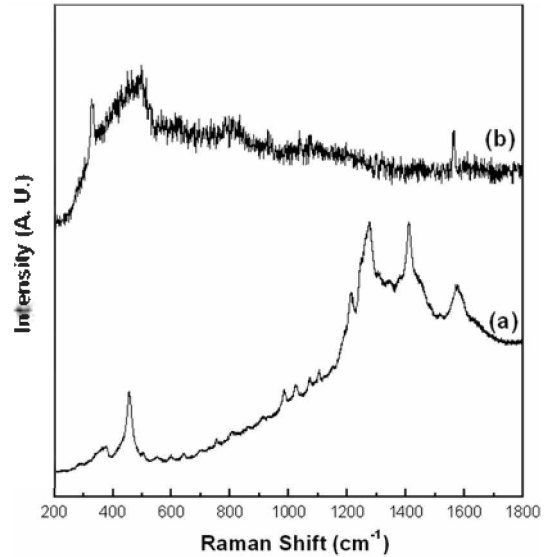


Fig. 6. The SERS spectrum of (a)  $10^{-4}$  doxorubicin and the UV-RRS spectrum of (b)  $10^{-4}$  M adenine with excitation wavelength 514, 257 nm respectively.

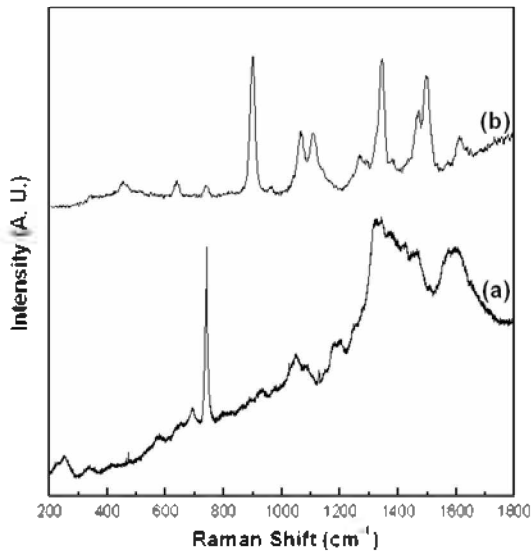


Fig. 5. The SERS spectrum of (a) SERS (b) UV-RRS spectrum of  $10^{-3}$  M adenine with an excitation wavelength of 514 and 257 nm respectively.

를 바탕으로 UV-RRS 스펙트럼을 이용하여 독소루비신-아데닌 혼합용액을 측정할 경우 독소루비신 분자에 의한 영향은 거의 배제할 수 있음을 알 수 있다. 이와 같은 사실을 알아보기 위해 아데닌과 독소루비신 분자의 SERS 및 UV-RRS 스펙트럼을 비교

하여 각각 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다. 아데닌 분자의 경우 SERS 스펙트럼 보다는 UV-RRS 스펙트럼의 진동모드에 대한 흡수 띠가 훨씬 더 세밀하게 관찰되고 있음을 알 수 있으며 독소루비신 분자의 경우에는 이와 반대로 SERS 스펙트럼에서 진동모드에 대한 특성 라만 띠가 세밀하게 관찰되고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 Fig. 4의 UV-Visible 흡수 스펙트럼에서 알 수 있듯이 아데닌 분자의 경우에는 자외선 여기파장을 이용한 UV-RRS 관측이 유리하고 독소루비신 분자의 경우에는 가시광선 영역의 여기파장을 이용한 SERS 관측이 유리하다는 사실을 뒷받침하는 결과로 볼 수 있다.

#### 아데닌과 독소루비신 분자의 상호작용 관찰

아데닌과 독소루비신 분자의 상호작용을 알아보기 위하여 순수한 고체 시료상태의 아데닌 분자를 이용하여 측정한 FT-Raman 스펙트럼과 아데닌 및 아데닌-독소루비신 혼합용액의 UV-RRS 스펙트럼을 Fig. 7에 각각 나타내었다. 또한, 아데닌 분자의 특성 라만 띠의 분석 결과를 Table 1에 나타내었다. 먼저 Fig. 7의 (b)의  $1345\text{ cm}^{-1}$ 의 라만 띠는 아데닌 분자의 N7C5 그리고 C8N7의 진동모드에 의한 특성 라만 띠이다. 이 라만 띠가 혼합용액의 경우  $1348\text{ cm}^{-1}$ 로 단

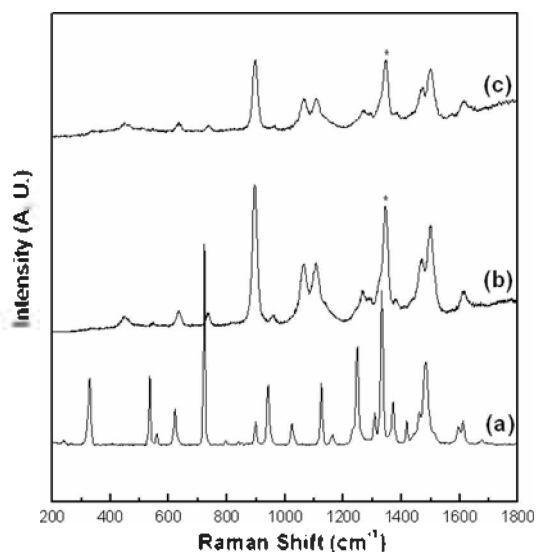


Fig. 7. FT-Raman spectrum of solid (a) adenine and UV-RRS spectra of (b)  $10^{-3}$  M adenine, (c) mixing solution of  $10^{-3}$  M adenine and  $10^{-4}$  M of doxorubicin.

파장 이동(blue shift)으로 이동한 것은 독소루비신 분자와 아데닌 분자의 상호작용에 의한 것으로 수소결합이나 쿨롱계이선의 경우 장파장 이동이 보통이나

본 연구에서 단파장 이동이 일어난 것은 아데닌 분자의 N7 위치에 독소루비신 분자의 고리 부분의 하이드록실 그룹과 카르보닐 그룹의 정전기적 상호작용에 의한 전기음성도 효과에 의한 결과라 판단된다.<sup>17</sup> 또한 이것은 독소루비신 분자가 아데닌 분자의  $\delta$ -NH<sub>2</sub> 진동 모드에 영향을 준다. 즉, 아데닌 분자가 독소루비신 분자와 상호작용하기 전에는 아데닌 분자의 ( $\delta$ NH<sub>2</sub>-C5C6 - C6N6)에 해당하는 특성 라만 띠가  $1618\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타났으나 상호작용 일어난 후에는 아데닌 분자 주위에 다소 덩치가 큰 독소루비신 분자가 접근함으로써 아데닌 분자의  $\delta$ -NH<sub>2</sub> 진동이 자유롭지 못한 영향을 줌으로써  $1613\text{ cm}^{-1}$ 로 장파장(red shift) 이동이 일어난 것으로 판단된다.

## 결론

본 연구에서는 아데닌 분자와 독소루비신 분자를 이용하여 UV-RRS와 SERS 스펙트럼을 비교 분석하여 아래의 결과를 도출하였다. 첫째 각 물질의 UV-Visible 스펙트럼을 관측해 본 결과 아데닌 분자와 독소루비신 분자를 혼합할 경우 UV-RRS 스펙트럼에서 독소루비신 분자의 영향을 배제하고 아데닌 분자

Table 1. Band assignments of the FT-Raman spectra in Fig. 7.

FT-Raman (Adenine)	UV-RRS (Adenine)	UV-RRS (Adenine+Doxorubicin)	Assignment
328	448	447	N1C6N6(23); C5C6N6(23); N7C5C6(17); C6C5(14)
535	546	---	N1C6C5(15); N1C6N6(13); N3C4N9(13); C4N3(10); C4N9(7); C4N3C2(7)
621	632	634	C4N9(15); C6C5C4(9); N3C4C5(9); C6N6(8); C6C5(7); C8N7C5(7); N3C2N1(5); N3C4N9(5)
722	736	734	C4N3(24); C6N6(15); C2N1C6(12); N7C5(7); C5C4(7)
899	895	898	N7C5(13); C4N9(11); C6N6-H(16); C8N7(7); N9C8-H(6); N7C8-H(6); N3C2N1(6); H-N9C8(5); C2N1C6(5)
942	962	965	N9C8(27); H-N9C4(13); C4N9C8(8); N9C8N7(7)
1024	1066	1062	H-N9C8(25); H-N9C4(21); C8N7(13); N7C8-H(6); N3C2(5)
1125	1105	1105	H-N9C4(22); H-N9C8(21); C6N6(20); N9C8(9)
1248	1267	1267	N1C6(25); C6N6(10); N9C8-H(9); N7C8-H(8); N3C2-H(8); C8N7(6)
1333	1345	1348	C8N7(12); C6N6(9); C2N1C6(8); N3C2-H(8); N7C5(7); N9C8(6); C4N3C2(6); N3C2N2(6)
1483	1497	1498	C4N9(16); C6C5(13); C8N7(12); N7C5(12); N3C2(11); C4N3(7); C2N1(6)
1612	1618	1613	C6C5(24); N7C5(10); C4N9(10); C4N3(9); N3C4C5(7); N7C5C4(6); H-N-H(6); C6C5C4(5); N9C4C5(5)

의 관점에서 상호작용하는 것을 관측할 수 있다는 사실을 확인하였다. 둘째 UV-RRS를 통하여 아데닌 분자와 독소루비신 분자의 혼합용액을 제조하여 상호작용을 분석한 결과 아데닌 분자의 N7번 위치에 독소루비신 분자의 작용 가능성을 확인할 수 있었다.

본 연구는 국립상주대학교의 지원에 의해 수행되었기에 깊은 감사를 드립니다.

### 인용문헌

1. Asher, S. *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 59.
2. Asher, S. *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 201.
3. Myer, A. B. *Acc. Chem. Res.*, **1997**, *30*, 519.
4. R. K. Chang and T. E. Furtak, Eds., *Surface Enhanced Raman Scattering*, Plenum, New York, U.S.A., **1982**.
5. M. Moskovits and J. S. Suh, *J. Phys. Chem.*, **1984**, *88*, 1293.
6. Suh, J. S. and K. H. Michaelian, *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 598.
7. Jarvis, R. M.; Goodacre, R. *FEMS Microbiology Letters*, **2004**, *232*, 127.
8. Toyama, A.; Takeuchi, H.; Harada, I. *J. Mol. Struct.* **1991**, *242*, 87.
9. Tomkova, A.; Miskovsky, P.; Chinsky, L.; Turpin, P. Y. *J. Mol. Struct.* **1995**, *344*, 11.
10. Jones, C. M.; Naim, T. A.; Ludwig, M.; Murtaugh, J.; Flaugh, P. L.; Dudik, J. M.; Johnson, C. R.; Asher, S. A. *Anal. Chem.*, **1985**, *4*, 75.
11. Fornari, F.A.; Randolph, J.K.; Yalowich, J.C.; Ritke, M.K.; Gewirtz, D.A. *Molecular Pharmacology*, **1994**, *45*, 649.
12. Momparler, R.L.; Karon, M.; Siegel, S.E.; Avila, F. *Cancer Research*, **1976**, *36*, 2891.
13. Lee, C. J.; Kang, J. S.; Kim, M. S.; Lee, K. P.; Lee, M. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 1211.
14. Aroca, R.; Bujalski, R. *vib. spectrosc.* **1999**, *19*, 11.
15. Savoie, R.; Jutier, J. J.; Prizant, L.; Beauchamp, A. L. *Spectrochim. Acta.* **1982**, *38A*, 561.
16. Dhaouadi, Z.; Ghomi, M.; Austin, J. C.; Girling, R. B.; Hester, R. E.; Mojzes, P.; Chinsky, L. Turpin, P. Y.; Oulombeau, C.; Jobic, H.; Tomkinson, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 1074.
17. Fodor, S. P. A.; Rava, R. P.; Hays, T. R.; Spiro, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1520.