

Purple Membrane과 Red Membrane에서 마취제에 의한 분광학적 측정

김기준[†] · 정형학 · 김주한 · 송희준

대진대학교 공과대학 화학공학과
(2018년 4월 27일 접수: 2018년 5월 25일 수정: 2018년 6월 8일 채택)

Measurement of Photospectroscopies by Anesthetics in Purple Membrane and Red Membrane

Kim Ki-Jun[†] · Jeong Hyeon-gihak · Kim Juhan · Song Hui-jun

*Dept. of Chemical Engineering, Dae-jin University
Pocheon 487-711, Korea*

(Received April 27, 2018; Revised May 25, 2018; Accepted June 8, 2018)

요약 : 전신마취제의 잉여 몰부피는 Halobacterium Halobium에서 추출분리된 Purple membrane과 Red membrane에서 vesicle의 현탁액에서 25°C 잉여부피 dilatometer로 측정되었다. 우리의 연구에 의해 전신마취제인 Propofol은 잉여몰부피와 상관 관계가 있는 것으로 밝혔다. Halobacterium Halobium에서 비중 차이에 의해 추출 분리된 Purple membrane과 Red membrane의 잉여몰 부피는 vesicle의 아미노산과 지질의 영향이다. 이들은 잉여 몰부피 dilatometer로 잉여 몰 부피를 측정되었으며, 흡광세기는 280 nm 330 nm 에서 연구되었다. Purple membrane과 Red membrane이 Propofol에 의한 입자크기 분석, 상대적 혼탁도가 기계적 특성을 위해 연구되었다. 확산 교환에 의한 점성 중합체 용액의 입자 크기 분석은 측정에 의한 중요한 단계이다. Propofol이 vesicle에서 재구성된 시료들 중에서, 특히 PM+RM+Propofol의 잉여 몰 부피가 PM, RM의 잉여 몰 부피보다 가장 크게 측정되었다.

주제어 : 전신마취제, 잉여몰부피, 딜라토미터, 퍼플 막, 붉은 막

Abstract : The excess molar volumes of a general anesthetics on Purple membrane and Red membrane separated by extraction in Halobacterium Halobium and in suspensions of vesicle have been determined at 25 °C, it was used a excess volume dilatometer. The anesthesia characteristics of general anesthetics, Propofol was fined by our study to correlate with excess molar volume. Excess volume changes of the vesicle measured by excess volume dilatometer, which is an important amino acid and lipid in the purple membrane and red membrane by means of specific weight in Halobacterium Halobium, were studied by absorption intensity at 280 nm and 330 nm.

[†]Corresponding author
(E-mail: kjkim@daejin.ac.kr)

The particle size analysis and relative turbidity of Purple membrane and Red membrane by means of Propofol were measured for mechanical properties. In the samples where Propofol is incorporated in vesicle, especially, the excess molar volume of PM + RM + Propofol is the greatest than the excess molar volumes of PM, and RM.

Keywords : general anesthetics, excess molar volume, dilatometer, purple membrane, red membrane

1. 서론

중추신경의 기능을 억제하여 의식과 전신적인 지각을 상실하게 하는 전신 마취제(general anesthetics)는 지각상실이나 의식소실 또는 근육이완(muscle relaxation) 등 이른바 마취상태를 일으키게 하는 약이며, 말초신경에 작용하는 국소마취제와 대응하는 말이다. 전신마취제는 여러 경로로 투여할 수 있는데, 유효용량 및 작용시간의 경과를 예측하기가 용이한 정맥 및 흡입 투여방법이 많이 이용되고 있다. 전신마취의 목적은 외과수술에 수반하는 고통을 없애기 위한 것이다. 아픔을 느끼지 않을 정도의 마취를 하면 의식이 소실된다. 의식을 없게 한다는 것은 2차적으로 나타나는 효과로서, 수술에 대한 공포심을 느끼지 않는 장점이 있다. 그러나 전신마취제는 전신적으로 사용이 허가된 약물 중 약물의 안전성이 가장 좁기 때문에 위험성이 큰 약물이다. 따라서 마취제의 용량과 마취심도를 정확하게 결정하고 평가하는 것이 매우 중요하다.

따라서 요즘 전신 마취제로 많이 사용되는 propofol을 자체 배양한 Halobacterium Halobium(HH) 안에서 잉여 부피 변화를 측정하였다.

전신마취로서 많이 이용되는 방법 중 하나인 흡입마취제는 특수한 장치에 의해 흡입되어, 폐포를 거쳐 혈액 속으로 들어가고, 혈행(blood flow)을 매개로 전신을 돌아 중추신경에 이른다. 흡입마취제의 특성은 다음과 같다. 마취 작용의 발현 시간이 빠르고 마취기간의 조절이 용이하다. 또한 마취의 상황이 쉽게 판단되고 그 조절이 용이하며 환자에게 투여하기 쉽다. 그리고 여러 작용기관에서 생리적인 변화가 없으며, 불활성이기에 생체 내에서 대사되지 않는다. 마취제 자체가 대사물이 인체에 독성이 없고 투여 할 때 안전범위가 넓다. 근육이완 작용이 양호하며 진통효과가

크나, 기억상실의 효과가 발생할 수 있다.

또한 전신 마취제로서 가장 많이 활용되고 있는 방법은 초간편 시효성 정맥마취제(veins anesthetics)로 강력한 마약성 진통제와 특별한 근육 이완제의 개발 적용에 의해 다음 특성을 충족시켜 줄 수 있으며, 정맥제제와 병용시킴으로써 흡입마취제의 용량을 줄일 수 있으며, 안전성 또한 크게 문제가 되지 않는다. 그러나 부작용이 발생시 전신마취제 선택에 가장 중요한 인자가 되고 있다.

정맥마취제의 경우는 흡입마취제와 같은 특수한 장치가 필요하지 않고, 정맥주사만으로 환자는 급속히 수면상태로 들어가므로 주의를 한다면 단 시간에 수술에 이용할 수 있는 이점이 있다. 전신마취와 외과적 수술에 있어서는 수면, 진통, 근이완과 내장반사를 조절하기 위해 작용기전이 다른 몇 가지 정맥마취제를 투여할 필요가 있다.

따라서 정맥마취제를 사용함으로써 용통성을 증가시킬 수 있으며 흡입성 마취제의 용량을 줄일 수 있다. 마취를 신속하게 유도하고자 할 때에 적용된다. 그러나 흡입마취에 비해 마취의 심도 조절이 어려우므로 아산화질소(nitrous oxide, N₂O) 마취에 병용하는 등 보조적 용도로 많이 사용된다. 마취제의 효과는 대뇌부터 시작하여 다음에 간뇌, 중뇌를 거쳐 척수에 이른다. 연수(medulla oblongata)가 마비되는 경우가 발생하기도 한다. 1기는 무통기로 신체내부의 아픔을 느끼는 감각은 없어지지만, 의식이 완전히 없어지는 않는다. 다음 2기는 발양기(rising times)로 의식이 없어지고 자제심이 없어지는 과정이며, 3기는 외과적 마취기(operation times)로 의식이 완전히 없어지고, 사지나 복벽의 근육은 이완되고 수술에 방해가 되는 여러 가지 반사도 마취가 깊어짐에 따라 조금씩 없어진다. 수술에 적합한 시기지만 그대로 마취제의 흡수가 계속되면 위험한 증상이 나타난다. 부작용 기전이 발생하는 시기는

연수 마비기 또는 증독기로 호흡마비와 혈압강하가 나타나기에 마취제의 흡입을 중지하거나 흡입된 양을 희석시키고 인공호흡을 병행해야 한다.

최근에 세포내에서 전신마취제의 작용에 대한 관심이 높아지고 있으며, 생물학적 거대 분자가 생리적으로 수용액에서 활성적이고 지질-전신마취제 상호작용은 살아 있는 세포내에서 마취제 작용에 대한 부피변화를 이해하는데 필요하다 [1,2]. 지질은 중성지질, 납, 인지질 및 스테롤 등을 포함하고 있으며 생체안에서 영양분의 저장물질 또는 세포의 구성 성분으로 알려져 있다. 특히 인지질은 생체막의 주요 성분으로 막의 용질 투과성에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 지질은 수용액에서 Zwitterions으로 존재하고, 부피 변화는 전해질의 경우와 같이 지질과 전신마취제가 구조적 상호작용을 하여 나타난다[3,4].

전신마취제가 지질막에서 작용하는 부분의 생리적 작용과 특성은 잘 알려져 있지 않지만, Miller 등이 dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPC) 등의 지질에서 정량적으로 부피변화를 식 1에 의하여 제안하였다[5]. 전신마취제가 작용하는 순수한 분을 팽창 E 는 다음과 같다.

$$E = \frac{V_2 \cdot X_2 \cdot P_2}{V_m} - \beta (P_t - 1) \dots \dots (1)$$

위 식에서 V_2 는 전신마취제가 작용하는 부분에서 전신마취제의 분몰 부피이고, X_2 는 1기압 하에서 몰 분용 용해도 ($X_2 \ll 1$)를 의미하며, P_2 는 전신마취제가 작용하는 부분의 부분압력을 나타낸다. 또한 V_m 는 몰 부피이고, β 는 등온 압축율이며, P_t 는 전체 압력을 의미한다.

본 연구에서 사용한 Halobacterium Halobium은 고농도의 염 용액에서 자라는 진핵 세포로서 미생물로부터 배양한 후 purple membrane(PM)과 red membrane(RM)을 분리하였다[5,6]. Purple membrane에 빛을 쬐어주면 광순환 회로를 돌게 되며, proton이 pumping되고, pH가 중성으로 변화된다. PM, RM의 시료들을 교반 초음파 처리하여 입자크기를 측정하였고, 이들 vesicle의 경우에 연속적으로 빛을 쬐어주면 proton의 이동방향은 vesicle의 내부에서 외부로 이동한다[7,8]. 전신마취제에 대한 부피 변화는 excess volume dilatometer로 측정하여 각 성분물질의 소수성 부분과 친수성 부분의 차이에 의해 유발되는 부피 변화의 영향을 측정한 결과 전신마취제에 의한

propofol의 excess molar volume을 Duncan Dilatometer로서 측정한 결과, PM과 RM에서 PM의 excess molar volume가 RM의 excess molar volume 보다 크게 측정되었다.

2. 기기 및 실험 방법

자외선 및 가시광선 분광 광도계는 Varian 회사 제품의 Model Cary-17D를 사용하였으며, 30k 초음파기기, ultracentrifuger는 Beckman사 제품을 사용하였다. Beckman 온도계와 스위치가 부착된 항온조는 VWR Scientific사의 제품을 사용하였으며, 입자크기 분석은 Sedigraph 5000(model BI-DCP)을 이용하여 측정하였으며, Duncan dilatometer, 흡광분광분광기를 사용하였다. 전신마취제인 propofol은 미국의 제약회사인 Watson Pharmaceuticals Aldrich사에서 구입하였고, tris-base 등은 Sigma chemical사에서 구입했으며, pepton(Bacteriological Technical Bactor Agar)은 Difco Lab. 에서 구입하였다. 실험에서 사용한 dilatometer는 Duncan과 Sheridan[6]의 dilatometer를 이용하였다. Vesicle이 형성된 직접적인 확인은 300nm의 파장에서 turbidity로 확인하였다. 전신마취제인 propofol은 일정한 농도로 맞추어 PM, RM, PM + RM 매질에 혼합하여 초음파 처리하였다.

Vesicles은 일정한 양의 완충용액과 시료를 교반한 후에 초음파 처리한 다음 부피 변화를 측정하였다. 배지는 고온 고압하에서 배지 1 l 당 150 ml의 접종액으로 접종하였으며, 온도는 39 °C로 유지하였고 150 rpm으로 회전시켜 가면서 항온하에서 인큐베이터에 5일 동안 키운 후에 원심분리하였다[7].

완숙한 박테리아는 15분간 원심분리한 후 침전물을 기본 염용액에 넣고 0.1M NaCl 3 l속에서 24시간 투석시켰다. 최종 침전물은 5 ml 탈이온 증류수에 넣고, 원심분리병 바닥에 60 % 설탕용액 1 ml를 넣은 후, 그 위에 30 ~ 50 % 까지 농도 범위에서 원심분리 하였다. 따라서 DNA가 방출된 빨간 자주빛 침전물을 그 위에 붓고 15°C에서 원심분리 하면 PM은 평형에 도달하게 된다. 자주빛 띠(purple membrane, PM)와 바로 위에 빨강 띠(red membrane, RM)가 생기는데 이것은 RM의 밀도가 1.16 g/cm³ 이고, PM의 밀도가 1.18 g/cm³으로 분별 원심분리법에 의하여 RM을 PM으로 부터

분리하였다. 500 mg의 키토산을 pH 7.5, 0.01 M 인산 완충용액 혹은 트리스 완충용액 10 ml에 넣고 vortexing한 후에 초음파 처리를 3분 간격으로 4번 반복하였다. 온도는 0 °C를 유지하고 초음파 처리 중에 용액에 질소를 불어 넣어 주었다[8]. 이에 따른 배지액에서 배양한 HH을 위한 조성물은 Table 1과 같으며, HH에서 PM과 RM을 분리한 공정은 다음 Fig. 1과 같다.

측정값을 이용하여 다음 식으로 excess molar volume을 측정하였다.

$$\bar{V}^E = \frac{n_3}{A + 1} (-\bar{V}_3^E + \bar{V}_4^E) \dots \dots \dots (2)$$

\bar{V}^E 와 n_3 로 부터 다음 식으로 유도된다.

$$\bar{V}_4^E = \frac{\bar{V}^E (A + 1)}{n_3} + \bar{V}_3^E \dots \dots \dots (3)$$

3. 결과 및 고찰

HH에 의해서 재구성된 여러 vesicle은 Sepharose 4B column을 통과시키면, 평균 크기가 250 Å 정도의 작은 unilamella 구조에 가까운 bilayer lipid vesicle을 비중차이에 분리한 PM과 RM에서 propofol을 혼합한 시료의 스펙트럼은 Fig. 1과 같다. 자외선 및 가시광선에서 얻은 PM의 흡수 스펙트럼 Fig. 1에 의해서 농도가 7.4×10^{-5} M 임을 알았다. 25 °C 에서 측정된 각 용매들에서 Propofol의 농도에 따른 excess molar volume 변화는 Table I와 같다. Fig. 1에서 Propofol을 지질에 첨가함에 따라 약간 장파장 이동을 볼 수 있는데, 이는 지질에 항우울제가 첨가됨에 따라 Propofol의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 전자 전이가 비극성 용매 효과에 의해 에너지 준위차가 감소하여 발생하는 현상이다[9]. PM에서 5×10^{-5} mol Propofol의 excess molar volume은 3회 반복 측정된 평균값은 1.87 mL/mol 이었으며, Propofol의 몰 부피는 103.83 mL/mol이다. 이 값은 Miller 등이 측정하여 얻은 값들과 비교할 때 거의 유사하였다[12]. Table 1.에서 Propofol + PM + RM의 excess molar volume이 가장 크게 나타났다.

Fig. 2는 각 시료를 vortexing한 후에 입자 크기를 Halobacterium Halobium에서 비중차이에 의해 추출 분리된, (a) PM, (c) RM에 관해 측정된

결과 PM의 흡광세기가 크게 나타났다. 이는 지질과 단백질이 혼재되어 비중이 크기 때문에 흡광도 세기가 크게 나타난 결과로 생각된다.

Fig. 3은 각 시료를 vortexing한 후에 relative turbidity를 측정된 결과 (a) PM, (b) RM로서 PM의 상대적 혼탁도가 크게 나타났다.

Fig. 4는 각 시료를 vortexing한 후에 흡광도 세기를 (a) PM, (b) RM, (c) PM + RM + Propofol에 관해 측정된 결과, $a < b < c$ 순으로 크기가 크게 나타났다. 이는 전신 마취제가 지질에 작용함에 따라 (c)흡광도가 가장 크게 측정된 결과이다.

Table 1. Composition of medium per 1,000 mL for shaker culture, pH was adjusted to 7.0.

NaCl	250.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0 g
KCl	2.0 g
CaCl ₂	0.2 g
Bacteriological Peptone	10.0 g
MnSO ₄	3.0 mg
FeCl ₂	23.0 mg
ZnSO ₄	4.4 mg
CuSO ₄	50.0 mg

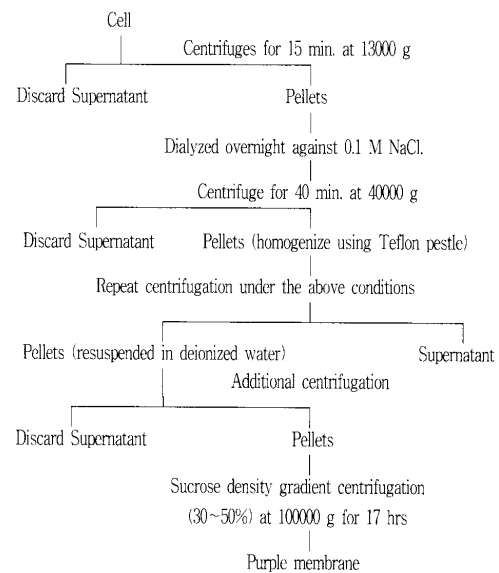


Fig. 1. Flow diagram for separation of PM and RM in Halobacterium Halobium.

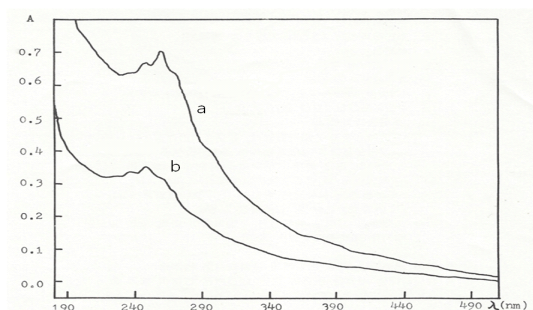


Fig. 2. Photometer spectra of PM(a) and RM(b) separated from HH.

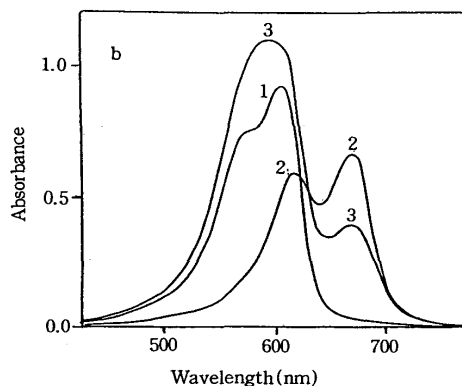


Fig. 4. Absorbance spectra of PM(1), RM(2), and PM + RM + Propofol(3).

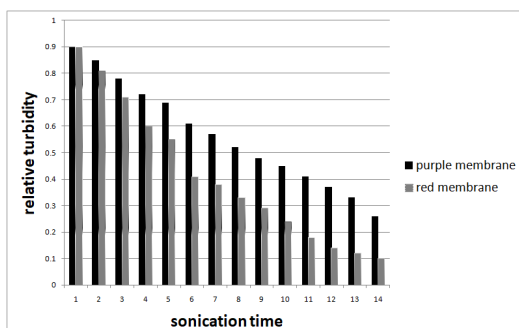


Fig. 3. Relative turbidity versus sonication times of PM(■) and RM(■) separated from HH.

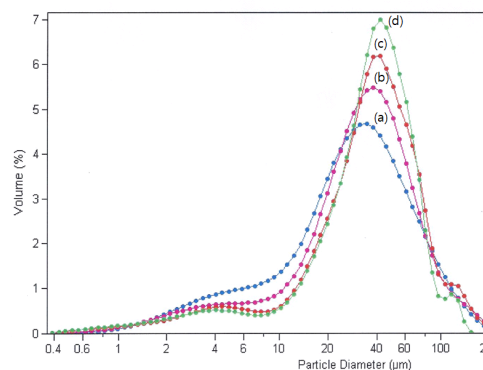


Fig. 5. The particle size analysis : (a) RM, (b) RM + propofol, (c) PM, (d) PM + propofol.

Table 2. Comparison of excess molar volume changes for propofol by means of PM and RM at 25°C

Purple Membrane		Red Membrane		Purple Membrane + Red Membrane + Propofol	
\overline{V}^E (ml/mol)	\overline{n}_3 (mol)	\overline{V}^E (ml/mol)	\overline{n}_3 (mol)	\overline{V}^E (ml/mol)	\overline{n}_3 (mol)
6.8×10^{-6}	1.0×10^{-5}	5.1×10^{-6}	1.0×10^{-5}	7.7×10^{-6}	1.0×10^{-5}
7.3×10^{-6}	1.0×10^{-4}	5.6×10^{-5}	1.0×10^{-4}	9.4×10^{-5}	1.0×10^{-4}
8.95×10^{-6}	1.0×10^{-3}	7.72×10^{-4}	1.0×10^{-3}	1.81×10^{-4}	1.0×10^{-3}

전신마취제로 작용하는 Propofol은 지질의 머리부분 근처에서 작용하는 것으로 알려져 있는데, Propofol과 vesicle은 지질의 소수성 영역으로 침투하고, 친수성 부분은 지질의 머리 부분인 아실기에 수소 결합을 한다[10]. 따라서 25 °C에서 측정된 각 용매들에서 $RM < PM < RM + PM + Propofol$ 의 농도에 따른 잉여 몰 부피 변화에서 전신마취제는 전체적으로 부피변화 폭이 커짐을 알 수 있었다(Table 2). Propofol은 전신 마취제로 비극성 물질이므로 아실기를 가진 머리 부분에서 반발력이 작용하고, 소수성 영역으로 투과가 잘 되어 부피 변화가 크게 나타난 것으로 생각된다.

Fig. 5는 에서 입자 크기 측정 결과로서 $RM < RM + propofol < PM < PM + propofol$ 순으로 입자크기가 나타났다.

Fendler는 Propofol의 영향이 막 두께에 변화를 주지 않지만 PM은 RM보다 막 두께를 약간 증가시키는 효과가 있음을 발표하였고[11], Propofol에 대하여 양의 excess molar volume을 나타내었다. 이 효과는 용액 부피가 용매와 용질 부피의 합보다 적기 때문에 생기는 electrostriction현상이며 [12], 이는 전기장하에서 전신 마취제 자체를 극성인 물 분자가 둘러싸는 현상을 의미한다. 또한 Propofol은 여러 종류의 지질을 포함하는 혼합물로써 2중, 3중 결합의 지질들은 cis - trans 형태로 꼬여 있어 packing이 잘 안되며, 소수성이 작아 부피 변화가 감소한 결과라고 생각한다. 극성물질과 비극성 물질의 원형질 막에 대한 투과는 극성인 물질이 결합을 형성하는 한쪽 음이온에 편재하여 분자가 쌍극자로 작용하며 머리 부분에 배열한 것으로 사료된다. 이는 Miller의 부피 변화를 측정된 결과와 본 실험과도 잘 일치하고 있으며, 마취제에 의한 excess molar volume의 부피증가 작용은 지질의 소수성 영역에 따른 신경전달 물질의 차단성과 상호관련이 있음을 확인한 것이다.

4. 결론

1. 전신마취제인 Propofol이 재구성된 양이 많을수록 흡광도가 큼을 알 수 있었다.
2. Propofol이 vesicle에 재구성된 시료에서 PM의 excess molar volume이 RM의 excess molar volume보다 크게 측정되었으며, $PM + RM + Propofol$ 경우 가장 크게 측정되었다.

3. Vesicle에 흡광도 세기는 $RM, PM, RM + PM + Propofol$ 순으로 크게 나타났다.
4. Relative turbidity는 PM가 RM보다 크게 나타났다.

References

1. K. J. Kim, K. C. Sung, H. S. Lee. "J. Korean Eng. Chem". Vol. 11 No. 1, pp. 24-28, (2000)
2. Miller, K. W., Hammond, L. and Porter, E. G, "Chem. Phys. Lipids" Vol. 20, pp. 229-241, (1977)
3. Simon, S. A., McIntosh, T. J., Bennett, P. B. and Shrivastav, B. B. Mol. Pharmacol. No. 16, pp. 163-170, (1979)
4. Colley, C. M. and Metcalfe, J. C. "FEBS Lett". Vol24, pp. 241-246, (1972)
5. Smith, R. A., Porter, E. G. and Miller, K. W. : "Biochim. Biophys. Acta" vol. 645, pp. 327-338, (1981)
6. Franks, N. P and Leib, W. R. "Nature" Vol. 274, pp. 339, (1967)
7. Battino, R. "Chem. Rev". Vol. 71, pp. 5-45, (1971)
8. Pflug, H. D. and Benson, G. C. "Can. J. Chem". Vol. 46, 287-294, (1968)
9. Duncan, W. A., Sheridan, J. P. and Swinto, J. L. "Trans. Faraday Soc.", Vol. 61, pp. 421, (1965)
10. Steeckenius, W., Rowen, R. "J. Cell Biol". Vol. 34, pp. 337-357, (1967)
11. Mullins, L. J. "Chem. Rev". Vol. 54, pp. 289-323, (1964)
12. Haydon, D. A., Hendry, B. M., Lerinson, S. R. "Biochim Biophys. Acta", Vol. 470, pp. 17-34, (1977)