

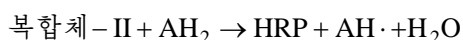
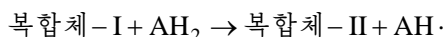
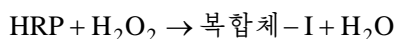
모형페록시다제로서 헤모글로빈을 리용한 o-페닐렌디아민의 산화반응에서 반응중간체에 대한 연구

리해성, 편정민, 김명호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《기초과학을 발전시키지 않고서는 인민경제 여러 부문에서 나서는 과학기술적문제를 원만히 풀어나갈수 없습니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 138페이지)

고추냉이페록시다제(HRP)는 몇차례의 중간단계를 걸쳐 반응을 촉진한다.[10]



위의 반응식에서 AH_2 는 o-페닐렌디아민과 같은 페록시다제의 기질이다.

페록시다제에 의한 촉매반응때 형성되는 복합체-I은 포르피린고리의 철이 π -양이온 라디칼과 약하게 스핀쌍을 이룬 상태로서 1전자환원에 의하여 복합체-II로 변화된다.[1]

복합체-II는 자체가 환원되면서 기질을 산화시키는 방법으로 초기상태(Fe^{3+})로 돌아온다.[4, 11]

최근 헤모글로빈이 페록시다제처럼 매개 아단위에 헴[2]을 포함하고있는것으로 하여 o-페닐렌디아민의 산화반응을 촉진한다는것과 반응과정에 복합체-I, -II뿐아니라 그것들과 다른 중간체($\lambda_{710\text{nm}}$)가 생성된다는것을 발견[7]하였으나 그 존재시간이 대단히 짧은것으로 하여 그 물질의 구조와 안정성, 최종산물과의 관계 등에 대해서는 밝히지 못하였다.

재료와 방법

재료 시약으로는 헤모글로빈(Hb, 《Sigma》), 고추냉이페록시다제(HRP, 《Sigma》), 피로갈롤(《Sigma》), o-페닐렌디아민(OPDA, 《Sigma》), 디아미노페나진(DAPN, 《Sigma》), 디히드로페나진(DHPN, 《Sigma》), n-부타놀(《Sigma》)을 리용하였다. H_2O_2 은 30% 용액(KMnO_4 으로 적정하여 규정한것)을 리용하였다.

실험기구로는 흐름-정지분광광도계(《SEF-12》), 고성능액체크로마토-질량스펙트르 분석기(《IOQHPLC-S》), 적외선분광기(《NEXUS 470》), 자동원소분석기(《Fenba 1106》), 《B-185》형 항온기(《Shimadzu》), pH미터(《420A》)를 리용하였다.

방법 Hb의 페록시다제촉매반응은 $1.0 \cdot 10^{-4}$ mol/L의 H_2O_2 과 $4.6 \cdot 10^{-3}$ mol/L의 OPDA가 들어있는 0.2mol/L의 레몬산완충액(pH 5.0) 3mL를 시험관에 넣고 항온조(25°C)에서 20min 동안 평형화시킨 다음 거기에 Hb용액을 첨가하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) 분석결과

반응물질들의 자외-가시선흡수스펙트르특성 반응에 참가하는 매개 물질들(OPDA, H_2O_2 , Hb, DAPN)의 자외-가시선흡수스펙트르를 측정한 결과는 그림 1과 같다.

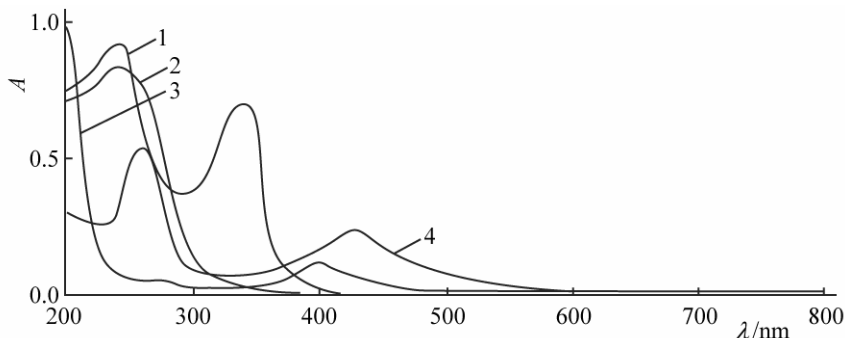


그림 1. 반응에 참가하는 물질들의 자외-가시선흡수스펙트르

1-OPDA, 2- H_2O_2 , 3-Hb, 4-DAPN, $[Hb]=2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,

$[OPDA]=4.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, $[H_2O_2]=10^{-4} \text{ mol/L}$

그림 1에서 보는바와 같이 OPDA와 H_2O_2 의 흡수극대는 파장 200~330nm에서 나타났다. 해당 농도에서 Hb는 파장 398nm, DAPN은 파장 259nm와 430nm에서 각각 나타났다.

반응진행중 용액의 자외-가시선흡수스펙트르변화 다음 반응과정에 용액의 자외-가시선흡수스펙트르변화를 측정하기 위하여 흐름-정지분광광도계를 리용하여 빠른 시간에 변화되는 흡수스펙트르특성을 연구하였다.(그림 2)

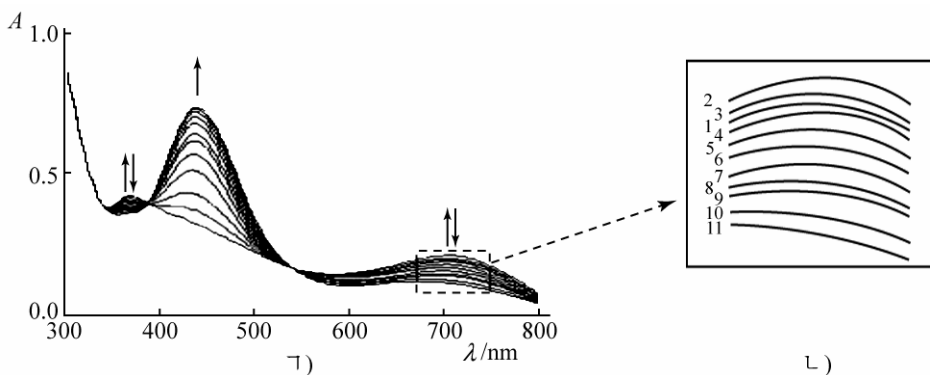


그림 2. 반응중 자외-가시선흡수스펙트르변화특성

ㄱ) 곡선 1-11은 시간(1, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 그리고 200s)에 따르는 반응물의 흡수스펙트르변화, L) 파장 710nm 부근에서의 흡수특성을 4배 확장한것

그림 2에서 보는바와 같이 반응이 시작되자마자 파장 710nm와 375nm의 극대는 급격히 증가(곡선 1-2)하다가 인차 감소(곡선 3-11)되는데 그 변화의 일치성으로 보아 이것은 하나의 물질이 자외선과 가시선구역에서 흡수극대를 나타내는것으로 보아진다. 그러나 마지막최종생성물인 OPDA의 흡수극대(λ_{430nm})는 반응시작부터 마지막까지 계속 증가되는 특성만을 보여주었다.

반응중간체($\lambda_{710\text{nm}}$, 이하 RI_{710})가 Hb와 관계되는 중간체(중간체-I, -II)인가 아니면 기질인 OPDA와 관계되는 중간체인가를 보기 위하여 리용된 반응제와 같은 농도의 Hb와 H_2O_2 그리고 HRP와 H_2O_2 을 취하고 흡수스펙트르를 측정하였다.

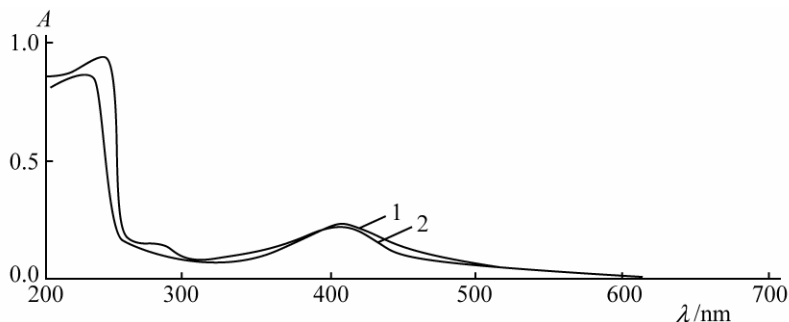


그림 3. $[\text{Hb} + \text{H}_2\text{O}_2]$ 의 자외-가시선 흡수스펙트르 특성
1-Hb + H_2O_2 , 2-HRP + H_2O_2 ; $[\text{Hb}]$ 과 $[\text{HRP}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,
 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, pH 5.0

그림 3에서 보는 것처럼 Hb + H_2O_2 뿐만 아니라 HRP + H_2O_2 반응계에서 나타나는 흡수극대는 두 경우에 다 파장 410~416nm 사이에 있었지만 파장 710nm에서의 흡수극대는 전혀 나타나지 않았다. 이와 같은 현상은 RI_{710} 이 최소한 중간체-I, -II와 같은 형태의 것이 아니라는 것을 보여준다. 이것을 비교증명하기 위하여 OPDA와 같이 페록시다제기질로 많이 쓰이고 있고 반응물립새가 비슷한 피로갈롤의 자동산화를 측정하였다. 피로갈롤은 약알카리성매질에서는 촉매인 효소가 없이도 중간산물(흡수극대가 각각 320, 620nm)을 형성하였다가 자동적으로 산화되면서 마지막산물로 전환된다.[12] 측정결과는 그림 4와 같다.

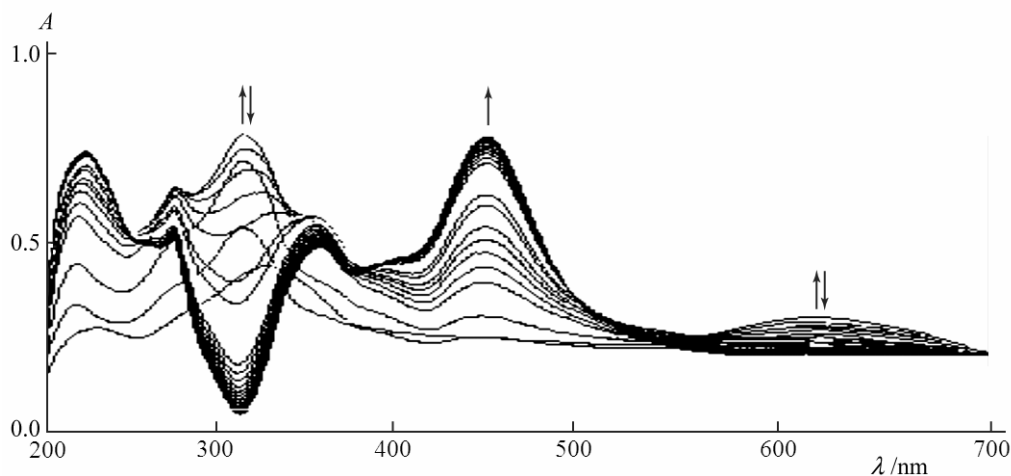


그림 4. 피로갈롤이 자동산화될 때 자외-가시선 흡수스펙트르 특성
[피로갈롤] = $4.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, pH 9.0

그림 4에서 보는 것처럼 피로갈롤의 자동산화가 진행되면 중간산물의 파장인 320nm와 620nm에서 흡수극대가 증가하다가 일정한 시간이 지나면 감소한다. 마지막산물의 흡수파장 450nm는 초기에는 서서히 증가하다가 중간산물의 흡수극대가 감소될 때 오히려 급격히 증가되었다. 그림에서 중간산물의 파장인 320nm와 620nm 변화특성은 그림 2에서 보여준

촉매제인 Hb에 의하여 진행되는 OPDA산화반응때 나타나는 스펙트르파장(375, 710nm)변화동태와 같은 류형이라는것을 쉽게 알수 있다.

이와 같은 실험결과로부터 파장 710nm에 해당하는 반응중간체는 최소한 기질인 OPDA의 변화와 관계되는 반응중간산물형태의 중간체라는것을 예측할수 있다.

RI₇₁₀의 분리 일반적으로 소수성매질에서 불안정한 물질은 친수성매질에서 안정하고 친수성매질에서 불안정한 물질은 소수성매질에서 안정하다는 사실에 근거하여 반응을 물-부타놀 2상계에서 진행하면 수용액에서 생성된 불안정한 RI₇₁₀을 비교적 안정하게 포접하여 얻을수 있다고 보고 실험하였다.

반응계는 그림 5와 같다.

먼저 10^{-4} mol/L H₂O₂, 4.6×10^{-3} mol/L OPDA와 2×10^{-6} mol/L Hb를 포함하는 완충액(0.2mL)을 시험관에 넣고 3.8mL의 *n*-부타놀을 시험관벽을 따라 주입하여 2상반응계를 형성하였다. 이때 완충액과 *n*-부타놀접촉면적은 1.8cm²였다. 반응이 시작되면 H₂O 층에서 형성된 청-록색의 RI₇₁₀은 급격히 부타놀층으로 이동하여 거기서 안정하게 존재하는것이 관찰되었다. 다음 부타놀층을 상분리하고 부타놀을 날려보내면 비커바닥에 결정형의 청-록색가루가 형성되었다. 이것을 다시 부타놀에 풀고 날려보내는 조작을 세번 반복하는 방법으로 세척하여 결정형태의 RI₇₁₀을 얻었다.

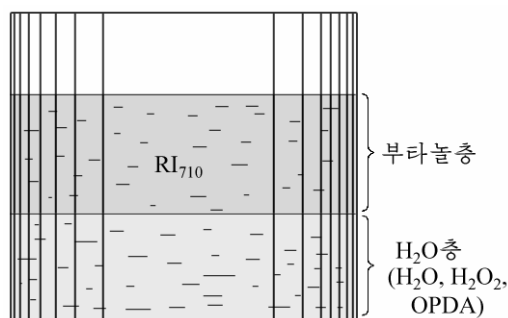


그림 5. 반응계

각이한 온도에서 RI₇₁₀의 안정성 RI₇₁₀의 안정성에 미치는 온도의 영향을 보기 위하여 정제된 RI₇₁₀을 부타놀용액에 풀고 각이한 온도에서 RI₇₁₀의 농도변화과정을 보았다.(그림 6)

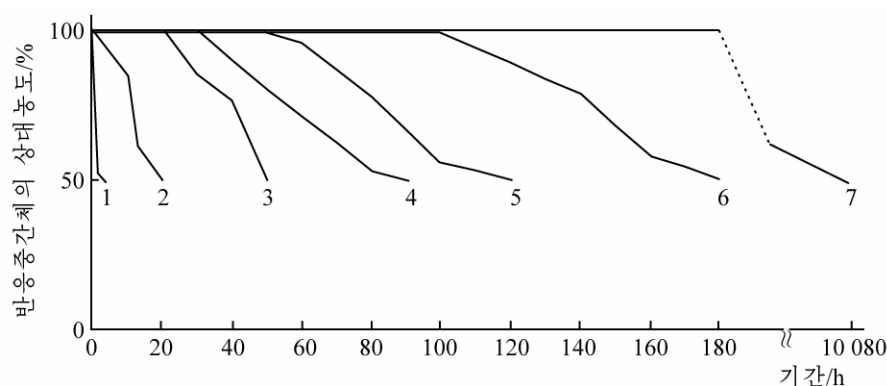


그림 6. RI₇₁₀의 안정성에 미치는 온도의 영향

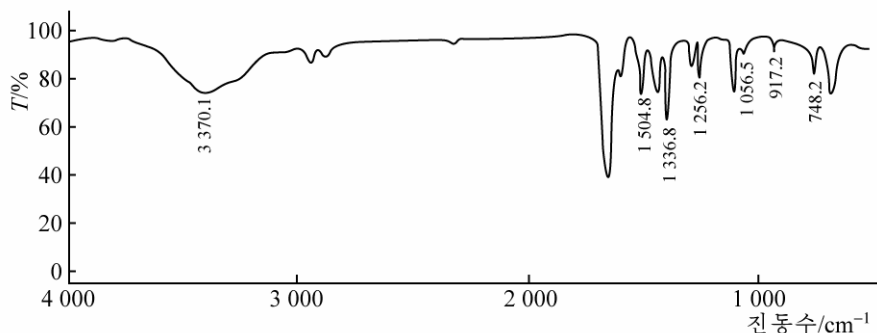
1-100°C, 2-80°C, 3-60°C, 4-40°C, 5-20°C, 6-5°C, 7--10°C;

[Hb]= 2×10^{-6} mol/L, [OPDA]= 4.6×10^{-3} mol/L, [H₂O₂]= 10^{-4} mol/L

그림 6에서 보는것처럼 온도에 따라 RI₇₁₀의 농도가 50%로 떨어지는 시간은 100°C에서 2min, 80°C에서 20min, 60°C에서 50min, 40°C에서 90min, 20°C에서 120min, 5°C에서 180min, -10°C에서 7일이였다.

RI₇₁₀의 구조결정

RI₇₁₀의 적외선흡수스펙트르특성 먼저 정제된 RI₇₁₀의 적외선흡수스펙트르를 측정하고 다른련관물질들의 적외선흡수스펙트르자료와 비교하였다.

그림 7. RI₇₁₀의 적외선흡수스펙트르

측정된 RI₇₁₀의 적외선흡수스펙트르특성값을 OPDA, DAPN, 디히드로페나진(DHPN)의 것과 비교한 결과는 표 1과 같다.

표 1. RI₇₁₀, OPDA, DAPN의 적외선흡수스펙트르특성값

화합물	C—C ^{ㄱ)} /cm ⁻¹	C—H ^{ㄴ)} /cm ⁻¹	C—H ^{ㄴ)} /cm ⁻¹	N—H ^{ㄷ)} /cm ⁻¹	C—N ^{ㄹ)} /cm ⁻¹	C=N ^{ㅁ)} /cm ⁻¹
OPDA	1 497 1 590 1 598	2 932 3 100	860	3 422 3 445	1 255 1 280	1 411 1 438 1 499 1 649
RI ₇₁₀	1 504 1 593	2 932 3 110	860 917	3 422	1 254	1 386 1 410 1 439
PAPN	1 504 1 590 1 593	2 930 3 110	860 917	3 370 3 400	1 250 1 285	1 439 1 470 1 504 1 649

ㄱ) 벤졸핵의 C—C와 C—H결합의 신축진동, ㄴ) 벤졸핵에서 C—H결합의 바깥평면 변각진동, ㄷ) N—H결합의 신축진동, ㄹ) C—N결합의 신축진동, ㅁ) C=N결합의 신축진동

그림 7과 표 1에서 보는바와 같이 C—C결합진동(1 497~1 598cm⁻¹), C—H결합진동(2 932~3 110cm⁻¹ 사이)과 관련된 OPDA, RI₇₁₀, DAPN의 진동수는 거의 일치하였는데 이것은 방향족핵에서의 C—H결합과 C—C결합의 신축진동방식때문이다.[3]

OPDA, RI₇₁₀, DAPN의 N—H신축진동은 3 370~3 422cm⁻¹에서 나타났는데 RI₇₁₀에서는 OPDA와 DAPN에서 나타난 3 445, 3 370, 3 400cm⁻¹의 극대가 나타나지 않았다. C=N결합의 신축진동은 1 386~1 649cm⁻¹ 구간에서 관찰되었는데 1 386cm⁻¹에 해당하는 진동은 다만 RI₇₁₀에서만 나타났다.

원소분석 자동원소분석기(《Fenba 1106》)를 리용하여 물질들의 원소(C, H, N)분석을 진행하였다.(표 2)

OPDA, DAPN 측정결과 기질과 반응산물의 C : H : N 원소조성비의 이론값과 분석값들은 완전히 일치하였으며 분석한 RI₇₁₀의 원소함량비는 6 : 6 : 2로서 마지막반응산물과 비교하면 수소분자몹에서 차이났다. 반응산물의 분자식이 C₁₂H₁₀N₄이라고 볼 때 RI₇₁₀의 분자식은 원소함량비(6 : 6 : 2)를 고려하면 C₁₂H₁₂N₄인 유기화합물이라고 예측할수 있다.

질량스펙트럼분석 질량스펙트럼분석기에서 정제된 RI₇₁₀을 이온화포격하여 양이온화된 시료[M+H]⁺를 관찰하였다. 비교를 위하여 표준OPDA와 DAPN을 함께 측정하였다. 측정결과는 그림 8과 같다.

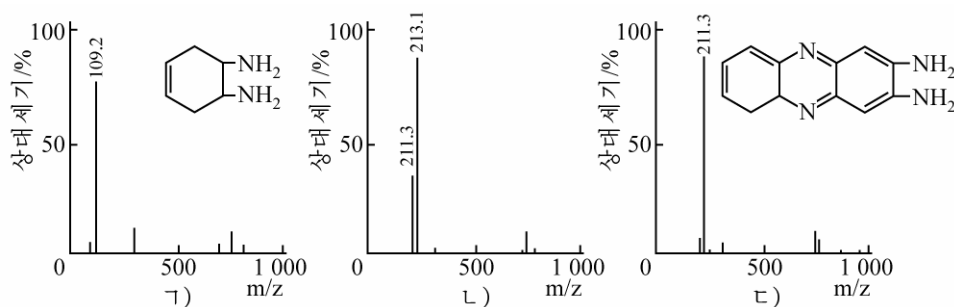


그림 8. RI₇₁₀, OPDA, DAPN의 질량스펙트럼
 a) OPDA, b) RI₇₁₀, c) DAPN

그림 8에서 보는바와 같이 OPDA(a)와 DAPN(c)은 각각 m/z=109.2와 211.3으로 나타났다. 시료의 이온화를 위하여 포격할 때 결합한 양이온의 m/z=1을 환산하여 덜어주면 OPDA의 분자량은 108 그리고 DAPN은 210으로서 선행연구[7]에서 제시된 자료뿐 아니라 물질자체의 분자량과 완전히 일치하였다.

RI₇₁₀의 스펙트럼(b)에서도 마지막산물(DAPN)의 m/z=211.3과 일치되는 봉우리가 나타난것은 정제할 때 비교적 불안정한 중간체의 일부가 이미 마지막산물로 전환된것과 관련된다고 보아진다. 여기서 주목되는것은 새롭게 출현한 m/z=213.1 흡수극대 즉 분자량이 212인 RI₇₁₀의것이다. 분자량이 212인 물질들의 구조를 질량스펙트럼분석기에 보관된 물질 표준자료, 적외선흡수스펙트럼자료, 원소분석자료들 그리고 이미 밝혀진 디히드로페나진[5]의 구조 등과 종합분석비교하면 RI₇₁₀의 구조는 그림 9의 b)와 같다.

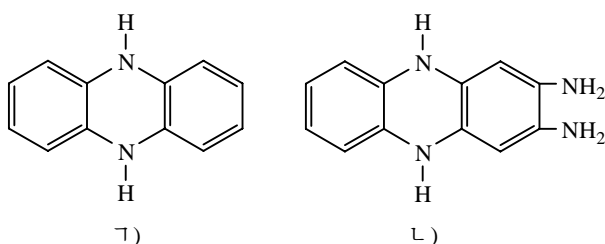


그림 9. DHPN(a)과 RI₇₁₀(b)의 구조

그림 9에서 보는것처럼 RI_{710} 의 모획구조는 디히드로페나진(그림 9의 7))구조이면서 마지막산물에 비하면 2개의 아미노기가 더 있는 디히드로디아미노페나진(DHDAPN)이라는것을 알수 있다.

확증된 RI_{710} 을 반응기질과 마지막반응산물과의 호상관계속에서 보면 전체 반응도식은 그림 10과 같다.

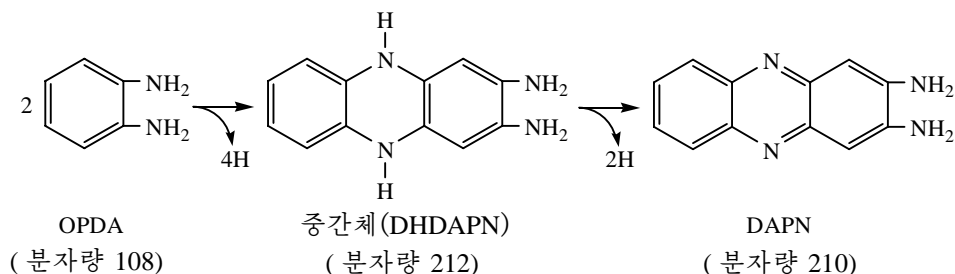


그림 10. 기질이 반응중간체를 걸쳐 반응산물이 형성되는 과정

Hb의 촉매작용으로 OPDA가 산화되어 DAPN을 형성하는 반응은 먼저 4개의 수소분자가 떨어지면서 기질 두 분자가 결합하여 불안정한 RI_{710} 을 형성하고 다시 수소원자 2개가 떨어지면서 안정한 마지막반응산물이 형성되는 방식으로 진행된다고 볼수 있다.

2) 결과해석

생체의 기능을 모형화하거나 특히 효소의 기능을 모형화하기 위한 연구가 광범히 진행되고있다.[6, 8, 10] 효소가 몇개의 중간단계를 거치면서 반응을 촉진한다면 매 단계에 대응한 중간산물이 존재할것이다. 그림 2에서뿐만아니라 선행연구자들이 효소-H₂O₂형이 아닌 λ_{710nm} 의 중간체를 분광학적스펙트르분석을 통하여 발견[7]하였으나 그것이 어떤 형태의 중간체이며 반응경로에서 어떤 위치를 차지하는가를 밝히지 못하였다.

Hb와 H₂O₂의 존재하에서 복합체-I, -II와 같은 물질들의 본래는 이미 보고되었으나 RI_{710} 의 구조에 대하여서는 알려지지 않았다. 그림 3에서 보는바와 같이 파장 710nm의 극대는 반응조건이 Hb와 H₂O₂만으로 이루어졌을 때에는 발견되지 않았지만 여기에 OPDA를 첨가할 때에는 즉시에 나타났다. 이것은 RI_{710} 이 다만 OPDA와 련관된것이라는것을 보여준다. 이와 같은 현상은 Hb대신 HRP로 촉진할 때에도 나타났다. 생성된 RI_{710} 의 풀림도가 물보다 *n*-부타놀에서 더 큰것을 리용하여 반응을 물-유기 2상계에서 진행시켜 RI_{710} 을 분리하는데 성공하였다.

이 중간체의 구조를 밝히기 위하여 RI_{710} 의 적외선흡수스펙트르를 분석한 다음 이미 잘 알려진 표준물질(디히드로페나진)의 적외선흡수스펙트르자료와 비교하고 질량스펙트르, 원소분석을 진행한 결과 RI_{710} 의 분자량은 212인 페나진모획구조를 가진 화합물이라는것을 확증하였다. 이 RI_{710} 은 물매질에서는 매우 불안정하나 부타놀매질에서는 상대적으로 안정하여 반감기는 20℃에서 120min으로서 -10℃에서는 1주일까지 존재할수 있다.(그림 6) 선행연구결과[9]에 의하면 수용액에서 대단히 불안정한 활성산소라디칼도 유기용매에서는 몇min까지도 존재할수 있다는 자료에 근거하면 부타놀에서 RI_{710} 의 안정성증가는 일정한 타당성을 가진다고 본다.

맺 는 말

1) Hb로 OPDA의 산화반응을 촉진할 때 나타나는 반응중간체($\lambda_{710\text{nm}}$)는 분자량이 212인 방향족화합물(디히드로디아미노페나진)이다.

2) 반응중간체($\lambda_{710\text{nm}}$)는 물보다 *n*-부타놀에서 풀림도와 안정성이 좋으며 반감기는 20°C에서 2h, 5°C에서 180min 그리고 -10°C에서 한주일이다.

참 고 문 헌

- [1] R. Akagima et al.; The J. of Biological Chemistry, 262, 6, 2576, 1987.
- [2] G. K. Acker; J. Biol. Chem., 256, 3, 1199, 1981.
- [3] H. Barry; FEBS Letters, 486, 10, 2000.
- [4] H. K. Baek; Biochemistry, 28, 5714, 1989.
- [5] D. Dolphin et al.; Tabulation of Infrared Spectral Data, Wiley, 45~49, 1977.
- [6] M. Georgy et al.; Biofunctionalization of Polymers and Their Applications, Springer, 47~69, 2011.
- [7] Ke Zhang et al.; Talanta, 51, 179, 2000.
- [8] S. Ozaki et al.; Chemistry Reviews, 198, 39, 2000.
- [9] G. H. Loew et al.; Biochem. Biophys. Acta, 1252, 172, 1995.
- [10] E. Mitsuhiro et al.; Smart Biomaterials, Springer, 158~162, 2014.
- [11] S. Gibson; Enzymatic Polymer Functionalisation: Advances in Laccase and Peroxidase Derived Lignocellulose Functional Polymers, Springer, 67~71, 2010.
- [12] 邹国林; 生物化学与生物物理进展, 4, 71, 1986.

주제104(2015)년 10월 5일 원고접수

Reaction Intermediate in the *o*-Phenylenediamine Oxidation using Hemoglobin as a Mimetic Peroxidase

Ri Hae Song, Phyon Jong Min and Kim Myong Ho

Hemoglobin was used as a mimetic enzyme for peroxidase to catalyze oxidation of *o*-phenylenediamine. During this reaction, an intermediate with absorbance peak at 710nm (the reaction intermediate $\lambda_{710\text{nm}}$: RI₇₁₀) was formed. We performed the reaction in aqueous-butanol two phases and isolated the crystalline RI₇₁₀ which moved from the aqueous phase to the butanol phase. The structure of the RI₇₁₀ was determined by means of UV-Vis absorption spectroscopy, IR absorption spectroscopy, element analysis and mass spectroscopy, and the molecular weight and the thermal stability of the RI₇₁₀ were studied.

The RI₇₁₀ is an aromatic compound (molecular weight 212) containing 2 more hydrogen atoms than the final product, and its half-life periods were 120, 180min and 7 days at 20, 5 and -10°C, respectively.

Key words: hemoglobin, mimetic enzyme, reaction intermediate $\lambda_{710\text{nm}}$, two phase system