

페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들 (MBPC, MMBPC)의 항산화효소류사활성

김광원, 리은하, 리형관

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《사회주의의학은 본질에 있어서 예방의학이며 병을 미리막고 사람의 생명과 건강을 보호증진시키는것은 사회주의의학의 기본임무입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 70페이지)

항산화효소는 만병의 근원이고 로화의 기본원인인 활성산소의 과잉축적을 막는다는 데로부터 사람들의 무병장수와 관련하여 크게 주목되고있다. 세포의 산화적손상을 일으키는 활성산소들중 기본을 이루는 수퍼록시드(O_2^-)는 수퍼록시드디스무타제(SOD, EC 1.15.1.1)에 의하여 다른 활성산소인 과산화수소(H_2O_2)로 전환되며 이것이 다시 카탈라제(CAT, EC 1.11.1.6)에 의하여 물로 전환되면서 무독화된다. 이 두 항산화효소는 거의 모든 생물에 들어있는 중요한 효소로서 심장혈관계통질병, 당뇨병, 신경질병, 폐질병, 간 및 위장관질병, 콩팥질병, 피부질병, 암성질병 등에 대한 치료효과가 크다[6]는것이 확인되였다. 그러나 천연항산화효소는 분자크기가 너무 크고 불안정하며 세포투과성이 낮고 면역반응을 일으킬수 있을뿐아니라 값이 비싼것으로 하여 그대로 약제로 리용하기에는 불합리한 점들이 있다. 이 문제를 해결하기 위하여 세계적으로 SOD나 CAT와 유사한 활성을 가지면서도 림상응용에서 천연효소를 대신할수 있는 안정하면서도 독성이 없는 저분자모의 화합물들을 탐색하기 위한 연구들[6-9]이 진행되고있다.

우리는 이미 에틸렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들인 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간(MMBC, 일명 염화에틸비스이미노메틸구와야콜망간: EMC)[1], 3-에톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민초산망간(MEBA)[2], N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간(MBC)[3]의 항산화효소류사활성과 림상리용가능성에 대한 연구결과를 발표하였다. 그러나 살렌-망간착화합물들은 개별적인 구조마다 독특한 치료효과를 나타내기때문에 새로운 살렌-망간착화합물들을 합성하고 그 효과를 판정하는것이 의연히 중요한 문제로 나선다. 우리는 종전의 에틸렌디아민대신 페닐렌디아민을 리용하면 활성중심금속인 망간주위에 1개 방향족고리가 더 생겨 천연항산화효소에 보다 가까와지지 않겠는가 하는데 주의를 돌렸다.

이로부터 우리는 페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들인 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민염화망간(MBPC)과 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민염화망간(MMBPC)의 항산화효소류사활성을 조사하였다.

재료와 방법

MBPC와 MMBPC는 페닐렌디아민을 리용하여 선행방법[4, 5]으로 제조하였다.

SOD활성은 피로갈롤법(Marklund법)[10]으로 측정하였다. 먼저 10mmol/L의 트리스-염산완충용액(pH 8.2)에 EDTA·2Na를 1mmol/L 되게 푼 용액 2.97mL를 넣은 시험관을 25℃에

15min동안 방치하였다가 여기에 측정하려는 용액 0.015mL와 50mmol/L의 피로갈롤 0.015mL를 첨가하고 25°C에서 30s간격으로 4min동안 420nm에서의 흡광도(A_{420})를 측정하였다. 대조는 측정용액대신 증류수 0.015mL를 넣은것으로 하였다. SOD활성 1U는 피로갈롤자동산화속도를 50%로 감소시키는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

CAT활성측정은 과산화수소량의 감소(240nm에서의 흡광도감소)에 기초[11]하여 다음과 같이 진행하였다. 활성을 측정하려는 용액 0.08, 0.16, 0.32, 0.48, 0.64mL에 증류수 1.32, 1.24, 1.08, 0.92, 0.76mL를 각각 넣고 0.1mol/L의 린산완충용액(pH 8.0)을 1.5mL씩 넣는다. 여기에 0.5mol/L의 과산화수소용액을 0.1mL씩 넣고 25°C에서 10s간격으로 흡광도(A_{240})를 측정하였다. CAT활성 1U는 1min동안에 1 μ mol의 H_2O_2 을 분해하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

페록시다제(POD)활성은 ABTS(2, 2'-아지노비스(3-에틸렌벤조티아졸린-6-술폰산 디암모늄))를 발색기질로 하여 740nm에서의 흡광도(A_{740})변화를 측정하는 방법[12]으로 평가하였다. 즉 2mmol/L의 MBPC(또는 MMBPC)용액 50 μ L를 1mmol/L의 ABTS가 포함된 0.05mol/L 린산완충용액 2.450mL에 넣고 20°C에서 5min동안 방치한 다음 여기에 0.025mol/L의 과산화수소 50 μ L를 첨가하고 20°C에서 3min동안 A_{740} 변화를 측정하였다. 대조용액은 과산화수소대신 증류수를 넣은것으로 하였다. 740nm에서 산화형ABTS의 몰흡광계수는 $2.03 \cdot 10^4 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 이다. POD활성 1U는 1min동안에 1 μ mol의 ABTS를 산화시키는데 필요한 효소량으로 하였다.

페닐렌디아민, 살리칠알데히드, 초산망간($C_4H_6MnO_4 \cdot 4H_2O$), 염화칼리움, 에타놀 등 시약들은 모두 분석순이상의 것이었다. 피로갈롤과 과산화수소는 《Sigma》제품을, ABTS는 《Bomei》제품을 리용하였다. 용액의 흡광도는 자외가시선분광광도계(《Shimadzu》)로 측정하였다.

결과 및 논의

1) MBPC와 MMBPC의 SOD류사활성

MBPC 혹은 MMBPC를 각각 0~5mg/mL의 농도로 첨가하고 피로갈롤자동산화속도를 측정하였다.(그림 1)

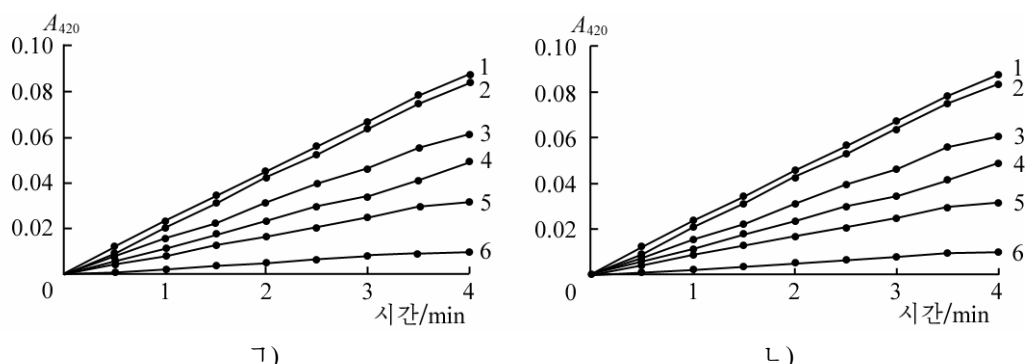


그림 1. MBPC와 MMBPC의 농도에 따르는 피로갈롤자동산화속도의 변화

ㄱ) MBPC, ㄴ) MMBPC; 1-6은 MBPC 또는 MMBPC의 첨가농도가 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5mg/mL일 때; 25°C, pH 8.2, 1mmol/L EDTA 첨가조건에서 피로갈롤자동산화속도를 측정

그림 1에서 보는바와 같이 MBPC나 MMBPC의 첨가로 하여 피로갈롤자동산화속도는 매우 류사하게 감소하였으며 그 감소정도도 서로 류사하게 살렌-망간착화합물의 첨가량에

비례하였다. 이로부터 MBPC와 MMBPC가 거의 같은 SOD류사활성을 가진다는것을 알수 있는데 그 활성의 계산값들은 각각 151, 153U/mg이었다.

천연항산화효소와의 활성비교를 위하여 SOD표품(《Worthington Biochemical Corporation》의 SOD분말, 제품번호 LS003540)을 가지고 우와 같은 실험을 하였는데 계산되는 활성값은 1490U/mg이었다. 결국 MBPC와 MMBPC의 SOD류사활성은 U/mg을 단위로 하였을 때 천연SOD의 약 10%에 해당되었다. 이 값을 1mol당 활성으로 환산하면 천연SOD의 분자량이 약 4만[13]이라고 할 때 두 살렌-망간착화합물의 1mol당 활성은 천연SOD단백질의 0.1%에 해당된다. 이 값을 지금까지 개발된 다른 저분자모의화합물들의 활성들과 대비하였을 때 대표적인 망간-포르피린SOD모의화합물들인 MnTBAP, MnTDM-4-PzP, MnTE-2-PyP의 mol당 활성은 각각 천연SOD의 0.00058, 0.067, 5.8%였고 금속을 포함하지 않는 SOD모의화합물들인 M-40403, 풀러렌의 1mol당 활성은 각각 1.2, 0.2%였다.[14]

2) MBPC와 MMBPC의 CAT류사활성

MBPC나 MMBPC를 각각 3~24mg/mL의 농도로 첨가하고 H_2O_2 분해속도를 측정하였다.(그림 2)

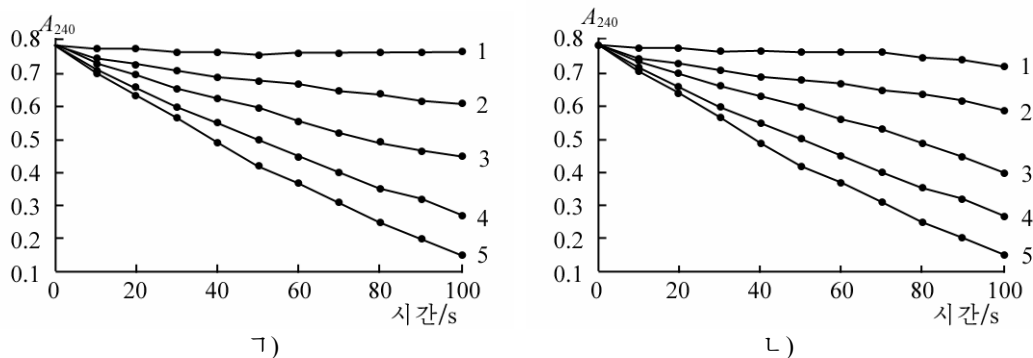


그림 2. MBPC(a)와 MMBPC(b)의 농도에 따르는 H_2O_2 분해속도

a) MBPC, b) MMBPC; 1-5는 MBPC 또는 MMBPC의 첨가농도가 각각 3, 6, 12, 18, 24mg/mL일 때; 25°C, pH 8.0에서 H_2O_2 분해를 측정

그림 2에서 보는바와 같이 MBPC나 MMBPC의 첨가로 하여 H_2O_2 분해가 일어났으며 (즉 H_2O_2 의 양에 따르는 A_{240} 값이 감소) 그 분해속도는 두 모의화합물의 첨가농도에 비례하면서 류사하게 빨라졌다. 이로부터 계산되는 MBPC와 MMBPC의 CAT류사활성은 각각 23.3, 24.8U/mg이었다.

MBPC나 MMBPC의 CAT류사활성이 실제로 효소모의화합물로서의 활성인가 아니면 이 화합물이 망간염인것으로 인한 과산화수소의 자발적인 분해인가를 확인하기 위하여 대조로 초산망간을 넣어 흡광도변화를 관찰한 결과 대조구에서는 측정시간내에 흡광도변화가 거의 나타나지 않았다. 선행자료[15]에서도 $10\mu\text{mol/L}$ MBC의 구조적구성성분들인 $20\mu\text{mol/L}$ 의 살리칠알데히드와 $10\mu\text{mol/L}$ 의 망간염, 에틸렌디아민의 혼합용액을 대조로 하여 산소전극법으로 과산화수소분해활성을 측정한 결과 활성이 거의나 나타나지 않았다. 이상의 결과들은 MBPC나 MMBPC의 과산화수소분해활성이 그 구조상의 구성요소에 의한것이 아니라 전체 착화합물구조에 의한 CAT류사활성이며 MBPC나 MMBPC는 단순한 H_2O_2 분해작용물질이 아니라 CAT모의화합물이라는것을 보여준다.

한편 천연항산화효소와의 활성비교를 위하여 CAT단백질표품(《Sigma-Aldrich Corporation》의 CAT분말, 제품번호 C40)을 가지고 우와 같은 실험을 하였는데 그로부터 계산되는 활성값은 290U/mg이었다.

결국 MBPC와 MMBPC의 CAT류사활성은 U/mg을 단위로 하였을 때 천연CAT의 약 8%에 해당된다. 이 값을 mol당 활성으로 환산하면 천연CAT의 분자량이 약 6만[16]이라고 할 때 두가지 살렌-망간착화합물의 1mol당 활성은 천연CAT단백질의 0.06%에 해당된다.

이와 관련하여 한가지 논의할수 있는것은 원래 천연CAT가 활성이 대단히 높아서 《촉매로서는 완벽한 효소》라는것이다. k_{cat} (단위는 개/s, 즉 효소 1개 분자가 1s동안에 생성물로 전환시키는 기질의 개수)를 비교해보면 푸마라제가 800, 우레아제가 10 000, 아세틸콜린에스테라제가 14 000일 때 SOD가 1 000 000, CAT는 무려 40 000 000이나 된다.[17] 이렇게 놓고 볼 때 살렌-망간착화합물들의 CAT류사활성은 결코 작은 값이라고는 할수 없다.

에틸렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물(MBC, MMBC)과 페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물(MBPC, MMBPC)의 CAT류사활성을 비교하였다.(그림 3) 그림 3에서 보는바와 같이 4가지 살렌-망간착화합물의 CAT류사활성들은 서로 달랐다. 특히 페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들은 에틸렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들보다 CAT류사활성이 3~5배 이상이었다. 이것은 CAT류사활성이 살렌-망간착화합물의 분자구조에 크게 의존한다는것을 보여준다.

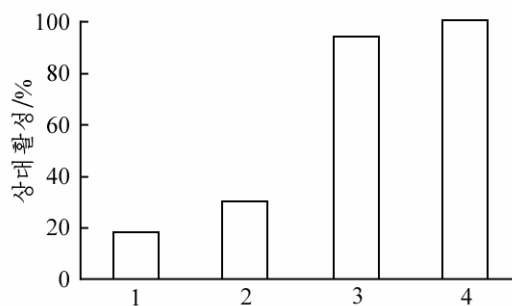


그림 3. 4가지 살렌-망간착화합물의 CAT류사활성비교

세로축은 MMBPC의 CAT류사활성을 100으로 한 상대값; 1-MBC, 2-MMBC, 3-MBPC, 4-MMBPC

3) MBPC와 MMBPC의 POD류사활성

POD활성측정에 널리 쓰이는 합성기질 ABTS가 충분히 들어있는 반응용액에 MBPC나 MMBPC를 0.5~5mmol/L(0.178~17.8mg/L)의 농도로 첨가하고 ABTS변화를 A_{740} 을 측정하는 방법으로 검토하였다. 그런데 이 두가지 살렌-망간착화합물에서는 POD류사활성이 나타나지 않았다. MBPC나 MMBPC의 농도를 20mmol/L까지 증가시켜도 ABTS변화속도는 달라지지 않았다. 이와는 대조적으로 MBC의 POD류사활성은 4.5U/mg이었다.(그림 4)

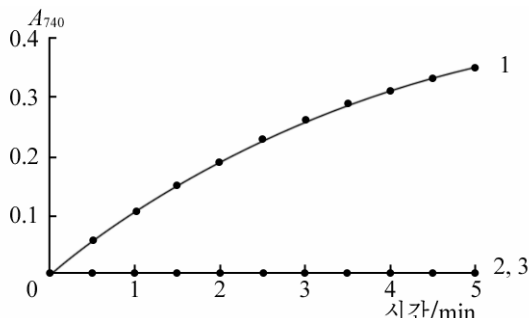
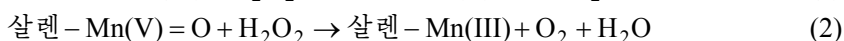


그림 4. MBC와 MBPC, MMBPC를 2mmol/L씩 첨가하였을 때 POD반응속도
1-MBC, 2-MBPC, 3-MMBPC

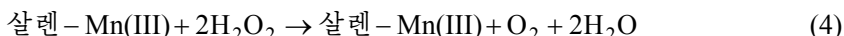
CAT류사활성이 매우 높은 MBPC, MMBPC에 POD류사활성이 거의 없는 원인을 다음과 같이 볼수 있다.

살렌-망간착화합물의 CAT반응과 POD반응의 부분반응식을 보면 다음과 같다.

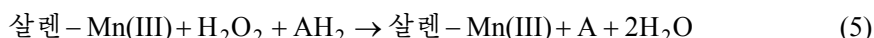




반응식 (1)과 (2)로부터 CAT총반응식은



로 쓸수 있고 반응식 (1)과 (3)으로부터 POD총반응식은



로 쓸수 있다.

이로부터 POD반응인 경우 우선 살렌-Mn(III)이 H_2O_2 과 반응하여 중간산물인 살렌-Mn(V)=O로 되고 이것이 AH_2 (우리의 경우 ABTS)과 반응하는데 CAT류사활성이 너무 높으면 중간산물이 AH_2 (ABTS)이 아니라 H_2O_2 과 우선적으로 반응하기때문에 POD류사활성이 거의 나타나지 않는다고 볼수 있다.

페닐렌디아민을 리용하여 이번에 제조한 MBPC, MMBPC와 그 초산염 그리고 우리가 이전에 제조한 살렌-망간착화합물들을 염형태와 출발물질 그리고 항산화효소류사활성을 지표로 하여 비교하였다.(표)

표. 살렌-망간착화합물들과 그 항산화효소류사활성들의 비교

화합물명	염형태	출발물질		항산화효소류사활성 /(U·mg ⁻¹)		
		디아민	알데히드	SOD	CAT	POD
MBA: N, N'-비스(살리칠리덴) 에틸렌디아민초산망간	초산염	에틸렌 디아민	살리칠 알데히드	147	4.6	4.7
MBC: N, N'-비스(살리칠리덴) 에틸렌디아민염화망간	염화물	"	"	148	4.6	4.5
MMBA: 3-메톡시-N, N'-비스 (살리칠리덴)에틸렌디아민초산망간	초산염	"	o-와닐린	152	8.0	7.2
MMBC: 3-메톡시-N, N'-비스 (살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간	염화물	"	"	150	7.5	7.6
MEBA: 3-에톡시-N, N'-비스 (살리칠리덴)에틸렌디아민초산망간	초산염	"	노보와닐린	151	5.4	6.1
MBPA: N, N'-비스(살리칠리덴) 페닐렌디아민초산망간	초산염	페닐렌 디아민	살리칠 알데히드	150	23.2	0
MBPC: N, N'-비스(살리칠리덴) 페닐렌디아민염화망간	염화물	"	"	151	23.3	0
MMBPA: 3-메톡시-N, N'-비스 (살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간	초산염	"	o-와닐린	151	24.4	0
MMBPC: 3-메톡시-N, N'-비스 (살리칠리덴)페닐렌디아민염화망간	염화물	"	"	153	24.8	0

표에서 보는바와 같이 CAT류사활성이 높은 화합물들에서는 모두 POD류사활성이 거의 나타나지 않았다. 한편 SOD류사활성은 염형태와 합성출발물질에 관계없이 9가지 살렌-망간착화합물에서 거의 같았다.

맺 는 말

페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들인 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민염화망간(MBPC)과 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민염화망간(MMBPC)의 SOD류사활성은 각각 151, 153U/mg이고 CAT류사활성은 각각 23.3, 24.8U/mg이었다.

9가지 살렌-망간착화합물의 SOD류사활성은 거의 같았지만 페닐렌디아민을 리용하여 제조한것들이 에틸렌디아민을 리용하여 제조한것들보다 CAT류사활성이 높았으며 CAT류사활성이 높은 화합물들에서는 모두 POD류사활성이 거의 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 56, 5, 145, 주체99(2010).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 57, 11, 142, 주체100(2011).
- [3] 리형관 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 60, 주체104(2015).
- [4] 리은하 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 4, 59, 주체105(2016).
- [5] 리은하 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 5, 62, 주체105(2016).
- [6] Y. Li; Antioxidants in Biology and Medicine-Essentials, Advances, and Clinical Applications, Nova Biomedical, 33~57, 2011.
- [7] D. P. Riley; Chem. Rev., 99, 2573, 1999.
- [8] S. Kawakami et al.; Circ. J., 73, 2125, 2009.
- [9] S. R. Doctrow et al.; Curr. Inorg. Chem., 2, 325, 2012.
- [10] J. W. Rush et al.; Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 279, 5, 2068, 2000.
- [11] L. Ozturk et al.; Prep. Biochem. Biotechnol., 37, 229, 2007.
- [12] J. S. Shindler et al.; Eur. J. Biochem., 65, 325, 1976.
- [13] D. Vyas et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 329, 831, 2005.
- [14] I. Batinic-Haberle et al.; Antioxid. Redox Signal., 13, 6, 877, 2010.
- [15] S. R. Doctrow et al.; J. Med. Chem., 45, 4549, 2002.
- [16] C. Li et al.; Fish Shellfish Immunol., 24, 26, 2008.
- [17] R. H. Garrett et al.; Biochemistry, Cengage Learning, 448~449, 2017.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

Antioxidant Enzyme-Like Activities of Phenylenediamine-derived Salen-Mn Compounds (MBPC and MMBPC)

Kim Kwang Won, Ri Un Ha and Ri Hyong Gwan

We synthesized two phenylenediamine-derived salen-Mn compounds, MBPC(manganese N, N'-bis (salicylidene) phenylenediamine chloride) and MMBPC(manganese 3-methoxy-N, N'-bis (salicylidene) phenylenediamine chloride). Their SOD-like activities were 151 and 153U/mg respectively and their CAT-like activities were 23.3 and 24.8 U/mg respectively. The SOD-like activities of nine salen-Mn compounds were almost the same, but the CAT-like activities of phenylenediamine-derived salen-Mn compounds were higher than the ones of ethylenediamine-derived salen-Mn compounds. All salen-Mn compounds with high CAT-like activities had little POD-like activity.

Key words: phenylenediamine, salen-Mn compound, antioxidant enzyme