

N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간(MBPA)의 항산화효소류사활성

리형관, 김현일, 김광원

세포의 산화적인 손상을 일으키는 활성산소들중 기본을 이루는 수퍼옥시드(O_2^-)는 수퍼옥시디디스무타제(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)나 페록시다제(POD, EC 1.11.1.7)에 의하여 물로 전환되면서 무독화된다. 이 세 종류의 천연항산화효소들은 거의 모든 생물에 들어있는 중요한 효소로서 노화방지와 염증, 뇌졸중, 심장질환의 치료 등에 효과가 크다는것이 증명되었다.[3, 4] 그러나 천연효소는 분자크기가 너무 크고 불안정하며 세포투과성이 낮고 면역반응을 일으킬수 있을뿐아니라 값이 비싼것으로 하여 그대로 약제로 리용하기는 불합리한 점들이 있다.

이 문제를 해결하기 위하여 세계적으로 SOD나 CAT, POD류사활성을 가지면서도 림상응용에서 천연효소를 대신할수 있는 안정하면서도 독성이 없는 저분자모의화합물들을 탐색하는 연구사업이 심화되고있다.[5-8]

우리는 이미 항산화효소류사활성을 가지는 저분자모의화합물들인 N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간(MBC), 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간(MMBC, 일명 염화에틸비스이미노메틸구와야콜망간 EMC)[1]과 3-에톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민초산망간(MEBA)[2]을 연구한데 기초하여 여기서는 류사한 살렌-망간착화합물인 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간(MBPA)을 제조하고 그 항산화효소류사활성을 조사하였다.

재료와 방법

적외선흡수스펙트르는 고체시료를 KBr디스크법으로 준비하여 $4000\sim 400cm^{-1}$ 대역에서 푸리에변환적외선분광기(《FTIR-8101》)로 측정하였다. 자외가시선흡수스펙트르는 용액상태의 시료를 $200\sim 750nm$ 대역에서 자외가시선분광광도계(《SHIMADZU》)로 측정하였다.

CAT활성측정은 과산화수소량의 감소(240nm에서의 흡광도감소)에 기초하여[9] 다음과 같이 진행하였다. 활성측정하려는 용액 0.08, 0.16, 0.32, 0.48, 0.64mL에 증류수 1.32, 1.24, 1.08, 0.92, 0.76mL를 각각 넣고 매개에 0.1mol/L 린산완충액(pH 8.0) 1.5mL씩 넣는다. 여기에 0.5mol/L 과산화수소용액 0.1mL를 넣고 $25^\circ C$ 에서 10s 간격으로 흡광도(A_{240})를 측정하였다. CAT활성 1U는 1min동안에 $1\mu mol$ 의 H_2O_2 을 분해하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

POD활성은 ABTS(2, 2'-아지노비스(3-에틸렌벤조티아졸린-6-술폰산디암모늄))를 발색기질로 하여 740nm에서의 흡광도(A_{740})증가를 측정하는 방법[10]으로 평가하였다. 즉

2mmol/L MBPA 용액 50 μ L를 1mmol/L ABTS포함 0.05mol/L 린산완충액 2.450mL에 넣고 20°C에서 5min간 방치한 다음 여기에 0.025mol/L 과산화수소 50 μ L를 첨가하고 20°C에서 3min 동안 740nm에서의 흡광도변화를 측정하였다. 대조용액은 과산화수소대신 증류수를 넣은 것으로 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 정의하였다.

페닐렌디아민, 살리칠알데히드, 초산망간($\text{C}_4\text{H}_6\text{MnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 에타놀 등 시약들은 모두 분석순이상의 것이었다. 과산화수소는 《Sigma》제품을, ABTS는 《Bomei》제품을 리용하였다.

결과 및 논의

1) MBPA의 제조와 동정

MBPA는 MEBA[2]처럼 두 단계로 제조하였다. 첫번째 단계는 살렌-H₂의 합성단계로서 무수에타놀에 각각 0.2, 0.4mol/L 되게 페닐렌디아민과 살리칠알데히드를 풀어 섞었다. 다음 이 반응용액속에 생겨난 침전물을 려과하고 무수에타놀로 세척하여 공기건조시켜 붉은 감색의 살렌-H₂의 결정을 얻었다.

두번째 단계는 MBPA의 합성단계로서 위에서 합성한 살렌-H₂을 농도가 25mmol/L 되게 95% 에타놀에 푼 다음 최종농도가 25mmol/L 되게 고체상태의 초산망간($\text{C}_4\text{H}_6\text{MnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)을 첨가하고 80°C에서 1h동안 교반하면서 환류시켰다. 다음 검은 밤색의 용액을 공기건조시켜 MBPA의 결정을 얻었다. 밤색고체의 생성물을 아세톤으로 세척하고 려과한 다음 공기건조시켰다.

첫번째 단계에서는 살렌-H₂의 결정이 90~96%의 거둬물로 얻어졌다. MBPA의 중간생성물인 살렌-H₂은 물에 잘 풀리지 않으므로 95% 에타놀에 풀어서 자외가시선흡수스펙트르를 측정하였으며 적외선흡수스펙트르는 고체시료상태에서 측정하였다. 결과 중간생성물의 특징적인 흡수띠들이 모두 나타났다.(자료생략)

두번째 단계에서는 MBPA의 결정을 86~90%의 거둬물로 얻었으며 합성과정의 총체적인 거둬물은 59~74%였다. MBPA를 물에 풀어 자외가시선흡수스펙트르를 측정한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는것처럼 MBPA는 247.6, 339.7, 424nm근방에서 흡수극대를 가진다. 이것은

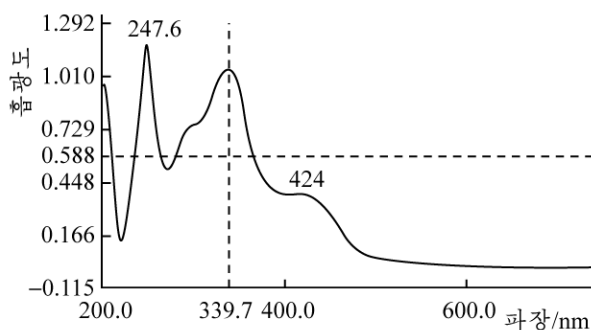


그림 1. MBPA의 자외가시선흡수스펙트르

은 211, 235, 280nm근방에서 흡수극대를 가지는 MBC와는 뚜렷한 대조를 이루는데 아마도 MBC의 에틸렌디아민이 MBPA에서는 페닐렌디아민으로 교체된 결과라고 생각한다.

또한 MBPA의 적외선흡수스펙트르를 측정한 결과는 그림 2와 같다. 여기서 MBPA의 C-N의 신축흡수는 1200cm^{-1} 에서 나타난다. 또한 페닐기는 1600cm^{-1} 에서 C=C방향족고리신축을, 1235, 1153,

1 095, 1 055, 980 cm^{-1} 에서 방향족고리면내변형을 나타낸다.

그밖에 질량스펙트르, 핵자기공명스펙트르, 원소분석을 진행한 결과 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간 즉 Manganese N, N'-bis(salicylidene)phenylenediamine acetate(MBPA)의 구조식과 화학식은 그림 3과 같다. 이 살렌-망간착체는 분자량이 428(크기가 천연항산화효소의 1/100이하)이며 물과 에타놀, 아세톤 등 유기용매에 잘 풀린다.

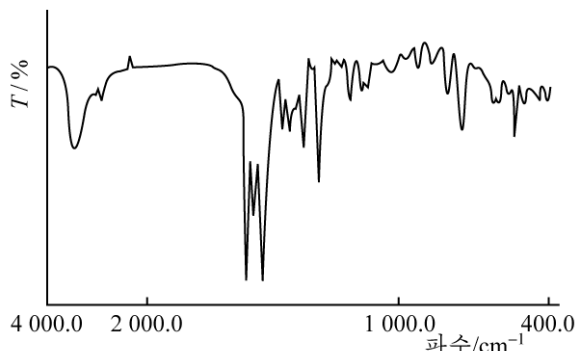


그림 2. MBPA의 적외선흡수스펙트르

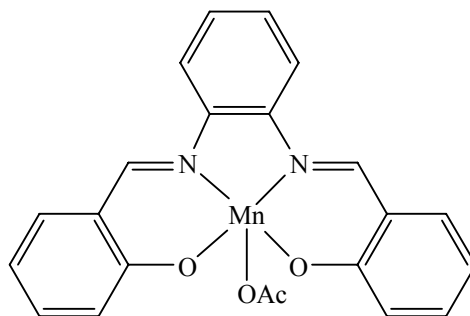


그림 3. MBPA의 구조식
화학식 $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{MnN}_2\text{O}_4$

2) MBPA의 CAT 및 POD류사활성

MBPA를 각각 0.4~3.2mg/mL의 농도로 첨가하고 과산화수소속도를 측정한 결과 MBPA의 CAT류사활성은 16.6U/mg였다. 이전에 연구한 MBC, MMBC(EMC)[1], MEBA[2]의 CAT류사활성이 각각 4.6, 7.5, 5.4U/mg이라는것을 고려하면 MBPA가 높은 CAT류사활성을 가진다는것을 알수 있다. 그림 4에서 볼수 있는바와 같이 MBPA의 CAT류사활성은 MBC의 거의 4배에 달한다.

MBPA의 CAT류사활성이 실제로 효소모의화합물로서의 활성인지 아니면 이 화합물이 망간염인것으로 인한 과산화수소의 자발적인 분해인가를 확인하기 위하여 대조로 초산망간을 넣어 흡광도변화를 관찰한 결과 대조구에서는 흡광도변화가 측정시간내에 거의 나타나지 않았다. 선행자료[11]에서도 10 $\mu\text{mol/L}$ MBC의 구조상의 구성성분들인 20 $\mu\text{mol/L}$ 의 살리칠알데히드와 10 $\mu\text{mol/L}$ 의 Mn염과 에틸렌디아민의 혼합용액을 대조로 하여 산소전극법을 리용하여 과산화수소분해활성을 측정한 결과 활성이 거의나 나타나지 않았다. 이상의 결과들은 MBPA의 과산화수소분해활성이 그 구조상의 구성요소에 의한것이 아니라 전체 착화합물구조에 의한 CAT류사활성이며 MBPA는 단순한 과산화수소분해작용물질이 아니라 CAT모의화합물이라는것을 보여준다.

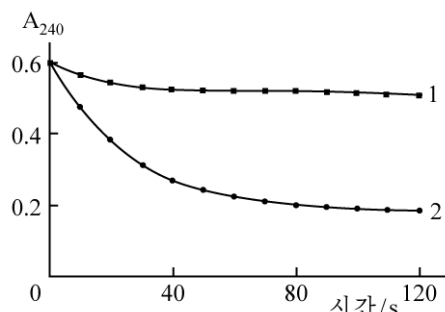


그림 4. MBC(1)와 MBPA(2)를 각각 3.2mg/L씩 첨가하였을 때 과산화수소분해

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

결국 MBPA, MBC, MMBC(EMC), MEBA의 CAT류사활성은 U/mg을 단위로 하였을 때 천연CAT의 각각 5.7, 1.6, 2.6, 1.9%에 해당한다. 즉 살렌-망간착화합물의 CAT류사활성은 모의화합물의 분자구조에 따라 차이난다. 만일 이 값을 mol당 활성으로 환산하면 천연CAT의 분자량이 62 500이라고 할 때 4종류의 살렌-망간착화합물(MBPA 분자량 428, MBC 분자량 355, EMC 분자량 417, MEBA 분자량 468)의 mol당 활성은 천연CAT단백질의 0.039, 0.009, 0.017, 0.014%에 해당한다.

이와 관련하여 한가지 이야기할수 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 10 000 000나 된다.[12] 이렇게 놓고 볼 때 세 살렌-망간착화합물의 CAT류사활성은 결코 작은 값이라고는 할수 없다.

한편 POD활성측정에 널리 쓰이는 합성기질 ABTS가 충분히 들어있는 반응용액에 MBC와 MBPA를 각각 2mmol/L의 농도로 첨가하고 ABTS의 변화를 A_{740} 로 측정하였다.(그림 5)

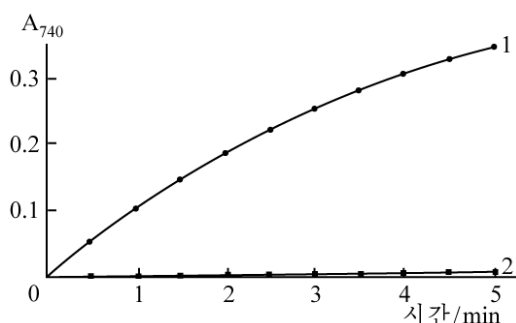
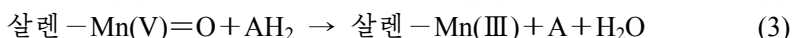
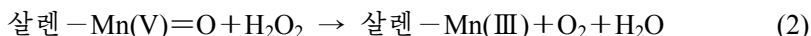
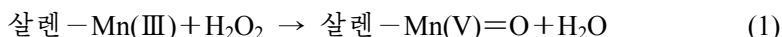


그림 5. MBC(1)와 MBPA(2)를 각각 2mmol/L씩 첨가하였을 때 POD반응속도

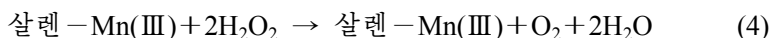
그림 5에서 보는바와 같이 MBPA의 POD류사활성은 거의 없었다. MBPA의 농도를 20mmol/L까지 증가시켜도 ABTS변화속도는 달라지지 않았다. 대조적으로 MBPA의 POD류사활성은 4.5U/mg이었다. 한편 MMBC(EMC), MEBA의 POD류사활성값은 각각 7.6, 6.1U/mg이었다. 즉 살렌-망간착화합물의 POD류사활성도 모의화합물의 분자구조에 따라 차이가 심하다.

가장 CAT류사활성이 높은 MBPA에 POD류사활성이 거의 없는 원인은 다음과 같이 설명된다. 일반적으로 살렌-망간착화합물의 CAT 및 POD반응의 식을 다음과 같이 표기할수 있다.

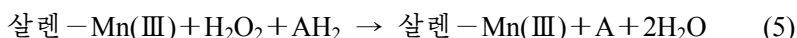
살렌-망간착화합물의 CAT반응과 POD반응의 부분반응식을 보면 다음과 같다.



반응식 (1)과 (2)로부터 CAT총반응식은



로 쓸수 있고 반응식 (1)과 (3)으로부터 POD총반응식은



로 쓸수 있다.

이로부터 알수 있는바와 같이 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 POD활성이 거의 나타나지 않는다고 본다.

맺 는 말

두 단계로 합성한 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민 초산망간(MBPA)의 거둠률은 59~74%이며 자외가시선 흡수스펙트럼과 적외선 흡수스펙트럼 등을 통하여 생성물을 확인하였다. MBPA는 높은 CAT류사활성(16.6U/mg)을 나타내지만 POD류사활성은 거의 없다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 56, 5, 145, 주체99(2010).
- [2] 김일성 종합대학학보(자연과학), 57, 11, 142, 주체100(2011).
- [3] B. Halliwell et al.; Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, 79~186, 2007.
- [4] J. M. Scandalis; Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 63~78, 1997.
- [5] D. P. Riley; Chem. Rev., 99, 2573, 1999.
- [6] S. Kawakami et al.; Circ. J., 73, 2125, 2009.
- [7] S. R. Doctrow et al.; Curr. Inorg. Chem., 2, 325, 2012.
- [8] R. A. Rosenthal et al.; Anticancer Agents Med. Chem., 11, 359, 2011.
- [9] Jr. R. F. Beers et al.; J. Biol. Chem., 195, 133, 1952.
- [10] J. S. Shindler et al.; Eur. J. Biochem., 65, 325, 1976.
- [11] S. R. Doctrow et al.; J. Med. Chem., 45, 4549, 2002.
- [12] D. Voet et al.; Biochemistry, John Wiley and Sons, 489, 2011.

주체104(2015)년 1월 5일 원고접수

Antioxidant Enzyme-Like Activities of Manganese N, N'-bis(salicylidene)phenylenediamine Acetate (MBPA)

Ri Hyong Gwan, Kim Hyon Il and Kim Kwang Won

Manganese N, N'-bis(salicylidene)phenylenediamine acetate(MBPA) was synthesized through 2 steps with the yield of 59~74% and its structure was identified by UV-visible and infrared spectrum. MBPA showed high activity in catalase assay (16.6U/mg), but little activity in the peroxidase assay.

Key words: N, N'-bis(salicylidene)phenylenediamine acetate, MBPA, antioxidant enzyme