

아스파라긴산동(Ⅱ)착화합물의 O_2^- 소거특성에 대한 연구

황철미, 강명수

아스파라긴산은 아스파라긴과 아르기닌합성, 단백질, 핵산 및 신경전달물질합성경로 뿐아니라 비타민대사와 노소순환, 아스파라긴산/사과산왕복계 등 생체내 물질대사에서 중요한 역할을 하는것으로 하여 간장질환치료제, 암모니아해독제, 뇌신경부활제, 임신중독해소제, 류마치스치료제 등으로 널리 리용되고있다.[1, 4]

한편 필수미량원소인 동은 시토크롬산화효소, 사과산수소떼기효소, 수페록시드디스무타제 등 여러 효소들의 도움효소나 배합족의 조성성분으로서 활성중심을 이룰뿐아니라 헤모글로빈합성에 참가하며 중추신경계통의 발육, 골격 및 결합조직의 형성과 성장발육에서 중요한 역할을 한다.[5, 6]

우리는 아스파라긴산과 동의 생리적작용뿐아니라 항염증, 항산화, 조혈특성을 나타내는[7, 8] 아스파라긴산동(Ⅱ)착화합물의 O_2^- 소거특성에 대한 연구를 하였다.

아스파라긴산동(Ⅱ)착화합물의 O_2^- 소거특성에 대해 구체적으로 밝힌 자료는 발표된것이 없다.

재료와 방법

아스파라긴산동(Ⅱ)착화합물의 제조 아스파라긴산 0.005mol과 초산동 0.005mol을 각각 더운 증류수에 푼 다음 비커에 두 용액을 넣고 100mL 되게 증류수를 넣어(pH 5.4) 85℃의 항온수욕조에서 30min동안 교반하였다. 반응과정에 연한 푸른색의 결정이 생기는데 반응이 끝난 즉시 리파하여 맑은 리액은 버리고 결정은 더운 2차증류수로 세번 반복세척한 다음 러지우에 얇게 퍼놓아 48h동안 자연건조시켰다. 거름률은 약 94%였다.

아스파라긴산동(Ⅱ)착화합물의 물성분석 아스파라긴산동(Ⅱ)착화합물의 구조 및 조성, 분자량은 자외가시선분광광도계(《UV-2201》), 푸리에변환적외선분광기(《Nicolet 6700》), 원자흡광기(《PERKIN ELMER 5100-PC-ZL》), 자동원소분석기(《PI-2400》), 시차열분석기(《DTA-50》), 열무게분석기(《TGA-50》), 초고성능액체크로마토그래프-질량분석기(《AcquityTM UPLC-SQD2》)를 리용하여 확인하였다.

O_2^- 소거활성측정과 분석 시약은 모두 분석순으로서 아스파라긴산은 《REANAL》제품을, 비타민 B₂(리보플라빈), EDTA(에틸렌디아민테트라초산), NBT(니트로테트라졸리움청)은 《Sigma》제품을 리용하였다. 실험기구로서는 가시선분광광도계(《VIS-7220N》)를 리용하였다. 완충액들로는 0.05mol/L 레몬산완충액(pH 5.4~6.2), 0.05mol/L 린산완충액(pH 6.2~7.8), 0.05mol/L 트리스-HCl완충액(pH 7.8~9.0)을 리용하였다.

O_2^- 소거활성은 선행연구에 소개된 NBT법[2]으로 측정하였다.

초산소음이온라디칼(O_2^-)은 빛조건에서 비타민 B_2 의 자체산화에 의하여 생기는데 560nm에서 최대흡수파장을 가지는 NBT산화형의 양으로 측정된다. 반응용액의 체적은 3.5mL로, 반응용액의 조성은 $5.7\mu\text{mol/L}$ 비타민 B_2 , $43\mu\text{mol/L}$ NBT, 1.14mmol/L EDTA, 0.05mol/L 린산완충액(pH 7.8)으로 하였다.

O_2^- 소거률(%)은 다음의 공식에 의하여 계산하였다.

$$O_2^- \text{소거률} = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100$$

여기서 A_0 은 아스파라긴산동(II)착화합물이 존재하지 않을 때의 흡광도, A 는 아스파라긴산동(II)착화합물이 존재할 때의 흡광도이다.

결과 및 논의

아스파라긴산동(II)착화합물의 농도에 따르는 O_2^- 소거률변화 이미 알려진 방법[2]에 준하여 아스파라긴산동(II)착화합물의 농도에 따르는 O_2^- 소거률변화를 보았다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 O_2^- 소거률이 착화합물농도 $1.5\mu\text{g/mL}$ 까지는 선형적으로 증가하였지만 그 이상에서는 O_2^- 소거률이 크게 높아지지 않았는데 그것은 아스파라긴산동(II)착화합물농도가 일정한 한계이상으로 높아지면 착화합물분자들이 서로 가까이 접근하면서 활성기능단들이 가리워지거나 비타민 B_2 이 부족되는것과 관련될수 있다.

pH에 따르는 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거률변화 반응용액의 pH를 변화시키면서 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거률변화를 본 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거률은 pH 7.8에서 제일 높았다.

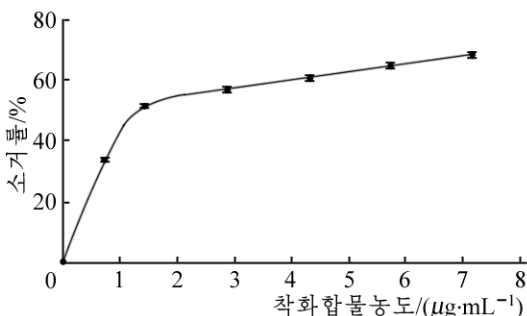


그림 1. 아스파라긴산동(II)착화합물농도에 따르는 O_2^- 소거률변화

반응조건: 비타민 B_2 $5.7\mu\text{mol/L}$, NBT $43\mu\text{mol/L}$, EDTA 1.14mmol/L , 0.015mol/L 린산완충액(pH 7.8), 온도 20°C , 반응시간 3min

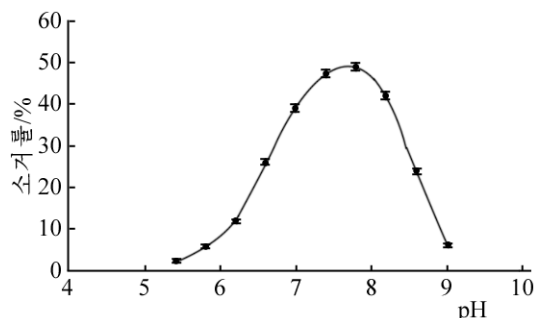


그림 2. pH에 따르는 아스파라긴산동(II) 착화합물의 O_2^- 소거률변화

반응조건: 비타민 B_2 $5.7\mu\text{mol/L}$, NBT $43\mu\text{mol/L}$, EDTA 1.14mmol/L , 착화합물농도 $1.4\mu\text{g/mL}$, 온도 20°C , 반응시간 3min

빛조임시간에 따르는 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거활성 착화합물농도를 $1.4\mu\text{g/mL}$ 로 하여 각이한 온도에서 빛조임시간에 따르는 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거를 변화를 본 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 O_2^- 소거율은 10°C 에서 4min, 20°C 에서 3min, 30°C 에서 2min까지 선형적으로 높아졌다. 따라서 온도에 따르는 O_2^- 소거율변화는 빛조임시간을 2min으로 하여 측정하였다. 선행연구[3]에서 반응시간을 1min으로 한것도 역시 선형구간에서 측정하기 위해서라고 보아진다.

한편 모든 그래프들에서 시간이 지남에 따라 초기에는 O_2^- 소거율이 선형적으로, 그후에는 점차적으로 증가하다가 감소하는 공통적인 특징이 나타났다. 초기에 O_2^- 소거율이 선형적으로 증가하는것은 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거속도가 일정한것과 관련되며 그후 O_2^- 소거율이 점차적으로 증가하는것은 O_2^- 소거속도가 처음보다는 떨어졌기때문이라고 볼수 있다. 이렇게 놓고볼 때 O_2^- 소거속도는 점차 작아져 최종적으로 0으로 될것이며 그래프는 시간축과 평행으로 될것이다. 그러나 그래프에서 보면 시간축과 평행이 아니라 감소되는 특성이 나타났다.

이것을 해명하기 위하여 아스파라긴산동(II)착화합물을 넣지 않고 각이한 온도에서 시간에 따르는 흡광도를 측정하였는데 그 결과는 그림 4와 같다.

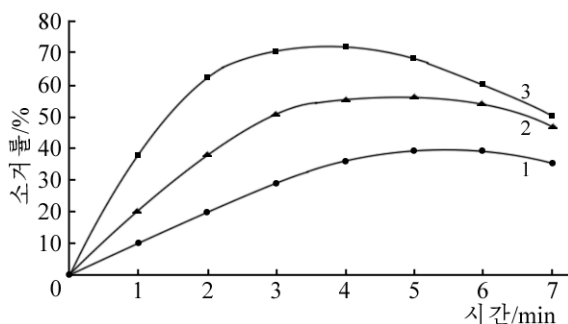


그림 3. 각이한 온도에서 빛조임시간에 따르는 O_2^- 소거율변화

1-3은 반응온도가 각각 10, 20, 30°C 일 때;
반응조건: 비타민 B_2 $5.7\mu\text{mol/L}$, NBT $43\mu\text{mol/L}$,
EDTA 1.14mmol/L , 0.015mol/L 린산완충액
(pH 7.8), 착화합물농도 $1.4\mu\text{g/mL}$

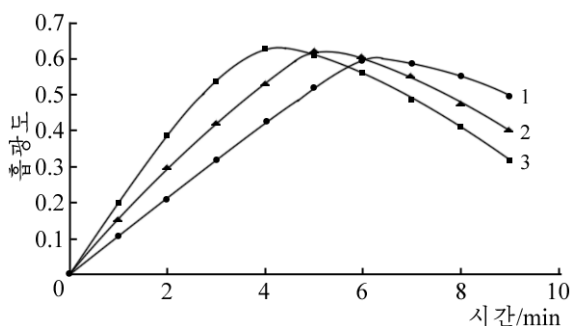


그림 4. 각이한 온도에서 시간에 따르는 O_2^- 소거율

1-3은 반응온도가 각각 10, 20, 30°C 일 때;
반응조건: 비타민 B_2 $5.7\mu\text{mol/L}$, NBT $43\mu\text{mol/L}$,
EDTA 1.14mmol/L , 0.015mol/L 린산완충액(pH 7.8)

그림 4에서 보는바와 같이 O_2^- 발생량을 보여주는 560nm에서의 흡광도가 처음에는 증가하다가 10°C 에서는 6min, 20°C 에서는 5min, 30°C 에서는 4min에서부터 감소하기 시작하였다. 이것은 O_2^- 과 반응하여 생긴 NBT산화형이 침전되면서 흡광도값이 작아지기때문이다. 따라서 착화합물을 넣었을 때 O_2^- 소거율이 일정한 시간이 지나서부터 감소하기 시작하는것은 NBT산화형이 침전되기 시작하는데 원인이 있을수 있다.

온도에 따르는 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거를변화 반응용액의 온도를 변화시키면서 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거률에 미치는 온도의 영향을 보았다.(그림 5)

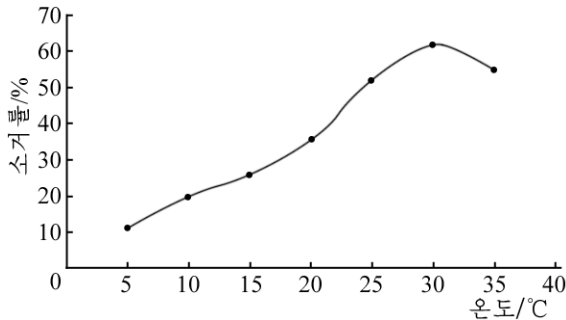


그림 5. 각이한 온도에서 시간에 따르는 O_2^- 소거률

반응조건: 비타민 B₂ 5.7 μ mol/L, NBT 43 μ mol/L, EDTA 1.14mmol/L, 0.05mol/L 린산완충액(pH 7.8), 착화합물농도 1.4 μ g/mL, 시간 2min

표에서 보는바와 같이 아스파라긴산동(II) 착화합물의 O_2^- 소거활성은 비타민 C에 비하여 약 4.6배 높았다. 실험결과는 아스파라긴산동(II)착화합물이 현저한 O_2^- 소거활성을 나타내는 SOD모의물로 작용할수 있다는것을 보여준다.

그림 5에서 보는바와 같이 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거률은 30°C까지는 높아지다가 35°C에서는 30°C때보다 감소하였다. 이것은 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거반응이 온도가 높아짐에 따라 빨리 진행되지만 35°C에서는 O_2^- 발생반응속도가 O_2^- 소거반응속도보다 더 빨리 진행되기때문일수 있다.

아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거활성 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거활성을 비타민 C와 비교한 결과는 표와 같다.

표. 아스파라긴산동(II)착화합물 O_2^- 소거활성

구분	IC ₅₀ /(μ g·mL ⁻¹)
아스파라긴산동(II)착화합물	1.4 \pm 0.1
비타민 C	6.5 \pm 0.2

온도 20°C, 반응시간 3min

맺 는 말

제조한 아스파라긴산동(II)착화합물의 O_2^- 소거활성은 비타민 C에 비하여 약 4.6배 더 높았으며 pH 7.8에서 제일 높았다.

참 고 문 헌

- [1] B. B. Поройков; Доклады российской академии наук, 379, 4, 548, 2001.
- [2] B. Beauchamp et al.; Anal. Biochem., 44, 276, 1971.
- [3] J. Zhang et al.; J. Clin. Biochem. Nutr., 47, 238, 2010.
- [4] J. S. Michael et al.; Neurobiology, 94, 3, 1997.
- [5] S. Papa et al.; Biochimie, 80, 821, 1998.
- [6] B. O. Villoutreix et al.; Prot. Sci., 7, 1317, 1998.
- [7] 李金 等; 北京联合大学学报, 15, 3, 62, 2001.
- [8] 袁瑾 等; 氨基酸和生物资源, 24, 4, 51, 2002.

주체104(2015)년 11월 5일 원고접수

Superoxide Anion($O_2^{\cdot-}$) Scavenging Characteristics of Copper-Aspartic Acid Complex

Hwang Chol Mi, Kang Myong Su

Aspartic acid and copper play an important role not only in several metabolic syntheses of crucial building blocks of organism such as proteins, nucleotides, enzymes etc but also in vitamin metabolism, urea cycle, energy metabolism, antioxidative defence system and so on.

Copper-aspartic acid complex is more absorbable and versatile. In this paper, the superoxide anion(one kind of active oxygen) scavenging ability of copper-aspartic acid complex was investigated. In addition, the result shown that its ability was about 4.6 times higher than the one of vitamin C.

Key words: superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$, copper-aspartic acid complex