

## N,N-Dimethylformamide 용매 중에서 Biliverdin의 전기화학적 거동

裴俊雄\* · 李興洛 · 朴泰明†

경북대학교 자연과학대학 화학과

†순천공업전문대학 환경공업과

(1993. 3. 15 접수)

## Electrochemical Behaviors of Biliverdin in N,N-Dimethylformamide

Zun Ung Bae\*, Heung Lark Lee, and Tae Myung Park†

Department of Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

†Department of Environmental Engineering, Suncheon Junior Technical College,

Suncheon 540-260, Korea

(Received March 15, 1993)

**요 약.** 비양성자성 용매인 *N,N*-dimethylformamide(DMF) 중에서 Biliverdin(BV)의 전기화학적인 환원거동을 직류폴라로그래프법, 순환전압전류법 및 정전위 전기량법으로 조사하였다. 또한 BV의 최종 환원생성물을 UV-Vis spectroscopy로 조사하였다. DMF 용매 중에서 BV는  $-0.71\text{ V vs. Ag/Ag}^+$  와  $-0.91\text{ V vs. Ag/Ag}^+$ 에서 2개의 환원파를 보였다. 각 환원파의 전류유형은 제 1환원파는 확산지배적인 전류였으며, 제 2환원파는 반응성 전류가 약간 포함된 확산전류이었다. 그리고 제 1단계의 환원과정은 비가역적이었다. 각 환원단계에 관여하는 전자수는 1개씩 이었으며, BV은 DMF 용매 중에서 1전자 2단계의 환원과정을 거쳐서 Bilirubin으로 환원되었다.

**ABSTRACT.** The electrochemical reduction behavior of Biliverdin (BV) in *N,N*-dimethylformamide solvent was studied by DC polarography, cyclic voltammetry and the controlled potential coulometry. The reduced product was identified by UV-Vis spectroscopy. In DC polarogram, two reduction waves of BV were founded. The half wave potentials of two reduction waves were  $-0.71$  and  $-0.91\text{ V vs. Ag/Ag}^+$  respectively. The current type of the 1st reduction wave was diffusion-controlled and the 2nd was diffusion current containing a little kinetic current. The 1st electrochemical reduction process was irreversible and BV reduced to Bilirubin.

### 서 론

Porphyrin과 metal-porphyrin 학물에 대한 전기화학적인 연구는 많이 수행되어져 있으나 담즙색소와 같은 open-chain tetrapyrrole 화합물에 대한 전기화학적인 연구는 많지 않다. 21,24-dihydrobilin-1,19-diones<sup>1</sup>, meso-bilirubin<sup>2</sup>, bilirubin<sup>3,4</sup>, 21,24-dihydro-3,8,12,17-tetraethyl 2,7,13,18-tetramethyl-1,19-dione<sup>5</sup> 등에 대한 전기화학적인 연구 등이 있을 뿐이다. Open-chain tetrapyrrole 구조를 갖는 Biliverdin(BV)은 heme의 catabolism에 있어서 중요한 역할을 한다. 즉 생체내에서 heme의 protoporphyrin

고리가 깨어져서 BV가 생기며 효소작용에 의한 환원과정을 거쳐서 간질환의 척도가 되는 Bilirubin (BR)으로 된다<sup>6~8</sup>. 따라서 BV의 전기화학적인 환원과정을 조사함으로서 heme catabolism을 구명하는데 많은 정보를 제공할 수 있을 뿐더러 BV를 정량하므로써 간질환의 정도를 예측하는데 전기화학적인 방법을 도입할 수도 있을 것이다.

이러한 BV에 대한 전기화학적인 연구로는 Norman 등<sup>9</sup>이 DMF 용액 중에서 BV의 산화과정을 조사하였으며, Moussa 등<sup>10</sup>은 DMSO 용액 중에서 BV가 산화되어 purpurin<sup>10</sup> 된다고 하였다. 그리고

BV의 전기화학적인 환원에 관한 연구는 Lohngi 등<sup>11</sup>이 DMF 용액 중에서 백금전극을 작업전극으로 쓸 때, 2전자 1단계의 환원과정을 거쳐 BR이 된다고 보고한 정도에 그치고 있다.

따라서 본 실험에서는 DMF 용매 중에서 수은전극 하에서의 BV의 환원거동을 보다 상세하게 조사하였다. 즉, 환원파의 전류유형 및 환원단계의 가역성여부, 그리고 각 환원단계에 관여하는 전자수와 최종 환원 생성물을 조사하였다.

## 실 험

**시 약.** 용매인 *N,N*-dimethylformamide(DMF)는 Thomas의 방법<sup>12</sup>에 따라 정제하였으며, 지지전해질인 tetraethylammonium perchlorate(TEAP)는 Coetzee의 방법<sup>13</sup>에 따라서 합성하고 정제하였다. 불순물 유무는 측정시마다 바탕시험을 하여 확인 후 사용하였다. 반응물질로 쓴 Biliverdin(BV)는 Sigma Co.로부터 구입한 특급시약을 그대로 썼다.

**장 치.** 실험에 사용한 폴라로그래프는 PAR Model 174 Polarographic Analyzer와 PAR Model 175 Universal programmer를 사용하였다. 각 환원단계에 관여하는 전자수는 PAR Model 380 controlled potential coulometry system을 사용하여 구하

였다. 직류폴라로그램과 순환전압전류그램의 측정은 3전극 방식을 이용하여 용액저항에 의한 ohmic IR 강하를 자동보상하였으며, 작업전극으로는 수은전극, 보조전극으로는 백금선을, 기준전극으로는 Ag/Ag<sup>+</sup> (0.1 M DMF) 전극을 썼으며, 스펙트럼 측정에는 Shimadzu UV-260 double-beam spectrophotometer를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**BV의 폴라로그램.** DMF 용액 중에서 적하수은 전극을 작업전극으로 써서 -0.4~ -1.2 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>의 가전압 범위에서  $5.0 \times 10^{-4} M$ 의 BV의 직류 폴라로그램과 순환전압전류곡선을 측정하여 Fig. 1과 2에 나타내었다. 여기서 GO는 galvanic current가 0인 점을 나타낸다. 이 그림에서 알 수 있는 바와 같이 BV은 DMF 용매 중에서 -0.71과 -0.91 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>에서 2개의 환원파를 나타내었다.

**환원전류의 유형.** BV이 환원될 때 나타나는 전류의 유형을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 곧 수은주의 높이(*h*)를 변화시켜 가면서 환원파의 환원전류를 구하여 Table 1에 나타내었다. 수은주의 높이가 50~70 cm 범위에서 제 1환원파의  $i_d/h^{1/2}$ 의 값이 일정하므로 확산지배적인 전류하고 할 수 있으나, 제 2환원파는  $i_d/h^{1/2}$ 의 값이 일정하기 않으므로 반응성 전류가 약간 포함된 것으로 생각된다.

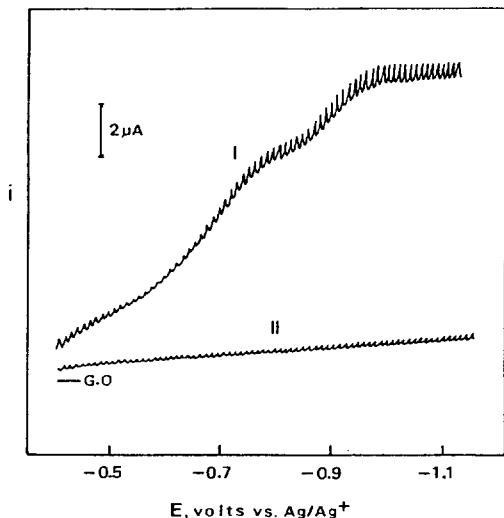


Fig. 1. DC polarogram of  $5.0 \times 10^{-4} M$  Biliverdin (I) and residual current (II) in  $5.0 \times 10^{-2} M$  TEAP-DMF solution at 25°C.

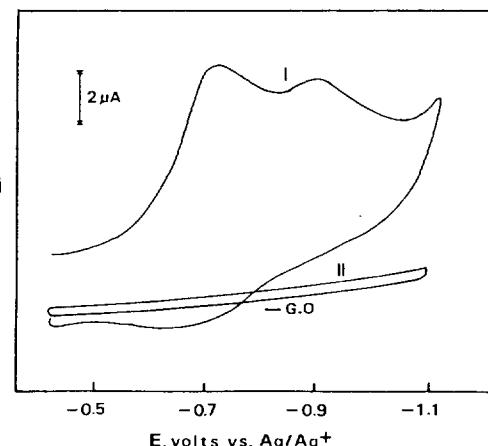


Fig. 2. Cyclic voltammogram of  $5.0 \times 10^{-4} M$  Biliverdin (I) and residual current (II) in  $5.0 \times 10^{-2} M$  TEAP-DMF solution, scan rate: 200 mV/sec.

Table 1. DC polarographic  $i_d/h^{1/2}$  ( $\mu\text{A}/\text{cm}^{1/2}$ ) values of Biliverdin<sup>a</sup>

$h$ (cm)	$i_d/h^{1/2}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^{1/2}$ )	
	1st wave	2nd wave
50	0.57	0.20
55	0.55	0.23
60	0.56	0.25
65	0.53	0.29
70	0.54	0.33
75	0.52	0.38

<sup>a</sup>  $5.0 \times 10^{-4} M$  Biliverdin in  $5.0 \times 10^{-2} M$  TEAP-DMF solution at 25°C.

Table 2. Temperature coefficient of DC polarographic current of Biliverdin<sup>a</sup>

Reduction step	Temp. coefficients ( $1/i \cdot di/dt$ ) (%)	Temp. range (°C)
1st wave	1.43	20~30
2nd wave	3.25	

<sup>a</sup>  $5.0 \times 10^{-4} M$  Biliverdin in  $5.0 \times 10^{-2} M$  TEAP-DMF solution at 25°C.

또 실험온도를 20~30°C로 바꾸면서 한계전류값을 구하여 온도계수( $1/i \cdot di/dt$ )를 계산하여 Table 2에 나타내었다. Table 2로부터 DMF 용액 중에서 BV의 제1환원파의 온도계수는 1.51%로서 환원전류는 확산지배적이라 할 수 있으나, 제2환원파는 온도계수가 3.25%이므로 반응성 전류가 약간 포함된 것으로 생각된다<sup>14</sup>.

한편, 순환전압전류법으로도 환원전류의 유형을 조사할 수 있다. 전류반응이 가역적이든 비가역적이든 순환전압전류곡선에서의 봉우리전류( $i_p$ )는 반응물질의 농도( $C$ )와 전위주사속도의 평방근( $v^{1/2}$ )에 비례한다<sup>15</sup>. 곧, BV의 농도를  $1.0 \times 10^{-4} M$ 에서  $7.0 \times 10^{-4} M$ 까지 바꾸어 가면서 얻은 순환전압전류곡선으로부터 봉우리전류( $i_p$ )를 측정하여 봉우리전류( $i_p$ )와 농도와의 관계를 도시하여 Fig. 3에 나타내었다. 또 전위주사속도( $v$ )를 50 mV/sec에서 700 mV/sec로 바꾸어 가면서 얻은 순환전압전류곡선으로부터 봉우리전류( $i_p$ )를 측정하여  $i_p$ 와  $v^{1/2}$ 의 관계를 도시하여 Fig. 4에 나타내었다. 이들 그림으로부터 알 수 있는 바와 같이 BV의 제1환원파는 BV의 농도와 전위

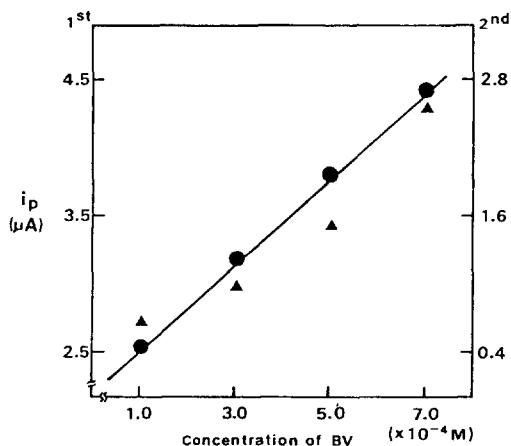


Fig. 3. Relationship between peak current and concentration of Biliverdin in TEAP-DMF solution at 25°C. Scan rate: 200 mV/sec, ●: 1st wave, ▲: 2nd wave.

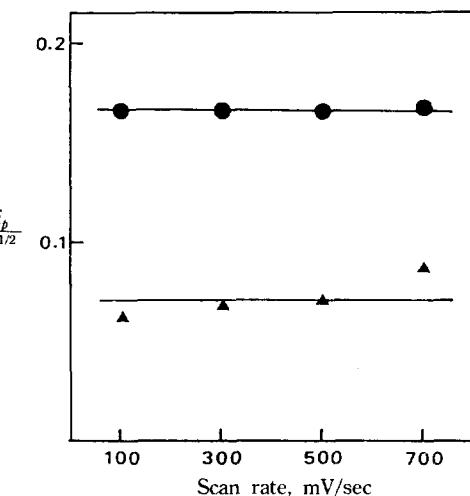


Fig. 4. Peak current function ( $i_p/v^{1/2}$ ) with various scan rates for  $5.0 \times 10^{-4} M$  Biliverdin in  $5.0 \times 10^{-2} M$  TEAP-DMF solution at 25°C, ●: 1st wave, ▲: 2nd wave.

주사속도의 평방근에 비례하는 관계가 성립하였으나, 제2환원파는 비례관계에서 벗어났다. 이상의 여러 실험결과들을 종합해 보면, DMF 용매 중에서 BV의 제1환원전류는 확산지배적인 전류이며, 제2환원전류는 반응성 전류가 포함된 확산전류임을 알 수 있다.

환원반응에 관여하는 전자수의 결정. BV의 환원단계에 관여하는 전자수는 BV의 DMF 용액을

Table 3. Number of electron of Biliverdin determined at reduction step by controlled potential coulometry<sup>a</sup>

Controlled potential	<i>n</i>
-0.83 V vs. Ag/Ag <sup>+</sup>	1
-1.10 V vs. Ag/Ag <sup>+</sup>	1

<sup>a</sup>  $5.7 \times 10^{-4} M$  Biliverdin in  $5.0 \times 10^{-2} M$  TEAP-DMF solution, sample volume; 10 mL.

Table 4. Transfer coefficient ( $\alpha$ ) of Biliverdin at the first reduction step at 25°C

Reduction step	Transfer coefficient ( $\alpha$ )	
	$E_p$ vs. log $V$	$\log i_p$ vs. $E_p$
-0.71 V vs. Ag/Ag <sup>+</sup>	0.33	0.28

조절전위 전기분해하여 구하였다. 곧  $5.07 \times 10^{-4} M$ 의 BV를 포함하는 DMF 용액 10 mL를 전해용기에 넣고 질소를 통과시키면서 각 환원단계의 한계전류를 나타내는 전위인 -0.83과 -1.10 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>에서 전해한 뒤, 이 용액을 완전히 전기분해하는데 소비된 전기량( $Q$ )을 digital coulometer로 측정하여, 이 값을 Faraday 식에 적용함으로서 환원단계에 관여하는 전자수를 구하여 Table 3에 나타내었다. 이때 작업전극으로는 Hg-pool을 썼으며, 기준전극은 Ag/Ag<sup>+</sup>를 보조전극으로는 백금을 사용하였다. Table 3의 실험결과로부터 BV의 각 환원단계에는 1개씩의 전자가 관여함을 알 수 있다.

**환원파의 가역성.** DMF 용매 중에서 BV 환원파의 가역성을 순환전압전류법으로 조사하였다. 곧, 전위주사속도를 50 mV/sec에서 700 mV/sec로 바꾸어 가면서  $5.0 \times 10^{-4} M$  BV의 순환전압전류곡선을 그리고, 이를 그림에서 전위주사속도의 변화에 따른 봉우리전위( $E_p$ )와 봉우리전류( $i_p$ )의 변화를 측정하였다. 이를 측정치로부터  $E_p$ 와  $\log V$ 를 도시하여 얻은 직선의 기울기로부터 구한 전이계수( $\alpha$ )와  $\log i_p$ 와  $E_p$ 를 도시하여 얻은 직선의 기울기로부터 구한 전이계수( $\alpha$ )를 Table 4에 나타내었다. Table 4에서 알 수 있는 바와 같이 DMF 용매 중에서의 BV의 제 1환원단계의 가역성은 좋지 않았다<sup>16</sup>.

**환원생성물의 확인.** DMF 용매 중에서 BV의 최종환원생성물을 확인하기 위하여  $1.96 \times 10^{-5} M$ 의

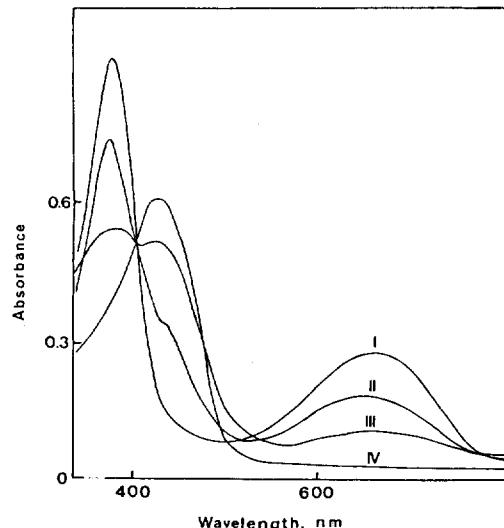


Fig. 5. Change of UV-Vis spectra of  $1.0 \times 10^{-5} M$  Biliverdin in  $1.0 \times 10^{-3} M$  TEAP-DMF solution with electrolysis time, I: 0 min, II: 60 min, III: 120 min, IV: 180 min.

BV 용액 10 mL를 전해용기에 넣고 제 2환원단계의 한계전위인 -1.10 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>에서 전해시간을 바꾸어 가면서 전기분해하여 UV-Vis 스펙트럼의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 이 그림으로부터 알 수 있는 바와 같이 650 nm와 385 nm에서의 BV의 흡수봉우리는 전해가 되어짐에 따라 사라지고 452 nm에서 새로운 흡수봉우리가 나타났다. 이 흡수봉우리는 BR의 흡수봉우리와 일치한다<sup>17</sup>. 따라서 BV는 1전자 2단계의 환원과정을 거쳐서 BR로 환원됨을 알 수 있다.

## 결 론

*N,N-dimethylformamide*(DMF) 용액 중에서 수은전극을 작업전극으로 썼을 때, Biliverdin은 2단계의 환원과정을 거치며, 환원 반파전위는 -0.71과 -0.91 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>이었다. 각 환원단계에서는 1개씩의 전자가 관여하였으며, 제 1환원단계에서는 비가역적이었다. 제 2환원파는 반응성 전류가 약간 포함된 확산전류이었다. 그리고 DMF 용매 중에서 BV는 1전자 2단계의 환원과정을 거쳐서 Bilirubin으로 환원되었다.

본 연구는 과학재단의 연구비 지원으로 수행되었  
기에 이에 감사함을 전합니다.

### 인용 문헌

1. J. H. Fuhrhop, A. Slalck, J. Subramanina, C. Mengeren, and S. Besecke, *Annalen*, **1131** (1975).
2. B. Tvaroha, *Cas. Lek. Cesk.*, **100**, 27 (1961).
3. J. D. Van Norman, *Anal. Chem.*, **45**(1), 173 (1973).
4. Ch. Slifstein and M. Ariel, *J. Electroanalyt. Chem. interfacial Electrochem.*, **48**, 447 (1973).
5. F. Eivazi, W. M. Lewis, and K. M. Smith, *J. Chem. Soc., Perkin I*, 544 (1979).
6. G. Kikuchi, T. Yoshida, *Mol. Cell. Biochem.*, **53/54**, 163 (1983).
7. J. R. Chowdhury, A. W. Wolkoff, I. M. Atis, "The Liver", Chap. 18, I. M. Arias, H. Popper, D. A. Schachter, eds., Raven Press, New York, 1982.
8. A. K. Brown, A. F. McDonagh, *Adv. Pediatr.*, **27**, 341 (1980).
9. J. D. Van Norman and R. Szentirmay, *Anal. Chem.*, **46**(11), 1456 (1974).
10. F. Moussa, G. Kanoute, C. Herrenknecht, P. Levellain, and F. Trivin, *Anal. Chem.*, **60**, 1179 (1988).
11. P. Longhi, P. Manitto, D. Monti, and S. Rondinini, *Anal. Chimica Acta*, **26**(4), 541 (1981).
12. A. B. Thomas and E. G. Rochow, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1843 (1957).
13. I. M. Kolthoff and J. F. Coetzee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1852 (1957).
14. P. Zuman, "Organic polarographic Analysis", Pergamon press, London, 1964.
15. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964).
16. P. H. Given and M. E. Peover, "Advances in Polarography", Vol. III, p. 984, Pergamon, Oxford, 1960.
17. B. W. Perry, B. T. Doumas *et al.*, *Clin. Chem.*, **29**(2), 297 (1983).