

Protocatechuic Acid의 카드뮴 착물반응에 대한 최적농도(Notes)

이정호 · 신선우* · 백승화*[#]

송호대학 자연건강관리과, *원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과
(Received July 21, 2008; Revised November 5, 2008)

Optimum Concentration of the Cd (II)-Protocatechuic Acid Complex

Jeong Ho Lee, Sun Woo Shin* and Seung Hwa Baek*[#]

Department of Natural Health Management, Songho College, Hoengseong 225-801, Korea

*Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract — The interaction of cadmium (II) ion with protocatechuic acid (H_3PA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were investigated in aqueous solution at different pH. The protocatechuic acid and EDTA/cadmium stoichiometries for cadmium (II) binding have been determined by UV-vis spectrophotometric method. The complexation of Cd (II) ion with protocatechuic acid was formed in solution. Among the two potential sites of chelation present in the protocatechuic acid structure, the carboxylic function presents higher complexation power toward Cd (II). 1 : 1 Cd (II)-complex had a maximum absorbance and showed the bathochromic shift of the long-wavelength band of the UV-vis spectra in the alkaline pH when interacted with protocatechuic acid in 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) buffer. These results suggest that Cd (H_2PA)⁺ complex has the optimal condition of chelation in buffer solution at 64.22 μM protocatechuic acid ($A=1.01455$).

Keywords □ protocatechuic acid, bathochromic shift, Cd (II)-complex, UV-vis spectrophotometric method

산업의 발달과 더불어 산업폐기물도 증가되고, 자동차등의 증가로 인한 대기오염, 공장 폐수 등에 의한 수질오염, 과다한 농약의 살포 등으로 인하여 자연환경의 오염도 증가되고 있다.^{1,3)} 세계의 카드뮴 생산량은 1910년부터 매년 증가하고 있으며, 모두 회수가 불가능하여 환경오염의 원인이 된다.⁴⁾ 카드뮴은 일반적으로 사람이 출생할 때에는 인체에 존재하지 않지만, 연령이 증가함에 따라 점차적으로 체내에 축적된다. 체내 축적량의 50~80%가 간장과 신장에 존재하며, 혈액에 존재하는 카드뮴은 70% 이상이 적혈구에 존재한다.⁵⁾ 카드뮴은 약 16년의 반감기를 가지고 있고, 치사량이 높으며, 쉽게 배설되지 않는다. 신생아와 어린이는 성인보다 카드뮴 흡수 및 보유능력이 높아 cadmium 중독에 더욱 민감하다.⁵⁻¹⁰⁾ 카드뮴은 주로 음식물의 섭취, 호흡, 피부의 흡수 등으로 인하여 체내에 유입되어 축적되는데, 1일 섭취하는 음식물에는 약 1~50 μg , 담배 한 개비에는 약 1~2 μg 정도 함유되어 있다.^{7,8,11)} 카드뮴이 인체에 흡수되면 금속이온 또

는 혈장단백질과 결합된 상태로 간장, 신장, 신경계, 폐, 고환 등의 장기에 축적되어 생리적, 기능적 장애와 더불어 형태적, 유전적, 생화학적 변화를 일으켜 각종 질병을 유발한다.^{4,12)} 일반적으로 카드뮴 독성에 의한 급성중독은 기침, 흉부압박감, 구토증, 호흡곤란, 식욕부진, 고열, 설사, 복통, 오한 등이 나타나고 만성중독 증상은 폐기증, 신장이상, 단백뇨, 근육의 무력화, 고혈압, 호르몬의 이상, 돌연변이성 기형유발과 같이 후세대까지 영향을 일으키게 된다.^{4,12)} 그러나 카드뮴의 체내에 축적된 양이나 중독을 초기에 발견하기 어려워 환경오염이 심화되고 있는 현대사회에서 카드뮴의 오염방지와 중독예방에 대한 문제는 매우 중요한 실정이다. 즉, 카드뮴이 체내에 유입되면 적혈구와 결합하여 혈중 내로 이행되어 혈장내에서 고분자 단백질질, 특히 알부민과 결합되고, 일부는 thionein과 결합하여 metallothionein(MT)을 형성하여 각 장기에 이행되어진다.^{1,13)} 카드뮴의 신진대사 과정에서 중요한 역할을 하는 MT는 분자량이 6,600으로 시스테인을 다량 함유하고 있는 수용성 금속결합단백질로 sulfhydryl group, Zn, Hg, Cu 등의 중금속들로부터 간장과 신장 등을 보호한다.^{14,15)} 중금속, stress, glucocorticoid 등에 의해서 유리되며,^{16,17)} 정상조직에서도 함유되어 있는데 카드뮴이 체내에 유입되어도 독성증

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4893
(E-mail) shbaek@wonkwang.ac.kr

상이 나타나지 않는 것은 MT 형성에 기인한다고 알려지고 있다.⁵⁾ 즉, 다시 말하면 MT에 포함(胞合)되지 않은 카드뮴이 체내에 전달되면 독성증상이 발현된다.¹⁸⁾ MT는 Margoshes 등¹⁷⁾에 의해 말의 신장 피질에서 카드뮴을 다량 함유한 저분자량의 단백질을 최초로 분리하였으며, Piscator¹⁸⁾가 카드뮴을 투여한 토끼의 간에서 MT를 분리 정제하여 중금속에 대한 유도 반응물질로 합성된다고 하였다. 최근에 EDTA를 이용하여 인회석에서 카드뮴을 제거하여 인회석의 품질을 향상시키거나,¹⁹⁾ 토양속에 있는 카드뮴과 같은 중금속을 비료와 함께 넣어 토양의 오염을 개선하고, 재활용할 수 있는 연구가 보고되고 있다.²⁰⁾ Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid)는 식물에 함유되어있는 방향족 화합물로서 생리활성을 갖고있기 때문에 많은 연구자들의 관심의 대상이었다.^{21,22)} 식품, 음료의 주요한 항균 보존제, 산업에서 부식억제, 자동차엔진의 부동액 첨가제로서 다양하게 이용되고 있다.²³⁾ Protocatechuic acid는 humic substance의 전구물질로 금속과 착물형성을 잘 할 수있는 화합물로 알려져 있으며, 최근에 알루미늄(III)-protocatechuic acid 착물이 catechol function에서 이루어진다는 것은 카르복실기의 관능기보다 낮은 에너지의 장벽과 Gibbs 자유 에너지에 기인한다고 보고하였다.²⁴⁾ Protocatechuic acid는 가능한 2개의 chelating site에서 경쟁반응할 수 있는 화합물로서 카르복실기와 dihydroxyl 관능기들을 갖고 있으며(Fig. 1), Al(III)과는 다르게 카드뮴(II)은 protocatechuic acid와 regioselectivity하게 carboxylic function에서 두자리 리간드로서 착물형성이 이루어지리라 예측된다.²⁵⁾ 이에 본 연구는 정상세포에서 중금속 독성을 경감시킬 수 있는 EDTA와 protocatechuic acid의 최적농도와 여러 가지의 pH 수용액의 조건하에서, 카드뮴(II) 착물의 형성능력에 대한 화학량론적 관계를 확립하고자, 카드뮴(II) 착물의 최적조건에 대한 농도를 측정하였기에 보고하는 바이다.

실험 방법

시약 및 기기

UV-vis Spectrophotometer는 Hewlett Packard사의 model

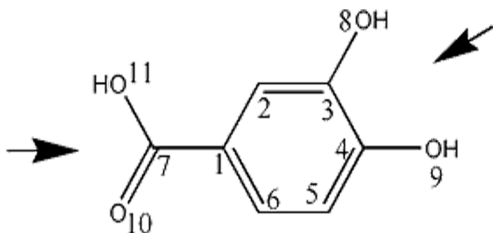


Fig. 1 - Representation and atomic numbering adopted for protocatechuic acid (IUPAC nomenclature). The arrows indicates the potential chelating sites.

HP 8453A를 사용하여, 시료를 일정한 농도로 methanol에 녹인 후 190~700 nm까지 scanning하여 spectrum을 얻었다. 카드뮴 착물의 분광 화학적 측정은 CdCl₂, NaOH, NH₃, NH₄Cl, NaOAc·3H₂O, CH₃COOH, HCl, protocatechuic acid EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) 등의 화합물을 Aldrich Co. 구입하여 사용하였다.

시료의 조제 및 처리

카드뮴과 시료의 착물을 측정하기 위한 pH 용액은 조제하여 사용하였으며,^{26,27)} 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 10⁻²~10⁻⁵ mg/ml의 농도로 희석하여 실험하였으며, 카드뮴(CdCl₂, Sigma)은 사용 당일에 증류수로 녹여 1,000 μM의 농도를 stock solution으로 하여 필요한 농도를 희석하여 사용하였다.

카드뮴 용액

CdCl₂ 1.833 mg을 1.0×10⁻⁶ M NaOH(pH 8.0) 용액(1 ml)에 녹여 1.0×10⁻² M CdCl₂ 용액이 되도록 조제한 후, 다시 1.0×10⁻² M CdCl₂ 용액(1 ml)에 1.0×10⁻⁶ M NaOH(pH 8.0) 용액(9 ml)를 첨가하여, 1.0×10⁻³ M CdCl₂ 용액을 희석하여 CdCl₂ 용액을 농도별로 조제하였다.

위의 방법과 같이 1.0×10⁻² M NH₃(pH 10.6) 용액, 0.2 M NH₃ - 0.2 M NH₄Cl(pH 8.0) 용액, 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH₃COOH(pH 4.0) 용액, 1.0×10⁻⁴ M CH₃COOH(pH 4.5) 용액, 1.0×10⁻⁴ M HCl(pH 4.0) 용액을 희석하여 CdCl₂ 용액을 농도별로 조제하였다.

Protocatechuic acid 용액

Protocatechuic acid 1.541 mg을 1.0×10⁻⁶ M NaOH(pH 8.0) 용액 1 ml에 녹여 1.0×10⁻² M protocatechuic acid가 되도록 조제한 후, 다시 1.0×10⁻⁴ M protocatechuic acid 농도가 되도록 1.0×10⁻⁶ M NaOH(pH 8.0) 용액으로 희석하여 용액의 pH를 유지시켰다. 위와 같은 방법으로, 1.0×10⁻² M NH₃(pH 10.6) 용액, 0.2 M NH₃ - 0.2 M NH₄Cl(pH 8.0) 용액, 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH₃COOH(pH 4.0) 용액, 1.0×10⁻⁴ M CH₃COOH(pH 4.5) 용액, 1.0×10⁻⁴ M HCl(pH 4.0) 용액으로 1.0×10⁻⁴ M protocatechuic acid 용액을 조제하였다.

EDTA 용액

EDTA 3.362 mg을 1.0×10⁻⁶ M NaOH(pH 8.0) 용액 1 ml에 녹여 1.0×10⁻² M 농도의 EDTA 용액이 되도록 조제한 후, 다시 1.0×10⁻⁴ M EDTA의 농도가 되도록 1.0×10⁻⁶ M NaOH(pH 8.0) 용액으로 희석 조제하여 용액의 pH를 유지시켰다. 위와 같은 방법으로 1.0×10⁻² M NH₃(pH 10.6) 용액, 0.2 M NH₃ - 0.2 M

NH_4Cl (pH 8.0) 용액, 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH_3COOH (pH 4.0) 용액, 1.0×10^{-4} M CH_3COOH (pH 4.5) 용액, 1.0×10^{-4} M HCl(pH 4.0) 용액으로 1.0×10^{-4} M EDTA 용액을 조제하였다.

카드뮴 착물의 분광화학적 측정

모든 스펙트라 측정은 실험용액의 액성 즉, pH 농도를 유지시켰으며, 온도는 $17 \sim 20^\circ\text{C}$ 에서 실시하였다. 흡수 스펙트라의 측정범위는 190~700 nm 범위에서 측정하였으며, 흡수분광학적 방법에 의한 복합체의 결합비의 결정은 몰비법을 사용하였다.²⁸⁾ 몰비법은 한 성분의 농도를 고정하고 다른 한 성분의 농도를 연속적으로 변화시켜 흡광도를 측정하는 것 즉, $[\text{M}]/[\text{L}]$ 을 바꾸면서 착물의 최대흡수 파장에서 흡광도를 측정하여 흡광도 변화와 반응물의 몰비를 도출하였다.²⁹⁾

결과 및 고찰

Protocatechuic acid, EDTA와 카드뮴(II)에 대한, 카드뮴의 착물형성을 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 여러 가지의 pH 수용액의 조건하에서 시료와 카드뮴의 농도를 변화시키면서, 흡광도를 190~700 nm 파장 범위에서 측정하여, 카드뮴 착물의 화학량론과 일치하는 조성에서 최대 흡광도를 얻었으며, Mole ratio=[cadmium]/[sample]방법으로 시료와 카드뮴의 결합관계와 농도에 대한 ligand-to-cadmium charge transfer에 기인된 스펙트라의 변화를 고찰하였다.^{28,30)}

Protocatechuic acid

이 등³¹⁾은 어성초에서 분리한 quercitrin을 이용하여, 0.2 M NH_3 -0.2 M NH_4Cl pH 8.0 용액에서 quercitrin과 카드뮴(II)간의 1:1 카드뮴착물의 형성농도는 $53.52 \mu\text{M}$ 임을 근거로, NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴독성에 대한 세포의 재생효과가 $53.52 \mu\text{M}$ quercitrin에서 MTT 흡광도가 통계적으로 유의성있는 해독 경감효과가 관찰되었다. 이는 세포의 형태학적인 조건에서도 세포의 세포의 재생이 뚜렷함을 나타냈다. 이러한 연구결과를 바탕으로, protocatechuic acid(3,4-di-hydroxybenzoic acid)과 카드뮴을 이용하여, 1.0×10^{-6} M NaOH(pH 8.0) 용액에서는 226 nm와 270 nm에서 등흡광점이 나타났으며, 228 nm 이후에서 mole ratio가 증가함에 따라, 흡광도가 hyperchromic effect가 관찰되었으며, 271 nm 이후에서는 hypochromic effect로 나타났다. 흡수 spectrum은 $\lambda_1=291$ nm와 $\lambda_2=251$ nm에서 흡수대가 나타났으며, 이들 반응과정에서 나타난 두 등흡광점은 중간단계의 활성화 착물로 생각된다. 253 nm 이후에서는 몰비가 증가할수록 흡광도는 hyperchromic effect 현상이 나타났다. 254 nm에서 나타난 새로운 흡수 스펙트럼은 알칼리 용액 조건에서 카드뮴(II)과 protocatechuic acid가 1:1로 착물이 형성되는 것을 알 수 있었

으며, 착물의 흡광도와 몰흡광계수를 이용하여, protocatechuic acid와 카드뮴(II)이 1:1로 착물이 형성될 때의 농도가 $64.41 \mu\text{M}$ 임을 알 수 있었다.³¹⁾ 1.0×10^{-2} M NH_3 (pH 10.6) 용액에서는 254 nm에서 $64.29 \mu\text{M}$ 의 농도로 카드뮴(II)과 protocatechuic acid 이 1:1로 착물이 형성되었으며, 1.0×10^{-6} M NaOH(pH 8.0) 용액에서 관찰된 파장과 큰 차이없이, 227 nm와 271 nm에서 등흡광점이 관찰되었다. 254 nm 이후에서 mole ratio가 증가할수록 흡광도는 hyperchromic effect를 나타냈다가, 292 nm 이후에서는 mole ratio가 증가할수록 흡광도는 hypochromic effect로 나타났다. $\lambda_1=293$ nm와 $\lambda_2=255$ nm에서 새로운 흡수대가 나타났다. 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) 완충용액에서는 206 nm 이후에 mole ratio가 증가할수록 흡광도가 hyperchromic effect를 나타냈고, $\lambda_1=293$ nm와 $\lambda_2=253$ nm에서 새로운 흡수대가 나타났다. 흡광도가 227 nm와 272 nm에서 등흡광점이 관찰된 것은 이들 반응과정에서 나타난 중간단계의 활성화 착물이라 생각된다. 253 nm에서 $64.22 \mu\text{M}$ protocatechuic acid에서 카드뮴(II)과 1:1로 착물이 형성되었다. 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) 완충용액은 다른 염기성용액에서 보다 낮은 농도($64.22 \mu\text{M}$)에서 카드뮴 착물을 형성되는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).³¹⁾ 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH_3COOH (pH 4.0) 용액에서는 228 nm와 270 nm에서 등흡광점이 관찰되었고, 253 nm에서 카드뮴(II)

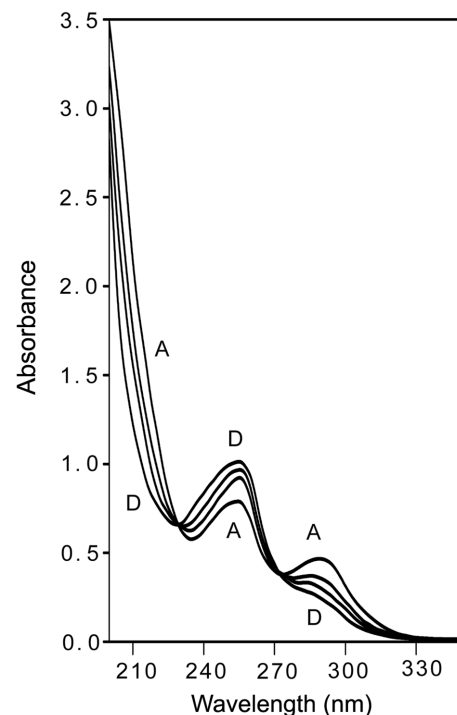


Fig. 2 – Electronic absorption spectra of $50 \mu\text{M}$ protocatechuic acid in 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) in the presence of various concentrations of cadmium (II) at 253 nm. R = [cadmium]/[protocatechuic acid]; R=0.0 (A), 0.6 (B), 0.8 (C), and 1.0 (D).

과 protocatechuic acid가 1:1로 착물이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 착물의 흡광도와 몰흡광계수를 이용하여, 이때의 농도가 63.27 μM 인 것을 알 수 있었다. 234 nm 이후에서는 농도가 증가할수록 흡광도도 hyperchromic effect 현상을 나타냈으며, 273 nm 이후에서는 농도가 증가할수록 흡광도는 hypochromic effect로 나타났고, $\lambda_1=295$ nm와 $\lambda_2=254$ nm 이후에서 새로운 흡수대가 나타났다. 1.0×10^{-4} M CH_3COOH (pH 4.5) 용액에서는 248 nm에서 protocatechuic acid와 카드뮴(II)이 1:1로 착물이 형성되는 것을 알 수 있었으며, 착물의 흡광도와 몰흡광계수를 이용하여, 이때의 농도가 59.32 μM 인 것을 알 수 있었고, 220 nm와 270 nm에서 등흡광점이 관찰되었다. 249 nm 이후에서는 농도가 증가할수록 흡광도도 hyperchromic effect로 나타났으며, 271 nm 이후에 농도가 증가할수록 흡광도는 hypochromic effect 현상을 나타냈다. $\lambda_1=290$ nm와 $\lambda_2=245$ nm 이후에서 새로운 흡수대가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 강산인 1.0×10^{-4} M HCl (pH 4.0) 용액에서는 220 nm와 268 nm에서 등흡광점이 관찰되었으며, 245 nm에서 카드뮴(II)과 protocatechuic acid가 1:1로 착물이 형성되었으며, 착물의 흡광도와 몰흡광계수를 이용하여 이때의 농도가 58.36 μM 인 것을 알 수 있었다.³¹⁾ $\lambda_1=285$ nm와 $\lambda_2=244$ nm 이후에서 새로운 흡수대가 나타났다. Protocatechuic acid에 카드뮴(II)을 농도별로 첨가하면, 스펙트라가 변화하는 현상은 카드뮴(II)과 protocatechuic acid의 착물 형성에 의한 것으로 생각되며, pH가 증가할수록 흡수 스펙트럼이 bathochromic effect되는 현상이 나타났다. 강산인 1.0×10^{-4} M HCl(pH 4.0) 용액의 경우, 카드뮴 착물의 최적농도(58.36 μM)는 산성용액에서

낮은 농도이며, 산과 염기의 수용액에서도 가장 낮은 농도로 측정되었으며, 가장 낮은 흡광도가 관찰된 것은 Al(III)과는 달리, 카드뮴(II)과 protocatechuic acid이 착물을 형성할 수 있는 두자리 리간드를 갖는 carboxylic의 deprotonation반응을 억제하는 것으로 생각된다(Table I, Figs. 2와 3).^{25,32-34)} Fig. 4는 pH 변화에 따라, 50 μM protocatechuic acid과 카드뮴(II)과 1:1로 착물이 형성되는 흡광도를 mole ratio method로 도시한 것이며, 카드뮴(II)과 protocatechuic acid의 mole ratio가 1.0이 되면, 흡광도의 변화가 최대가 되는 것을 알 수 있었다. 산성용액에서 Al(III)과 protocatechuic acid 및 caffeic acid의 알루미늄(III)착물은 catechol function의 두자리 리간드로서 five-membered ring으로 carboxylic function의 four-membered보다 낮은 에너지 장벽과 E의 낮은 에너지값으로 알루미늄(III)착물을 형성하지만,^{24,32)} 납(II)-caffeic acid 착물에서 carboxylate 그룹이 catechol 그룹보다 더 큰 착물형성 능력을 갖고 있으며, $[\text{Pb(II)}]/[\text{H}_2\text{CA}]$ 의 1:1 착물을 형성한다고 보고하였다.²⁵⁾ Boilet 등²⁵⁾의 연구결과에 의하면, 카드뮴(II) 착물은 protocatechuic acid의 carboxylic function에 의하여 두자리 리간드로 hemidirected distribution으로 안정된 1:1 분자구조 착물을 형성하는 것으로 생각되며, 1단계는 산 염기 반응 나타내고, 2단계는 착물반응 즉, 치환반응을 나타냈다. 카드뮴(II) 이온과 protocatechuic acid의 carboxylic function의 두자리 리간드(bidentate ligand)와 비대칭 고리를 형성하여, 안정한 카드뮴 착화합물 $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{PA})^+]$ 을 형성하였으리라 생각된다. Cadmium(II)-protocatechuic acid 착물에 대한 분광학적인 연구는 계속할 필요가 있으리라 사료된다(Table I).³⁵⁻³⁷⁾

Table I - Spectral parameters of protocatechuic acid and its cadmium complex in aqueous of solution at different pH

pH Solvent		0.0 (A)	0.2	0.4	0.6 (B)	0.8 (C)	1.0 (D)	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
1.0 $\times 10^{-6}$ M NaOH pH 8.0	A	0.78601	0.83115	0.87680	0.92132	0.96701	1.01251	0.98013	0.94683	0.91236	0.87856	0.84483
	λ (nm)	254	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253
	C (μM)		52.87	55.78	58.61	61.51	64.41	62.35	60.23	58.04	55.89	53.74
1.0 $\times 10^{-2}$ M NH ₃ pH 10.6	A	0.78796	0.83234	0.87789	0.92202	0.96701	1.01315	0.98003	0.94732	0.91315	0.87958	0.84496
	λ (nm)	254	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253
	C (μM)		52.82	55.71	58.51	61.36	64.29	62.19	60.11	57.94	55.81	53.62
0.2 M NH ₃ - 0.2 M NH ₄ Cl pH 8.0	A	0.78995	0.83451	0.87965	0.92667	0.97045	1.01455	0.98283	0.94825	0.91502	0.88068	0.84696
	λ (nm)	253	254	254	254	254	254	254	254	254	254	254
	C (μM)		52.82	55.68	58.65	61.43	64.22	62.21	60.02	57.92	55.74	53.61
0.2 M NaOAc - 0.2 M CH ₃ COOH pH 4.0	A	0.79654	0.83845	0.88172	0.91999	0.96302	1.00800	0.97800	0.94678	0.91426	0.88389	0.85362
	λ (nm)	253	254	254	254	254	254	254	254	254	254	254
	C (μM)		52.63	55.35	57.75	60.45	63.27	61.39	59.43	57.39	55.48	53.58
1.0 $\times 10^{-4}$ M CH ₃ COOH pH 4.5	A	0.82920	0.86115	0.89241	0.92236	0.95289	0.98368	0.96539	0.94659	0.92785	0.90892	0.89011
	λ (nm)	248	248	248	248	248	248	248	248	248	248	248
	C (μM)		51.93	53.81	55.62	57.46	59.32	58.21	57.08	55.95	54.81	53.67
1.0 $\times 10^{-4}$ M HCl pH 4.0	A	0.83894	0.86756	0.89432	0.92535	0.95150	0.97915	0.96160	0.94585	0.93157	0.91582	0.90011
	λ (nm)	245	245	245	245	245	245	245	245	245	245	245
	C (μM)		51.71	53.30	55.15	56.71	58.36	57.31	56.37	55.52	54.28	53.65

A: Absorbance; λ : Wavelength; C: Micromolar concentration.

R=[Cd]/[protocatechuic acid]; 0.0 (A), 0.2, 0.4, 0.6 (B), 0.8 (C), 1.0 (D), 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0.

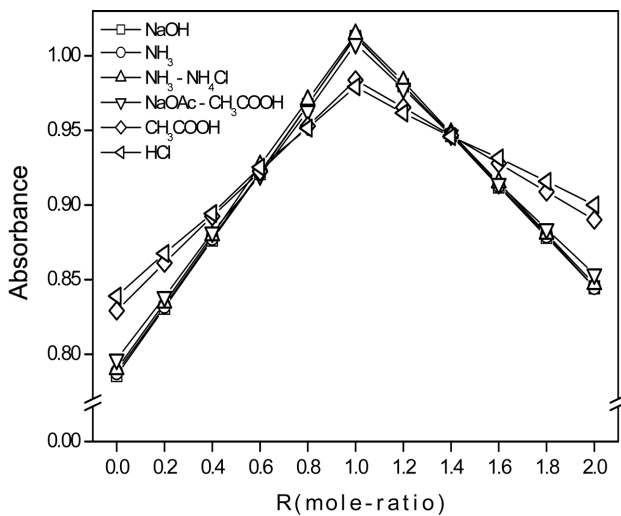


Fig. 3 – Mole-ratio plots at various wavelengths for 1 : 1 complex of cadmium (II) and protocatechuic acid. 254 nm (\square : 1.0×10^{-6} M NaOH, pH 8.0). 254 nm (\circ : 1.0×10^{-2} M NH_3 , pH 10.6). 253 nm (\triangle : 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl , pH 8.0). 253 nm (∇ : 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH_3COOH , pH 4.0). 248 nm (\diamond : 1.0×10^{-4} M CH_3COOH pH 4.5). 245 nm (\triangleleft : 1.0×10^{-4} M HCl, pH 4.0).

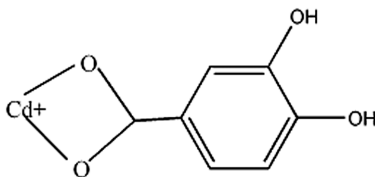


Fig. 4 – The proposed structure of 1 : 1 complex of cadmium (II) and protocatechuic acid in the presence of 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) at 253 nm.

EDTA

1.0×10^{-6} M NaOH로 조제한(pH 8.0) 용액에서는 197 nm와 203 nm에서 등흡광점이 나타났으며, 204 nm 이후에서 몰비가 증가함에 따라, 흡광도는 hypochromic effect 현상을 보였다. 흡광도가 202 nm에서 카드뮴(II)과 EDTA가 1 : 1로 착물이 형성되었으며, 착물의 농도와 몰흡광계수를 이용하여 EDTA와 카드뮴(II)이 1 : 1로 착물이 형성되는 최적농도가 $50.07 \mu\text{M}$ 인 것을 알 수 있었다. 1.0×10^{-2} M NH_3 (pH 10.6) 용액에서는 202 nm에서 EDTA와 카드뮴(II)이 1 : 1로 착물이 형성되는 것을 알 수 있었으며, 착물의 농도와 몰흡광계수를 이용하여, EDTA와 카드뮴(II)이 1 : 1로 착물을 형성되는 농도가 $50.07 \mu\text{M}$ 임을 알 수 있었고, 200 nm와 203 nm에서 등흡광점이 관찰되었다. 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) 용액에서는 흡광도가 198 nm와 204 nm에서 등흡광점이 나타났으며, 205 nm 이후에서는 mole ratio가 증가함에 따라, 흡광도는 hypochromic effect로 나타났다. 흡광도가 202 nm에서 카드뮴(II)과 EDTA가 1 : 1로 착물이 형성되는

것으로 나타났으며, 착물의 농도와 몰흡광계수를 이용하여, 이때의 농도가 $50.07 \mu\text{M}$ 임을 알 수 있었다(Fig. 5).³¹⁾ 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH_3COOH (pH 4.0) 용액에서는 201 nm에서 EDTA와 카드뮴(II)이 1 : 1로 착물로 형성되는 것으로 나타났으며, 착물의 농도와 몰흡광계수를 이용하여 이때의 농도가 $50.06 \mu\text{M}$ 인 것을 알 수 있었다. 198 nm, 204 nm에서 등흡광점이 관찰되었다.³⁷⁾ 1.0×10^{-4} M CH_3COOH (pH 4.5) 용액에서는 196 nm와 202 nm에서 등흡광점이 관찰되었으며, 착물의 농도와 몰흡광계수를 이용하여, 198 nm에서 $50.04 \mu\text{M}$ 의 농도로 EDTA와 카드뮴(II)이 1 : 1로 착물이 형성되는 것으로 나타났다.³¹⁾ 1.0×10^{-4} M HCl (pH 4.0) 용액에서는 착물의 농도와 몰흡광계수로 198 nm에서 $50.03 \mu\text{M}$ 의 농도로 EDTA와 카드뮴이 1 : 1로 착물이 형성되는 것으로 나타났으며, 196 nm와 201 nm에서 등흡광점이 관찰되었다. 1.0×10^{-6} M NaOH(pH 8.0) 용액의 결과와 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) 용액의 결과를 비교해보면, 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) 용액이 1.0×10^{-6} M NaOH(pH 8.0) 용액보다 등흡광점이 bathochromic effect된 것을 알 수 있었다. EDTA에 카드뮴(II)을 농도별로 첨가하면, spectra가 변하는 현상은 카드뮴(II)과 EDTA간의 안정한 착물 형성에 의한 것으로 생각되며, 용액의 pH가 알칼리성에서 산성으로 변하면, 등흡광점이 hypsochromic effect되는 것은 카드뮴(II)과 착물을 형성할 수 있는 아민기나 카르복실이온이 protonation에 의해 binding site가 감소되었기 때문으로 생각된다(Table II, Fig 5).³²⁾ Fig. 6는 pH 용액에 따른 스펙트라의 변화를 몰비법으로 도식한 것이다. 모든 시료가 몰비가 1.0이 되면 흡광도의 변화가 최대가 되고, 몰비가 높거나 낮으면 흡광도가 낮게 나타나는 현상을 발견하였다. 연구결과를 종합해보면, 알카리 수용액에서는 카드뮴-EDTA 착물의 최적농도는 변화가 없었으나, 산성용액에서는 염기성용액에서 보다 낮은 농도에서 농도변화가 관찰되었다. 이는 아마도 산성용액에서 카드뮴(II)과 결합할 수 있는 아민기나 카르복실기의 결합자리에 protonation에 의해 배위수가 감소되어, 낮은 카드뮴착물의 최적농도 현상으로 사료된다. 시료와 카드뮴의 몰비율이 증가(R=0.0~1.0)함에 따라 hyperchromic effect 현상을 관찰할 수 있었으며, 몰비율이 1.0에서 가장 안정한 분자구조의 카드뮴 착물이 형성됨을 알 수 있었다. pH가 증가함에 따라 흡수 스펙트럼의 bathochromic effect 현상과 함께 흡광도의 증가를 관찰할 수 있었다(Table II).^{29,37)} 최근에 카드뮴-EDTA 착물의 안정도상수를 이용하여, 토양과 인회석에서 중금속을 제거한 것처럼,^{19,20)} 카드뮴 이외의 중금속 독성에 대한 경감효과를 나타내는 리간드 화합물을 연구하는 것은 흥미로운 분야로 사료된다.

결론

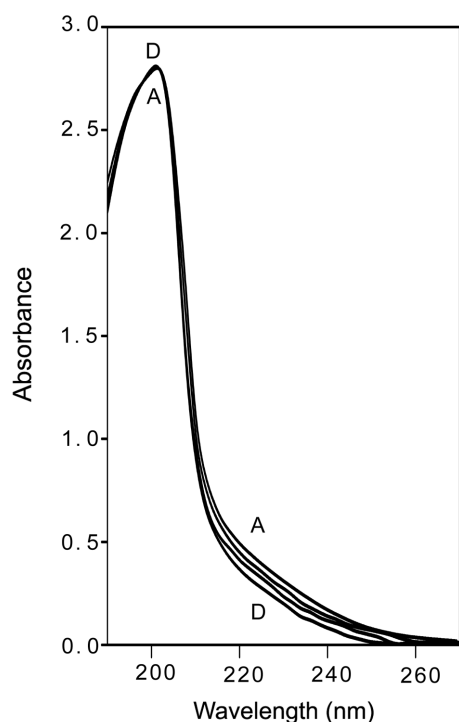
0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl pH 8.0 용액은 253 nm에서

Table II – Spectral parameters of EDTA and its cadmium complex in aqueous of solution at different pH

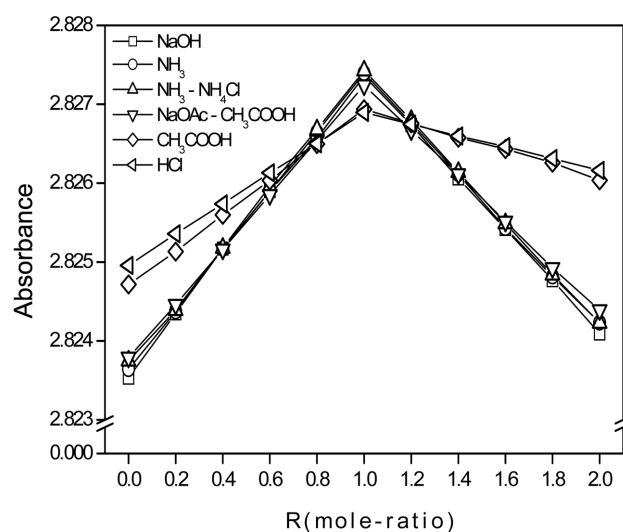
pH solvent		0.0 (A)	0.2	0.4	0.6 (B)	0.8 (C)	1.0 (D)	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
1.0×10^{-6} M NaOH pH 8.0	A	2.82353	2.82435	2.82517	2.82590	2.82657	2.82736	2.82674	2.82606	2.82542	2.82477	2.82409
	λ (nm)	202	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
	C (μ M)		50.00	50.02	50.04	50.05	50.07	50.06	50.05	50.04	50.02	50.01
1.0×10^{-2} M NH_3 pH 10.6	A	2.82364	2.82437	2.82517	2.82590	2.82665	2.82740	2.82676	2.82612	2.82542	2.82482	2.82421
	λ (nm)	202	202	202	202	202	202	202	202	202	202	202
	C (μ M)		50.02	50.03	50.04	50.05	50.07	50.06	50.04	50.03	50.02	50.00
0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl pH 8.0	A	2.82375	2.82439	2.82518	2.82596	2.82668	2.82743	2.82680	2.82614	2.82549	2.82484	2.82423
	λ (nm)	202	203	203	203	203	203	203	203	203	203	203
	C (μ M)		50.01	50.03	50.04	50.05	50.07	50.05	50.04	50.03	50.02	50.01
0.2 M NaOAc - 0.2 M CH_3COOH pH 4.0	A	2.82379	2.82446	2.82516	2.82585	2.82654	2.82724	2.82667	2.82611	2.82551	2.82492	2.82439
	λ (nm)	201	202	202	202	202	202	202	202	202	202	202
	C (μ M)		50.01	50.02	50.04	50.05	50.06	50.05	50.04	50.03	50.02	50.01
1.0×10^{-4} M CH_3COOH pH 4.5	A	2.82472	2.82513	2.82560	2.82603	2.82650	2.82694	2.82676	2.82658	2.82643	2.82626	2.82604
	λ (nm)	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198
	C (μ M)		50.01	50.02	50.02	50.03	50.04	50.04	50.03	50.03	50.03	50.02
1.0×10^{-4} M HCl pH 4.0	A	2.82496	2.82536	2.82574	2.82613	2.82650	2.82690	2.82675	2.82660	2.82646	2.82631	2.82616
	λ (nm)	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198
	C (μ M)		50.01	50.01	50.02	50.03	50.03	50.03	50.03	50.03	50.02	50.02

A: Absorbance; λ : Wavelength; C: Micromolar concentration.

R=[Cd]/[EDTA]; 0.0 (A), 0.2, 0.4, 0.6 (B), 0.8 (C), 1.0 (D), 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0.

**Fig. 5** – Electronic absorption spectra of 50 μ M EDTA in 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl (pH 8.0) in the presence of various concentrations of cadmium (II) at 202 nm. R=[cadmium]/[EDTA]; R=0.0 (A), 0.6 (B), 0.8 (C), and 1.0 (D).

protocatechuic acid에 위치한 carboxylate 그룹의 두자리 리간드로 카드뮴(II)과 비대칭적으로 착물 $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{PA})^+]$ 이 이루어지며,

**Fig. 6** – Mole-ratio plots at various pH for 1 : 1 complex of cadmium (II) and EDTA. 202 nm (\square : 1.0×10^{-6} M NaOH, pH 8.0). 202 nm (\circ : 1.0×10^{-2} M NH_3 , pH 10.6). 202 nm (\triangle : 0.2 M NH_3 - 0.2 M NH_4Cl , pH 8.0). 201 nm (∇ : 0.2 M NaOAc - 0.2 M CH_3COOH , pH 4.0). 198 nm (\diamond : 1.0×10^{-4} M CH_3COOH , pH 4.5). 198 nm (\triangleleft : 1.0×10^{-4} M HCl, pH 4.0).

카드뮴(II)-protocatechuic acid의 1 : 1 착물 형성의 농도는 64.22 μ M protocatechuic acid로 가장 높은 흡광도(A=1.01455)로 관찰되었다. 현재 중금속 독성에 대한 치료제로 사용되고 있는 EDTA의 최적농도는 50.07 μ M EDTA(A=2.82743)에서 카드뮴(II)과 1 : 1 착물로 안정한 6자리 배위자로서 카드뮴(II) 착물이

형성되어, 카드뮴(II) 독성을 억제하는 것으로 사료된다. 표준물질로 사용된 카드뮴(II)-EDTA의 최적농도는 카드뮴(II)-protocatechuic acid의 착물형성의 최적농도보다는 낮은 농도에서 안정한 카드뮴 착물을 형성하였으며, 이러한 연구결과에 의하면, 카드뮴(II) 독성이 정상세포에 유발되었을 때, protocatechuic acid를 처리하여 세포독성을 경감시킬 수 있으리라 사료된다.

문 헌

- 이정호, 강길웅, 정재열, 한종민, 이기남, 정우영, 한두석, 유일수, 김중수, 백승화 : 어성초 전탕액이 흰쥐 장기내 카드뮴 축적에 미치는 영향(I). *대한예방의학회지* **3**, 79 (1999).
- Settle, D. M. and Patterson, C. C. : Lead in albocore: Guide to lead pollution. *Am. Sci.* **207**, 1167 (1980).
- Williams, P. L. and Burson, J. L. : *Industrial Toxicology*. eds. Van Nostrand, Reihold, p. 197 (1985).
- WHO, Cadmium in Recommended Health-Based Limits in Occupational Health to Heavy Metals. WHO Technical Report Series, p. 647 (1980).
- Foulkes, E. C. : *Biological Roles of Metallothionein*. eds. Elsevier, New York, p. 215 (1982).
- Vallee, B. L. and Ulmer, D. D. : Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91 (1972).
- 국립보건원, 식품중의 미량금속에 관한 조사연구. *국립보건원* **29**, 365 (1992).
- 김운성, 이철호, 김성조, 이주돈, 문광현, 백승화 : 알로에 첨가식이 흰쥐의 카드뮴 독성에 미치는 영향. *한국식품과학회지* **27**, 555 (1995).
- 최성인, 이정희, 이서래 : 동물실험에 의한 녹차음료의 카드뮴 및 납 제거효과. *한국식품과학회지* **26**, 745 (1994).
- Bremer, I. : Cadmium toxicity-nutritional influence and the role of metallothionein world. *Rev. Nutr. Diet.* **32**, 165 (1978).
- Elinder, C. G. : *Cadmium: Uses, Occurrence and Intake*. Cadmium and Health. L. Friberg, *et al.*, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL (1985).
- WHO, Health Hazard of the Human Environmental. Geneva, WHO, p. 35 (1977).
- Kowel, N. F., Johnson, D. E., Kaemer, D. F. and Pahren, H. R. : Normal levels of cadmium in diet, urine, blood and tissues of inhabitants of the united states. *J. Toxicol. Environ. Health* **5**, 995 (1979).
- Evans, G. W., Majors, P. F. and Cornatzer, W. F. : Mechanism for cadmium and zinc antagonism of copper metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1142 (1970).
- Jakubouki, M., Piotrowski, J. K. and Trojanowska, B. : Binding of mercury in the rats: Studies using $^{203}\text{HgCl}_2$ and gel filtration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **16**, 743 (1970).
- Onosaka, S., Tanak, K., Doi, M. and Okahara, K. : A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues. *Eisei Kagaku* **24**, 128 (1978).
- Margoshes, M. and Vallee, B. L. : A cadmium in kidney protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813 (1957).
- Piscator, M. : On cadmium in normal human kidney together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits. *Nord. Hyg.* **45**, 76 (1964).
- Tonsuaadu, K., Viipsi, K. and Trikkel, A. : EDTA impact on Cd^{2+} migration in apatite-water system. *J. Hazard. Mater.* **154**, 491 (2008).
- Lim, T. T., Chui, P. C. and Goh, K. H. : Process evaluation for optimization of EDTA use and recovery for heavy metal removal from a contaminated soil. *Chemosphere* **58**, 1031 (2005).
- Ueda, J., Saito, N., Shimazu, Y. and Ozawa, T. : A comparison of scavenging abilities of antioxidant against hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 377 (1996).
- Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, K., Mori, H. and Hara, A. : Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. *Cancer Res.* **54**, 2359 (1994).
- <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/protocatechuicacid.htm>.
- Andre, E., Lapouge, C. and Cornard, J. P. : Toward a better understanding of the regioselectivity of the Al(III)-protocatechuic acid complexation reaction. *J. Phys. Chem. A* In press.
- Boilet, L., Cornard, J. P. and Lapouge, C. : Determination of the chelating site preferentially involved in the complex of lead (II) with caffeic acid: A spectroscopic and structural study. *J. Phys. Chem. A* **109**, 1952 (2005).
- Dean, J. A. : *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, p. 90 (1985).
- Oxtoby, D. W. and Freeman, W. A. : *Chemistry Science of Change*, 3rd eds. Saunders Golden Sunburst Series, p. 317 (1998).
- Bullatov, M. I. and Kalinkin, I. P. K. : *Practical Manual of Photometric Analysis*, Chemistry, 5th ed., Leningrad (1986).
- 김강진, 김하석, 이대운, 이원 : 분석화학, 자유아카데미, p. 523 (1989).
- Cornard, J. P., Dangleterre, L. and Lapouge, C. : Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. *J. Phys. Chem. A* **109**, 10044 (2005).
- Lee, J. H., Lee, K. N., Lee, C. W., Chun, H. J., You, J. S., Lim, J. A. and Baek, S. H. : The inhibitory effects of quercitrin from *Houttuynia cordata* against cadmium induced cytotoxicity (VII). *J. Kor. Chem. Soc.* **47**, 175 (2003).

- 32) Lapouge, C. and Cornard, J. P. : Reaction pathways involved in the mechanism of Al(III) chelation with caffeic acid: Catechol and carboxylic functions composition. *Chem. Phys. Chem.* **8**, 473 (2007).
- 33) Esparza, I., Salinas, I., Santamaria, C., Garcia-Mina, J. M. and Fernandez, J. M. : Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols. *Anal. Chim. Acta* **543**, 267 (2005).
- 34) Aydin, R. and Ozer, U. : Potentiometric and spectroscopic studies on yttrium (III) complexes of dihydroxybenzoic acids. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 33 (2004).
- 35) Bernal, M., Garcia-Vazquez, J. A., Romero, J., Gomez, C., Duran, M. L., Sousa, A., Sousa-Pedrares, A., Rose, D. L., Maresca, K. P. and Zubietta, J. : Electrochemical synthesis of cobalt, nickel, copper, zinc and cadmium complex with N[(2-hydroxyphenyl) methylidene]-N'-tosylbenzene-1,2-diamine. The crystal structures of {(1,10-phenanthroline)[N-(2-oxophenyl)-methyldine]-N-tosylbenzene-1,2-diaminato}nickel(II) and {(1,10-phenanthroline)[N-(2-oxophenyl)-methylidene]-N'-tosylbenzene-1,2-diaminato}copper(II). *Inorg. Chim. Acta* **295**, 39 (1999).
- 36) Bodini, M. E., Copia, G., Tapia, R., Leighton, F. and Herrera, L. : Iron complexes of quercetin in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide anion radical. *Polyhedron* **18**, 2233 (1999).
- 37) Choi, H. S. and Kim, Y. S. : Atomic absorption spectrophotometric determination of trace cadmium after preconcentration by extracting its 8-hydroxyquinoline complex into molten benrophenone. *Bull. Korean. Chem. Soc.* **17**, 338 (1996).