

# 등온적정열량계를 이용한 BaCl<sub>2</sub>와 EDTA 킬레이션 결합 반응의 pH 영향

육가은 · 장지웅<sup>†</sup>

금오공과대학교 화학공학과  
(2023년 4월 16일 접수, 2023년 4월 25일 수정, 2023년 4월 26일 채택)

## Influence of pH on Chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA Using Isothermal Titration Calorimetry

Ga Eun Yuk and Ji Woong Chang<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Kumoh National Institute of Technology, Gumi-si 39177, Republic of Korea  
(Received April 16, 2023; Revised April 25, 2023; Accepted April 26, 2023)

### 초 록

등온 적정 열량계는 리간드-수용체 사이의 킬레이션 결합 반응의 엔탈피, 깁스에너지, 엔트로피, 화학양론 등 포함한 모든 열역학적 정보를 측정하는데 유용한 기술이다. 단일독립결합모델을 이용하여 Tricine과 HEPES 완충용액에서의 BaCl<sub>2</sub>와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)의 킬레이션 결합에서의 열역학적 정보를 획득하였다. 등온 적정 열량계를 이용하여 pH 7~11 영역에서의 킬레이션 결합의 메커니즘과 최적의 결합 조건을 확인하였다. BaCl<sub>2</sub>와 EDTA의 결합은 자발적인 발열반응이며 pH가 증가할수록 엔트로피적 영향이 높아진다. 1:1로 결합하는 pH 영역은 pH 9.0 근처에서 매우 좁은 영역에서 나타난다.

### Abstract

Isothermal titration calorimetry (ITC) is a useful technique to obtain thermodynamic binding properties such as enthalpy, Gibbs free energy, entropy, and stoichiometry of the chelation reaction. A single independent binding site model was used to evaluate the thermodynamic binding properties in BaCl<sub>2</sub> and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in Tricine and HEPES buffers. ITC enables us to elucidate the binding mechanism and find an optimal chelation condition for BaCl<sub>2</sub> and EDTA in the pH range of 7~11. Chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA is a spontaneous endothermic reaction. As pH increased, entropic contributions dominated. The optimal pH range is narrow around pH 9.0, where 1:1 binding between BaCl<sub>2</sub> and EDTA occurs.

**Keywords:** Isothermal titration calorimetry, Chelation, Barium, EDTA, pH

## 1. 서 론

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)와 양이온의 킬레이션 반응은 화학, 식품, 재료, 환경, 생화학, 제약, 의료 분야에서 일반적으로 많이 이용되고 있다[1-6]. EDTA는 Ca, Mg와 같은 2가 이온 및 중금속 이온과 매우 높은 평형 결합 상수를 가지고 있으며 EDTA와 결합된 금속 이온은 안정화가 된다[7-10]. 금속이온을 안정화하는 특성으로 EDTA는 식품첨가물로서 통조림, 탄산음료, 조미료 등의 부패를 막고 유통기한을 증가시키며 색, 질감, 맛 등을 향상하는데 이용되고 있다[2]. 장비의 표면에 미네랄의 제거에도 이용된다[11]. 또한 강력한 킬레이션 반응으로 환경 분야에서 토양, 폐수 등의 중금속을 제거하고 의학 분야에서는 납, 수은, 카드뮴, 비소, 알루미늄 등의 중독 치료

에 사용된다[3,12,13]. 킬레이션 반응의 효과 측정은 금속의 농도와 EDTA의 농도를 측정하는 atomic absorption spectroscopy, X-ray, ICP, MS potentiometric titration 등의 방법을 사용하고 있다[14-16]. 이러한 방법을 통해 결합친화도와 금속 제거율 등을 측정할 수 있지만 반복 실험과 두 개 이상의 실험을 동시에 이용해야 한다.

등온 적정 열량계(isothermal titration calorimetry, ITC)는 이온-분자, 분자-분자, 단백질-리간드, DNA-단백질, 분자-나노입자간의 상호작용 등 화학 및 바이오 분야 등 다양한 분야에서 사용하는 열역학적 분석 도구이다[17, 18]. ITC는 두 개 이상의 분자 간의 결합에서 발생하는 흡열 또는 발열을 측정함으로써 상호작용에 관한 열역학적 정보를 제공하며 약물 선별, 약물 발견, 단백질-단백질, 약물-단백질, 약물-RNA 등의 결합에 대한 메커니즘 연구에 활발히 사용되고 있다. ITC는 분자 간 결합의 평형상수, 화학양론, 결합 엔탈피를 직접 구하고 Gibbs 자유 에너지와 엔트로피는 관계식을 통해 구할 수 있어 모든 열역학적 정보를 얻을 수 있다[17,18]. 특히 ITC를 이용해 얻은 열역학적 정보는 등온에서 한 번의 실험으로 열역학적 정보를 얻을 수 있어 반복 실험과 결합 온도에 따른 영향을 배제할 수 있다는 장점이 있다[18,19].

<sup>†</sup> Corresponding Author: Kumoh National Institute of Technology  
Department of Chemical Engineering, Gumi-si 39177, Republic of Korea  
Tel: +82-54-478-7693 e-mail: jwchang@kumoh.ac.kr

이 논문에서는 ITC를 이용하여 pH에 따른 BaCl<sub>2</sub>와 EDTA 사이의 결합의 열역학적 변수의 영향을 보여준다. ITC의 데이터를 단일독립 결합모델(single independent site binding model, SIBSM)을 이용해 25 °C에서의 BaCl<sub>2</sub>와 EDTA 간의 결합의 열역학적 변수 데이터 피팅을 통해 얻고 열역학적 변수의 pH에 따른 상관관계식을 실험식으로 얻었다. N-(2-hydroxy-1,1-bis-(hydroxymethyl)ethyl)glycine (Tricine)과 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)를 버퍼용액으로 사용했을 때의 pH에 따른 BaCl<sub>2</sub>와 EDTA 화학양론 값을 정량적으로 제시하는 방법을 이용해 최적의 pH를 구할 수 있다.

## 2. 실험

### 2.1. 재료

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), barium chloride (BaCl<sub>2</sub>), and N-(2-hydroxy-1,1-bis-(hydroxymethyl)ethyl)glycine(Tricine), 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 그리고 sodium hydroxide (NaOH)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 모든 재료는 정제없이 그대로 사용하였다.

### 2.2. 샘플 준비

EDTA (1 mM) 와 BaCl<sub>2</sub> (20 mM)는 완충 용액을 이용해 제조하였다. 완충 용액은 초순수 물(18.2 MΩ cm)에 용해된 Tricine 또는 HEPES로 제조하였으며 완충 용액의 농도는 20 mM 이다. 이때 용액의 pH는 1 M NaOH 용액으로 각각 7, 8, 9, 10, 11로 조정하였다.

### 2.3. 등온 적정 열량계(Isothermal Titration Calorimetry)

ITC를 이용한 실험은 순금으로 제조된 170 μL의 반응기 부피를 가지는 Nano ITC (TA Instruments, New Castle, DE)를 이용하였다. 결합 반응이 일어나는 반응기에는 수용체 용액을 기준 반응기에는 완충 용액을 넣고 실험을 진행하였다. 이 실험에서는 EDTA와 BaCl<sub>2</sub>을 각각 수용체와 리간드로 사용하였다. 리간드(20 mM)는 50 μL 주사기로 고정된 간격으로 수용체(1 mM)가 들어있는 반응기에 주입했다. 혼합에 의한 열을 제거하기 위해서 결합 실험과 동일한 방법으로 배경 실험을 진행하였고 이 때 반응기에는 완충 용액을 사용하고 주사기에는 리간드 용액을 사용하였다. ITC의 열흐름과 주입 부피는 제조사의 전기적 교정과 주사기 플런저의 기계적 위치 조정을 통해 실험을 수행하기 전에 교정되어 적정 부피의 측정 편향과 오차를 제거했다. ITC 실험은 25 °C에서 수행되었고 교반 속도는 250 rpm으로 설정했다.

## 3. 결과 및 고찰

Figure 1은 20 mM BaCl<sub>2</sub>와 1 mM EDTA가 25 °C, 20 mM Tricine, pH 8 용액에서 적정하는 열흐름과 시간에 대해 적절한 열을 보여준다. 적절한 열은 적정이 진행됨에 따라 S자형 곡선을 만드는 데 대략적인 열역학적 변수는 그래프의 형태로부터 추측할 수 있다[19-22]. 일반적으로 평형 상수 (*K*)는 S자 곡선의 변곡점에서 기울기와 연관이 있으며 기울기가 증가함에 따라 그 값이 증가한다. 변곡점의 위치는 화학양론의 값과 유사하며 적절한 열의 크기를 통해 결합 엔탈피를 구할 수 있다. 정확한 열역학적 변수를 구하기 위해서는 물질수지식과 에너지수지식을 이용해 구할 수 있으며 SIBSM의 경우는 유도한 식(1)을 이용하여 데이터 피팅을 이용해 *K*, Δ*H*, 그리고 *n*을 구할 수 있다[23].

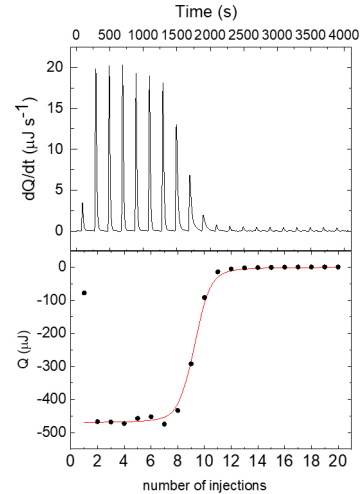


Figure 1. Heat flow and integrated heats of chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA in Tricine at pH 8.0 at 25 °C.

$$\frac{dQ}{d[L]_T} = -V\Delta H \left( \frac{1}{2} - \frac{1 + K[L]_T - [M]_T n K}{(2\sqrt{(nK[M]_T + K[L]_T + 1)^2 - 4nK^2[L]_T[M]_T})} \right) \quad (1)$$

이때, *Q*는 열흐름, *V*는 반응기의 부피, Δ*H*는 결합 물 엔탈피, *K*는 결합 평형 상수, *n*은 화학양론 값, [*L*]<sub>*T*</sub>는 리간드의 농도 그리고 [*M*]<sub>*T*</sub>는 수용체 농도를 의미한다.

Δ*G*와 Δ*S*는 데이터 피팅으로 얻은 *K*값과 Δ*H*를 이용해 각각 식 (2)와 (3)의 관계식을 이용해 구할 수 있다.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

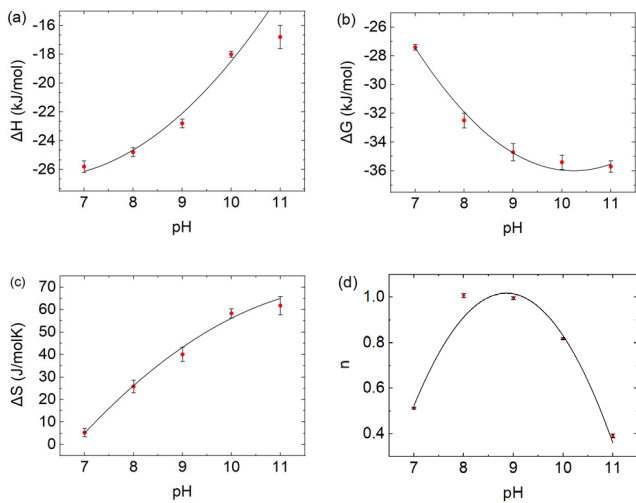
식 (1)-(3)을 이용해 Tricine을 완충용액으로 얻은 열역학적 변수의 값은 Table 1에 정리되어 있다. pH 7~11 범위에서 Δ*H*와 Δ*G*는 모두 음수이며 이것은 Ba<sup>2+</sup>와 EDTA의 결합 반응이 자발적인 발열반응임을 나타낸다. Δ*S*는 같은 pH 영역에서 양수이며 결합 반응을 통해 분자 주변의 물 분자의 무질서도가 증가했음을 알 수 있다[24,25]. 화학양론 값은 약 1.0 이하의 값을 가지는데 이것은 하나의 Ba<sup>2+</sup>가 한 개 이하의 EDTA와 결합하여 Ba-EDTA 복합체로 결합함을 의미한다.

Figure 2는 Tricine을 버퍼용액으로 했을 때, Table 1에서 구한 pH의 Δ*H*, Δ*G*, Δ*S*, *n*값에 대한 영향을 보여준다. pH, 수소이온 농도 및 이온 세기(*I*)에 따라 Δ*H*, Δ*G*, Δ*S*, *n*값은 선형적인 관계를 갖지 않아 pH에 관한 2차방정식 형태의 실험식을 얻었고 2차 방정식의 계수는 Table 2에 정리되어 있다. Δ*H*는 Figure 2(a)에서 pH가 증가함에 따라 pH 7일 때 -25.84 kJ/mol에서 pH 11일 때 -16.83 kJ/mol로 감소함을 보여준다. 이것은 용액의 NaOH가 증가하여 pH 및 이온 세기가 증가함에 따라 EDTA와 Ba<sup>2+</sup> 결합력이 감소하는 것을 의미하며 Ca-EDTA 복합체 형성과 비슷한 결과이다[26]. 높은 pH 영역에서 Ba<sup>2+</sup> 또는 Ca<sup>2+</sup>는 OH와 수산화물 형태를 가지고[27] 이 화합물은 EDTA와의 킬레이션 반응을 방해하기 때문에 열역학적으로 엔탈피의 감소로 나타난다. Figure 2(b)는 pH에 따른 Δ*G*에 관한 그래프이다. Δ*G*의 값은 pH 7일 때 -27.4 kJ/mol에서 pH 11일 때 -35.7 kJ/mol로 같은 pH 영역에서 Δ*H*의 크기가 감소함에도 Δ*G*의 크기가 증가한다.

**Table 1. Thermodynamic binding parameters of chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA depending on pH in Tricine<sup>a</sup>**

pH	<i>I</i> (mM)	<i>K</i> (μM)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)	<i>n</i>
7	2.29	15.62 (± 1.44)	-27.4 (± 0.2)	-25.8 (± 0.4)	5.3 (± 1.8)	0.513 (± 0.004)
8	8.92	2.06 (± 0.62)	-32.5 (± 0.5)	-24.8 (± 0.3)	25.8 (± 2.8)	1.008 (± 0.008)
9	16.04	0.83 (± 0.35)	-34.7 (± 0.6)	-22.8 (± 0.3)	40.1 (± 3.1)	0.996 (± 0.006)
10	17.68	0.64 (± 0.17)	-35.4 (± 0.5)	-18.0 (± 0.2)	58.3 (± 2.1)	0.818 (± 0.004)
11	18.84	0.67 (± 0.14)	-35.7 (± 0.4)	-16.8 (± 0.8)	61.8 (± 4.1)	0.391 (± 0.008)

<sup>a</sup>BaCl<sub>2</sub> (20 mM) was injected into 1 mM EDTA at 25 °C and the parameters were estimated with a single independent binding site model. Standard deviations are shown in parentheses.



**Figure 2. Influence of pH on thermodynamic binding properties of chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA in Tricine at 25 °C: (a) enthalpy, (b) Gibbs free energy, (c) entropy, and (d) stoichiometry.**

**Table 2. Quadratic fitting parameters of thermodynamic binding parameters chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA depending on pH in Tricine<sup>a</sup>**

	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)	<i>n</i>
B <sub>0</sub>	-6.62	49.45	-258.3	-10.22
B <sub>1</sub>	-3.20	-16.31	52.85	2.52
B <sub>2</sub>	0.33	0.80	-2.13	-0.14

<sup>a</sup>The quadratic fitting equation is  $y = B_0 + B_1x + B_2x^2$ , where *x* and *y* are pH and a thermodynamic binding property, respectively.

이것은 pH가 증가할 때 Ba-EDTA 복합체 형성이 더 자발적으로 일어남을 의미한다. pH가 낮은 영역에서는  $\Delta H$  이 값이  $\Delta G$  값과 유사하여 엔탈피적 킬레이션 결합이 일어남을 알 수 있으나 pH가 증가함에 따라 엔탈피의 영향이 줄어드는 것을 알 수 있다. Figure 2(c)에서 알 수 있듯이  $\Delta S$ 는 pH 7일 때 5.4 J/mol K에서 pH 11일 때 61.3 J/mol K로 단조 증가하면서 약 12배 증가함을 알 수 있다. 이것은 pH가 증가함에 따라 분자 주변의 무질서도가 급격히 증가하고 Ba-EDTA의 복합체가 엔트로피적 킬레이션 결합이 우세함을 알 수 있다. 에너지적

관점 이외에 ITC를 이용하여 BaCl<sub>2</sub>와 EDTA의 화학양론 값에 대한 정량적인 값을 구할 수 있다. Figure 2(d)에서 알 수 있듯이 pH가 증가함에 따라 화학양론의 값은 pH 8.0~9.0에서 최대값을 갖는 형태를 보인다. 이러한 형태는 낮은 pH 영역과 높은 pH에서 다른 메커니즘을 통해 일어난다. 낮은 pH 영역에서는 EDTA의 탈수소화가 일부 이루어지지 않은 EDTA와[28] Ba<sup>2+</sup>와의 결합이 일어나지 않는 EDTA가 존재하는 것으로 설명된다. 높은 pH 영역에서는 Na-EDTA의 형성으로 Ba<sup>2+</sup>와 결합하는 EDTA 이온의 농도가 줄어들기 때문이다[29]. 높은 pH에서 양이온의 경우 수산화물을 형성하고 침전이 일어나[30] Ba<sup>2+</sup>의 양이 [L]<sub>T</sub>에 비해 낮아 표면적으로 EDTA와 결합하는 Ba<sup>2+</sup>의 양이 낮아지기 때문에 화학양론값이 증가할 수 있지만 pH 7~11 영역에서는 Na-EDTA의 형성이 더 우세하여 결합가능한 EDTA가 줄어들기 때문이다. pH 7~11 영역에서 평형 상수가 약 10<sup>6</sup> 값을 가지기 때문에 화학양론값에 도달하기 전까지 적정 영역에서는 탈수소화된 EDTA는 주입된 Ba<sup>2+</sup>와 킬레이션 결합을 한다. 따라서 Ba-EDTA 복합체는 화학양론 값이 가장 큰 pH 8.0에서 가장 많다는 것을 알 수 있다. Tricine을 완충용액으로 했을 때 EDTA를 이용한 Ba<sup>2+</sup> 안정화를 위한 최적의 조건의 pH 8.0~9.0에서 화학양론비로 투입했을 때인 것을 ITC 실험을 통해 확인할 수 있다.

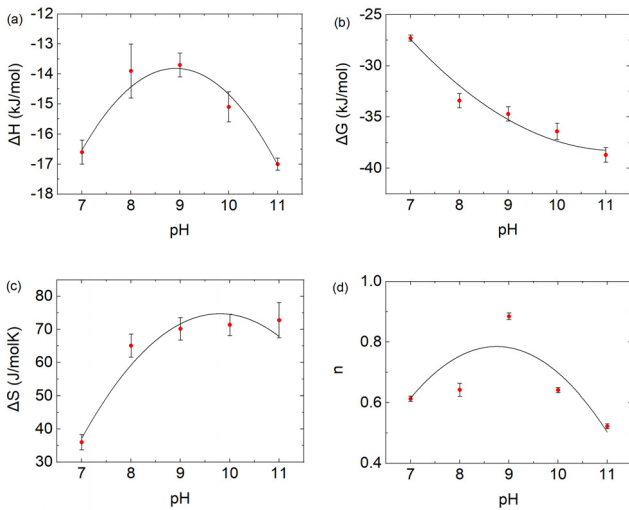
HEPES를 완충용액으로 BaCl<sub>2</sub>와 EDTA의 킬레이션 반응의 열역학적 변수의 값은 Table 3에 정리되어 있다. Tricine을 완충용액으로 사용했을 때와 마찬가지로 pH 7~11 영역에서  $\Delta H$ 와  $\Delta G$ 는 모두 음수이며 이것은 Ba<sup>2+</sup>와 EDTA의 자발적인 발열 반응을 확인할 수 있다. HEPES 완충 용액에서  $\Delta H$ 의 범위는 -13.73 kJ/mol에서 -17.01 kJ/mol로 Tricine을 사용했을 때에 비해서 크기가 작고 변동 범위도 작아 HEPES 완충용액에서 Ba-EDTA 복합체의 결합 강도가 상대적으로 낮음을 알 수 있다.  $\Delta S$ 는 같은 pH 영역에서 양수이며 이것은 결합 반응을 통해 분자 주변의 물 분자의 무질서도가 증가했음을 알 수 있다. 화학양론 값은 약 1.0 이하의 값을 가지는데 이것은 하나의 Ba<sup>2+</sup>가 한 개 이하의 EDTA와 결합하여 Ba-EDTA 복합체로 결합함을 의미한다. 반면에  $\Delta G$ 의 크기는 완충 용액과 상관없이 비슷한 크기를 가지고 있다.  $\Delta S$ 값에서 알 수 있듯이 pH 7 및 HEPES가 완충 용액일 때  $\Delta S$ 는 Tricine이 완충 용액일 때에 비하여 약 7배 가까이 크며 pH 11로 증가함에 따라 그 값이 약 2배 정도 증가하였다.

Figure 3는 HEPES를 버퍼용액으로 했을 때, Table 3에서 구한 pH 및 이온세기의  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ , *n* 값에 대한 영향을 보여준다. Tricine을 완충 용액으로 사용했을 때와 같이 pH, 수소이온의 농도 및 이온

**Table 3. Thermodynamic Binding Parameters of Chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA depending on pH in HEPES<sup>a</sup>**

pH	<i>I</i> (mM)	<i>K<sub>d</sub></i> (μM)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)	<i>n</i>
7	5.27	16.13 (2.81)	-27.3 (0.3)	-16.6 (0.4)	36.0 (2.3)	0.613 (0.009)
8	15.07	1.44 (0.70)	-33.4 (0.7)	-13.9 (0.9)	65.1 (3.5)	0.642 (0.021)
9	19.22	0.85 (0.42)	-34.7 (0.7)	-13.7 (0.4)	70.2 (3.4)	0.885 (0.011)
10	20.18	0.42 (0.24)	-36.4 (0.8)	-15.1 (0.5)	71.4 (3.2)	0.641 (0.008)
11	21.24	0.17 (0.09)	-38.7 (0.7)	-17.0 (0.2)	72.8 (5.3)	0.522 (0.008)

<sup>a</sup>BaCl<sub>2</sub> (20 mM) was injected into 1 mM EDTA at 25 °C and the parameters were estimated with a single independent binding site model. Standard deviations are shown in parentheses.



**Figure 3. Influence of pH on thermodynamic binding properties of chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA in HEPES at 25 °C: (a) enthalpy, (b) Gibbs free energy, (c) entropy, and (d) stoichiometry.**

**Table 4. Quadratic Fitting Parameters of Thermodynamic Binding Parameters Chelation of BaCl<sub>2</sub> and EDTA Depending on pH in HEPES<sup>a</sup>**

	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/molK)	<i>n</i>
B <sub>0</sub>	-72.58	38.1	-385.7	-3.48
B <sub>1</sub>	13.30	-12.17	87.54	0.78
B <sub>2</sub>	-0.75	0.53	-4.42	-0.044

<sup>a</sup>The quadratic fitting equation is  $y = B_0 + B_1x + B_2x^2$ , where *x* and *y* are pH and a thermodynamic binding property, respectively.

세기에 따라  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ , *n*은 선형성을 확인할 수 없다. pH에 따른 열역학적 변수의 2차방정식을 이용한 상관관계식의 계수는 Table 4에 요약되어 있다. Figure 3(a)에서 알 수 있듯이 HEPES를 완충 용액으로 이용하였을 경우 Ba<sup>2+</sup>와 EDTA의 킬레이션 결합 엔탈피는 약 pH 9.0에서 최대값을 가지며 Tricine이 완충 용액으로 사용되었을 때에 비하여 약 15 kJ/mol 크기가 작다. 완충 용액에 이온화 엔탈피에

따라 표면적 EDTA 킬레이션 결합 엔탈피는 영향을 받기 때문에[26] Ba<sup>2+</sup>와의 킬레이션 결합 엔탈피가 HEPES를 완충 용액으로 사용하였을 때 Tricine의 경우보다 낮다. pH 변화에 엔탈피 변화는 BaCl<sub>2</sub>와 HEPES 용액의 상호작용과 수산화물 형성으로 인한 결합력의 변화로 인한 결과이다. Figure 3(b)는 pH에 따른  $\Delta G$ 에 관한 그래프이다. pH 7~11 영역에서  $\Delta G$ 의 크기는 증가하고 있으며 각 pH에서  $\Delta G$ 의 크기는 완충 용액과 상관없이 비슷한 크기를 가지고 있다. HEPES를 완충 용액으로 했을 때 Ba<sup>2+</sup>와 EDTA의 킬레이션 결합은 Tricine을 완충 용액으로 사용했을 때에 비해서 엔탈피의 크기가 작기 때문에 엔트로피적 킬레이션 결합의 영향이 pH와 상관없이 크다는 것을 알 수 있다. Figure 3(c)에서 알 수 있듯이  $\Delta S$ 값은 증가하면서 pH 7에서 HEPES가 완충 용액일 때 Tricine이 완충 용액일 때에 비하여 약 7배 가까이 크며 pH 11로 증가함에 따라 그 값이 약 2배 정도 증가하였다. HEPES를 완충 용액으로 사용하였을 때에도 pH가 증가함에 따라 분자 주변의 무질서도가 증가하고 Ba-EDTA의 복합체가 엔트로피적 킬레이션 결합이 우세함을 알 수 있다. 화학양론적 관점에서 Figure 3(d)에서 알 수 있듯이 pH가 증가함에 따라 Ba-EDTA의 결합은 HEPES를 완충 용액으로 사용하였을 때 pH 9.0에서 최대값을 갖는다. Tricine을 완충 용액으로 사용하였을 때와 마찬가지로 낮은 pH 영역에서는 EDTA의 탈수소화가 일부 이루어지지 않은 EDTA로 인하여 실질적 수용체 농도가 낮은 효과가 나타난다. 높은 pH 영역에서는 Na-EDTA의 형성으로 Ba<sup>2+</sup>와 결합하는 EDTA 화학양론 값이 감소하나 HEPES를 완충 용액으로 사용했을 때의 Tricine을 사용했을 때에 비해 Na-EDTA 형성에 대한 영향을 덜 받는다. Tricine을 완충 용액으로 사용했을 때와 마찬가지로 HEPES를 완충 용액으로 사용하였을 경우에도 pH 7~11 영역에서 평형 상수가 약 10<sup>6</sup> 값을 가지기 화학양론 값으로 pH 최적 값을 구할 수 있다. HEPES를 완충 용액으로 했을 때 EDTA와 BaCl<sub>2</sub>의 킬레이션 반응의 최적 조건은 pH 9.0에서 화학양론비로 투입했을 때인 것을 ITC 실험을 통해 확인할 수 있다.

Table 1과 3에서 확인할 수 있듯이, Tricine와 HEPES를 완충 용액은 pH에 따라 이온 세기가 일정하지 않다. Tricine 완충 용액에서 pH 9과 11에서의 이온 세기는 각각 HEPES 완충 용액에서 pH 8과 9에서와 비슷하게 약 15 mM, 19 mM을 가지는데 이것은 Tricine 완충 용액 pKa가 HEPES에 비해 높아 pH를 조절하기 위해서 더 많은 NaOH가 필요하기 때문이다. 이온 세기가 약 15 mM에서 19 mM로 증가함에 따라 Tricine 완충 용액에서는 결합력이 6.0 kJ/mol이 감소한 반면에

HEPES 완충 용액에서는 0.2 kJ/mol이 감소하여 이온 세기에 따른 Ba-EDTA의 결합력은 낮은 상관관계를 가진다. 다른 열역학적 변수도 같은 이온 세기의 변화에 대해 상관관계가 낮지만 pH의 경우 약 pH 9.0에서 완충 용액의 종류와 관계없이 높은 화학양론값을 가지는 것을 확인할 수 있다. 따라서 Tricine와 HEPES를 완충 용액으로 사용하였을 경우 용액의 수소이온 농도에 따라 최적의 화학양론값이 결정됨을 확인할 수 있다.

#### 4. 결 론

ITC를 이용하여 BaCl<sub>2</sub>를 EDTA에 적정하여 pH 7~11에서의 킬레이션 반응의 열역학적 변수를 구하고 pH에 관한 관계식을 얻었다. 단일 독립결합 모델을 이용하여 열역학적 변수 중 결합 상수, 엔탈피, 화학양론을 구하고 열역학적 관계식을 이용해 Gibbs 자유에너지와 엔트로피를 구함으로써 모든 열역학적 변수를 한번의 실험으로 획득하였다. 열역학적 변수의 pH에 관한 함수는 이차다항식을 이용해 표현할 수 있다. Ba<sup>2+</sup>와 EDTA의 킬레이션 결합은 Tricine과 HEPES를 완충용액으로 사용하였을 때 완충 용액의 종류와 상관없이 자발적인 발열반응이다. Tricine을 완충용액으로 이용하였을 때 HEPES를 완충 용액을 사용했을 때에 비해 높은 결합력을 가지며 pH가 증가할수록 Gibbs 자유에너지의 엔트로피적 영향이 증가하였다. ITC를 이용했을 때 Ba<sup>2+</sup>와 EDTA의 결합 양을 pH별로 한 번의 실험으로 구할 수 있기 때문에 최적의 pH 조건을 찾는 데 유리하다. ITC 실험 결과 분석을 통해 pH 7~11 영역에서 Ba<sup>2+</sup>와 EDTA는 높은 결합 친화도를 가지고 있으나 pH에 따라 화학양론값의 변화를 측정하였다. EDTA의 탈수소화와 Na<sup>+</sup>의 영향으로 화학양론값은 pH 또는 수소이온 농도에 따라 최대값을 가진다. BaCl<sub>2</sub>와 EDTA가 1:1로 결합하는 최적의 pH는 완충 용액을 Tricine과 HEPES를 사용했을 때 약 pH 9.0 근처에서 매우 좁은 영역의 pH 범위를 가진다.

#### 감 사

이 연구는 금오공과대학교 학술연구비로 지원되었음(202002340001)

#### References

1. T. Takeshita, T. A. Shimohara, and S. Maeda, Synthesis of EDTA-monoalkylamide chelates and evaluation of the surface-active properties, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 104-107 (1982).
2. J. R. Hart, EDTA-type chelating agents in everyday consumer products: Some food, cleaning, and photographic applications, *J. Chem. Educ.*, **62**, 75-76 (1985).
3. H. Grčman, Š. Velikonja-Bolta, D. Vodnik, B. Kos, and D. Leštan, EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity, *S. Afr. J. Plant Soil.*, **235**, 105-114 (2001).
4. E. Mathuthu, A. J. V. Rensburg, D. D. Plessis, and S. Mason, EDTA as a chelating agent in quantitative <sup>1</sup>H-NMR of biologically important ions, *Biochem. Cell Biol.*, **99**, 465-475 (2021).
5. X. Huang, Rationale for the successful management of EDTA chelation therapy in human burden by toxic metals, *Biomed Res. Int.*, **2016**, 1-13 (2016).
6. A. Fulgenzi and M. E. Ferrero, EDTA chelation therapy for the treatment of neurotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2-16 (2019).

7. T. Christensen, D. M. Gooden, J. E. Kung, and E. J. Toone, Additivity and the physical basis of multivalency effects: A thermodynamic investigation of the calcium EDTA interaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7357-7366 (2003).
8. A. Velazquez-Campoy, B. Claro, O. Abian, J. Höring, L. Bourlon, R. Claveria-Gimeno, E. Ennifar, P. England, J. B. Chaires, D. Wu, G. Piszczek, C. Brautigam, S. C. Tso, H. Zhao, P. Schuck, S. Keller, and M. Bastos, A multi-laboratory benchmark study of isothermal titration calorimetry (ITC) using Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to EDTA, *Eur. Biophys. J.*, **50**, 429-451 (2021).
9. L. C. O'Brien, H. B. Root, C. C. Wei, D. Jensen, N. Shabestary, C. D. Meo, and D. J. Eder, M<sup>2+</sup>-EDTA binding affinities : A modern experiment in thermodynamics for the physical chemistry laboratory, *J. Chem. Educ.*, **92**, 1547-1551 (2015).
10. F. M. Koehler, M. Rossier, M. Waelle, E. K. Athanassiou, L. K. Limbach, R. N. Grass, D. Günther, and W. J. Stark, Magnetic EDTA: Coupling heavy metal chelators to metal nanomagnets for rapid removal of cadmium, lead and copper from contaminated water, *Chem. Commun.*, **32**, 4862-4864 (2009).
11. M. Murtaza, S. A. Alarif, M. Y. Rasm, M. S. Kamal, M. Mahmoud, and M. A. Ajmi, Single step calcium sulfate scale removal at high temperature using tetrapotassium ethylenediamine-tetraacetate with potassium carbonate, *Nature*, **12**, 1-17 (2022).
12. T. Born, C. N. Kontoghiorghis, A. Spyrou, A. Kolnagou, and G. J. Kontoghiorghis, EDTA chelation reappraisal following new clinical trials and regular use in millions of patients: Review of preliminary findings and risk/benefit assessment, *Toxicol. Mech.*, **23**, 11-17 (2013).
13. G. Björklund, J. Mutter, and J. Aaseth, Metal chelators and neurotoxicity: lead, mercury, and arsenic, *Arch. Toxicol.*, **91**, 3787-3797 (2017).
14. R. A. Goyer and M. G. Cherian, Ascorbic acid and EDTA treatment of lead toxicity in rats, *Life Sci.*, **24**, 433-438 (1979).
15. E. Robotti, F. Quasso, M. Manfredi, F. Gosetti, E. Mazzucco, C. Isidoro, and E. Marengo, Determination by ICP-MS and multivariate data analysis of elemental urine excretion profile during the EDTA chelation therapy: A case study, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **62**, 682 (2020).
16. T. Zhang, J. M. Liu, X. F. Huang, B. Xia, C. Y. Su, G. F. Luo, Y. W. Xu, Y. X. Wu, Z. W. Mao, and R. L. Qiu, Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils using new selective EDTA derivatives, *J. Hazard. Mater.*, **262**, 464-471 (2013).
17. A. Velazquez-Campoy and E. Freire, Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands, *Nat. Protoc.*, **1**, 186-191 (2006).
18. E. Freire, O. L. Mayorga, and M. Straume, Isothermal titration calorimetry, *Anal. Chem.*, **62**, 950A-959A (1990).
19. J. W. Chang, A. Armaou, and R. M. Rioux, Continuous injection isothermal titration calorimetry for in situ evaluation of thermodynamic binding properties of ligand-receptor binding models, *J. Phys. Chem.*, **125**, 8075-8087 (2021).
20. D. Prozeller, S. Morsbach, and K. Landfester, Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle-protein interactions, *Nanoscale*, **11**, 19265-19273 (2019).
21. T. R. Middendorf and R. W. Aldrich, Structural identifiability of equilibrium ligand-binding parameters, *J. Gen. Physiol.*, **149**, 105-119 (2017).
22. T. R. Middendorf and R. W. Aldrich, The structure of binding

- curves and practical identifiability of equilibrium ligand-binding parameters, *J. Gen. Physiol.*, **149**, 121-147 (2017).
23. T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L. Lung-Nan, Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal. Biochem.*, **179**, 131-137 (1989).
24. W. H.J. Ward and G. A. Holdgate, 7 Isothermal titration calorimetry in drug discovery, *Prog. Med. Chem.*, **38**, 309-376 (2001).
25. P. D. Kwong, M. L. Doyle, D. J. Casper, C. Cicala, S. A. Leavitt, S. Majeed, T. D. Steenbeke, M. Venturi, I. Chaiken, M. Fung, H. Katinger, P. W. I. H. Parren, J. Robinson, D. V. Ryk, L. Wang, D. R. Burton, E. Freire, R. Wyatt, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, and James Arthos, HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites, *Nature*, **420**, 678-682 (2002).
26. Y. V. Griko, Energetics of Ca<sup>2+</sup>-EDTA interactions: calorimetric study, *Biophys. Chem.*, **79**, 117-127 (1999).
27. R. J. M. Hudson, D. T. Covault, and F. M. M. Morel, Investigations of iron coordination and redox reactions in seawater using <sup>59</sup>Fe radiometry and ion-pair solvent extraction of amphiphilic iron complexes, *Mar. Chem.*, **38**, 209-235 (1992).
28. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8<sup>th</sup> ed., 236-257, W. H. Freeman and Company, NY (2010).
29. M. CHEN and R. S. REID, Solution speciation in the aqueous Na(I)-EDTA and K(I)-EDTA systems, *Can. J. Chem.*, **71**, 763-768 (1993).
30. D. Bhattacharyya and C. Y. Raymond Cheng, Activated carbon adsorption of heavy metal chelates from single and multicomponent systems, *Environ. Prog.*, **6**, 110-118 (1987).

#### Authors

Ga Eun Yuk; B.Sc., Graduate student, Researcher, Department of Chemical Engineering, Kumoh National University of Technology, Gumi-si 39177, Korea; ykk1719@kumoh.ac.kr

Ji Woong Chang; Ph.D., Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Kumoh National University of Technology, Gumi-si 39177, Korea; jwchang@kumoh.ac.kr