

Cr(III)-picolinate 착물의 합성과 구조분석에 관한 연구

김성일 · 강대경 · 차기원*

(주)이지바이오시스템 생물자원연구소, 인하대학교 화학과
(2002. 8. 12 접수, 2003. 1. 15 승인)

Synthesis and structural analysis of chromium(III) picolinate complexes

Sung-Il Kim, Dae-Kyung Kang and Ki-Won Cha*

Bio-Resources Institute, EASY BIO System, Inc, Chonan 330-822, Korea

Department of Chemistry, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received Aug. 12, 2002, Accepted Jan. 15, 2003)

요 약 : Cr(III) picolinate는 생체이용성 물질로 동물이나 사람에게 필수 미네랄 크롬을 공급하는 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 두 가지 방법으로 Cr(III)-picolinate를 합성하고 원소분석, FT-IR, 고성능액체크로마토그래피 및 MALDI-MS 등으로 생성물 및 부산물의 순도와 구조를 확인하였다.

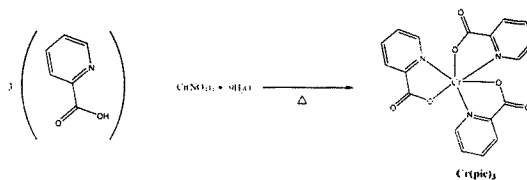
Abstract : Chromium(III) picolinate, a highly bioavailable compound, is known to be used for supplementing essential chromium(III) to human beings and animals. Two different methods were used to synthesize chromium(III) picolinate. The synthetic products were characterized by elemental analysis, FT-IR, high performance liquid chromatography (HPLC) and MALDI-MS.

Key words : Chromium(III) picolinate, MALDI-MS, FT-IR, elemental analysis

1. 서 론

Cr(III) picolinate는 chromium(III) tris (picolinate) 라고도 하며 Cr(III)과 picolinic acid가 1:3의 몰비로 결합된 분홍색 착물이며 Scheme 1과 같은 구조를 갖는다. (Cr(pic)₃로 표기)^{1,2} Cr(pic)₃는 지용성으로서 세포막을 통과할 수 있고,^{1,3} 골근육 세포를 증가시키며, glucose와 leucine의 흡수력을 향상시킨다.³ 현재 영양 보충제 및 체중감량제

로 쓰이고 있는데, 성인 당뇨병 증상 완화작용 및 탄수화물과 지방 대사에도 유용한 것으로 알려졌다.^{4,5}



Scheme 1. Synthetic method 1 for preparation of material A

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)32-860-7676 Fax : +82+(0)32-872-2520

E-mail : kwcha@inha.ac.kr

그러나 picolinate가 한 개 또는 두개 결합된 착물은 insulin 활성에 효과가 없는 것으로 알려져 있다.⁶ 식품에서 Cr(III)은 0.5% 정도 흡수되는데,⁷ 동물의 신체조직에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 사료에 첨가된 Cr(pic)₃는 지방분을 현저하게 줄이며 근육성분을 증가시키는 효과가 있다.^{8,9} 쥐의 무게 1 kg당Cr(III) 30 mg 수준까지 투여한 결과 독성이 거의 없었다고 보고된 바 있으나,¹⁰ 인체에 부작용을 준다는 보고도 있다.¹¹⁻¹³

Ley와 Ficken의 방법에 의하면 Cr(pic)₃는 수용액상태에서 Cr(III) 염(chromic acetate, chromic nitrate, chromic perchlorate, chromic chloride, chromic sulfate 등)과 picolinic acid를 반응시켜 얻는다.¹⁴⁻¹⁹ 합성시의 pH에 따라 보라색 부산물 [Cr(pic)₂OH]₂가 생성되는 것이 알려져 있다.¹⁵

Cr(pic)₃의 분석법으로는 UV 흡광법,¹⁵ FT-IR²¹, NMR 분광법²¹⁻²³ 및 X-선 회절분석법¹⁵ 등이 사용되어 왔다. 본 연구에서는 두 가지 다른 방법으로 합성된 Cr(III)의 picolinate 착물을 분석하기 위해 HPLC로 반응 생성물 및 부산물을 분리 검출하고 부산물을 분리 정제하여 반응생성물과 함께 ICP-AES, elemental analysis, FT-IR, MALDI/MS등으로 구조 분석 하였다.

2. 실험

2.1 시약

Chromium(III) nitrate nonahydrate (순도: 99.99%)와 picolinic acid (순도: 99%)는 Aldrich사 제품을 사용하였고 상업적으로 판매하는 Cr(pic)₃ 시약은 ICN사 제품을 사용하였으며, Acetonitrile은 HPLC급의 Merck사 제품을 사용하였다. Milli-Q (Millipore-Milford, MA, USA)를 이용하여 제조된 초순수를 사용하였다. HPLC 컬럼은 SMT사의 total coverage B191A (C18, 5 μm particle size, 4.6 mm×250 mm)를 사용하였다.

2.2 기기

원소 분석용 기기는 EA1110 (CE instruments)를 사용하였고, 분석조건은 산소압력 1.5 bar, 운반기체압력 1.5 bar, 기체유속 120 mL/min, 노온도 1000 °C, 오븐 온도 60 °C 이었으며 sulfanilamide (Fluka사)를 표준시약으로 사용하였다. ICP-AES 기기는 ICPS-1000IV (Shimadzu 사) 이용하여 Cr 원소정량에 사용되었다. FT-IR 스펙트럼은

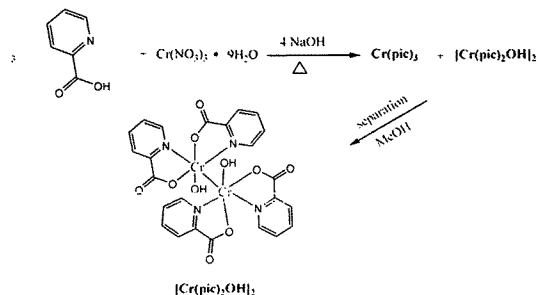
Nicolet Magna 550 Series II (Midac Co., USA)기기를 사용하였고, 시료를 KBr powder와 300 : 1로 섞어 pellet으로 만들어 측정하였다. 분리 분석을 위해 Jasco사의 degasser 장비 DG-1580-54, 용매선택기 LG-1580-04, 펌프 PU-1580 및 UV 검출기 UV-1575로 구성된 HPLC 시스템을 사용하였다. 크로마토그램은 UV 검출기의 파장은 264 nm에서 얻었다. 이동상은 acetonitrile과 물의 비가 6 : 4 인 용액을 0.45 μm nylon으로 거르고 사용하기 전에 탈기하여 사용하였다. 이동상의 유속은 1 mL/min이다. MALDI 질량스펙트럼은 Voyager-DE STR™ Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Inc)을 사용하여 얻었다.

2.3 Cr(III)의 picolinate 착물 합성 및 정제

합성방법 1: Stearns¹⁵의 합성절차에 따라 0.16 M Cr(NO₃)₃·9H₂O, 0.55 M picolinic acid 및 0.16 M HNO₃ 용액을 각각 30 ml씩 가하고 60 °C에서 이 혼합용액을 30분간 교반하면서 반응시킨다. 최종 붉은 보라색 용액 (pH 1.0)을 거르고, 침전물은 100 °C에서 4시간 동안 건조하였다.

합성방법 2: 합성방법 1의 과정에서 0.16 M HNO₃ 용액대신 0.4 M NaOH 용액을 넣고 60 °C에서 이 혼합용액을 30분간 교반하면서 반응시킨다. 최종 보라색 용액 (pH 5.0)을 거르고 침전물은 100 °C에서 4시간 동안 건조하였다.

물질 B의 분리 정제: 합성방법 2에 의해 만들어진 물질 2 g을 비이커에 넣고 메탄올 100 mL 를 가한 후 2분간 저어준다. 붉은색 침전물은 가라앉고 상등액은 푸른색을 띤다. 상등액을 취해 감압 증류하여 얻은 물질을 다시 메탄올에 넣고 다시 정제하여 높은 순도의 푸른색 물질을 얻는다 (Scheme 2).



Scheme 2. Synthetic method 2 and the separation of material B

3. 결과 및 고찰

3.1 HPLC 크로마토그램

합성방법1의 생성물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 용액으로 만들어 20 μl 을 주입하고 1 mL/min 의 용리액 (acetonitrile:물 =6:4)을 사용하여 Fig. 1와 같이 분리 분석하였다. 264 nm에서 얻은 UV 크로마토그램에서 단 하나의 봉우리가 2.35분에 나타났으며 이는 $\text{Cr}(\text{pic})_3$ (물질A)에 해당한다 (Stearns의 합성 절차에 근거하여). 크로마토그램을 기준으로 볼 때 순도는 약 98.6%이다.

합성방법2의 생성물을 같은 방법으로 분리 분석한 Fig. 2 (a)의 크로마토그램에서와 같이 2.20분과 2.35분에서 두 개의 봉우리가 나타났다. 2.35분에서 나타난 성분은 Fig. 2 에서와 같이 물질A에 해당하나, 2.20분에서 나타난 성분은 구조 확인이 필요하여 위에서 언급한 바와 같이 분리 정제하였다. 분리 정제된 물질 B의 크로마토그램을 같은 조건에서 얻은 결과 Fig. 2 (b)에서와 같이 2.20분에 하나의 봉우리가 나타나 이 물질은 Fig. 3 (a)의 2.20분에 검출된 물질과 같음을 알 수 있다. 얻어진 물질 B의 순도는 크로마토그램을 기준으로 99.0%이다.

3.2 물질 A 및 B의 원소분석과 FT-IR 스펙트럼

각 물질의 원소분석은 elemental analysis 및 ICP-AES를 이용하여 수행되었다. Cr 함량은 ICP-AES로 측정하였으며, C H N 함량은 elemental analyzer를 이용하여 측정하였다.

합성방법1에 의해 만들어진 물질 A와 합성방법2의 생성물로부터 분리 정제한 물질B를 각각 원소 분석한 결과는 Table 1, Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 물질 A의 원소분석값은 $\text{Cr}(\text{pic})_3$ 의 이론값과 일치하였다. 또한 물질 A의 FT-IR 스펙트럼은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 상업적으로 판매하는 $\text{Cr}(\text{pic})_3$ 시약을 사용하여 얻은 FT-IR 스펙트럼과 일치 하였다.

물질 B의 원소분석값은 물질 A의 분석값과 다르고 Stearns에 의해 알려진 $[\text{Cr}(\text{pic})_2\text{OH}]_2$ 의 원소 분석값에 가깝다. Table 3에서 보면, 물질 B의 FT-IR 스펙트럼은 물질 A의 그것과 비슷하지만 537 cm^{-1} 에서 새로운 봉우리가 생겼다. 이는 Cr-Cr 결합의 진동 봉우리로 확인되었다.

Table 1. Elemental analysis of the product obtained by synthetic method 1 (scheme 1)

| | Cr (%) | C (%) | H (%) | N (%) |
|--------------------------|--------|-------|-------|-------|
| Calculation ^a | 11.9 | 49.55 | 3.23 | 9.63 |
| Found (n=3) [†] | 11.9 | 49.21 | 3.06 | 9.76 |

^aCalculation based on $\text{Cr}(\text{pic})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, [†]Mean value with three measurements,

Table 2. Elemental analysis of material B obtained by scheme 2.

| | Cr (%) | C (%) | H (%) | N (%) |
|--------------------------|--------|-------|-------|-------|
| Calculation ^a | 16.14 | 44.73 | 3.13 | 8.69 |
| Found (n=3) [†] | 16.16 | 44.37 | 3.16 | 8.94 |

^aCalculation based on $[\text{Cr}(\text{pic})_2 \cdot \text{OH}]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, [†]Mean value with three measurements

3.3 MALDI-MS에 의한 물질 A 및 B의 구조 분석

물질 A와 B의 구조를 확인하기 위하여 MALDI-MS를 이용하여 질량스펙트럼을 얻었다. 사용한 분석 조건은 Table 4와 같으며, 매트릭스는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 사용하였다. 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 물질 A 및 B 용액을 각각 1 μL 사용하고 20 mM 매트릭스용액 1 μL 를 사용하여 얻은 물질 A와 B의 MALDI 질량스펙트럼은 각각 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다.

Fig. 4의 m/z 419 봉우리는 $[\text{Cr}(\text{pic})_3 + \text{H}]^+$ 에 해당하며, m/z 441은 $[\text{Cr}(\text{pic})_3 + \text{Na}]^+$ 에 해당한다. 물질 B의 질량스펙트럼인 Fig. 5에서는 m/z 609가 주봉우리이다. 이는 Scheme 3에서와 같이 $[\text{Cr}_2(\text{pic})_4\text{OH}]^+$ 에 해당하며 Stearns 등의 결과를 고려하면 $[\text{Cr}(\text{pic})_2\text{OH}]_2$ 에서 하이드록시 음이온이 떨어져 나가면서 이온화된 결과로 판단된다. 또한 같이 관찰된 m/z 675 와 780은 $[\text{Cr}_2(\text{pic})_4\text{OH}]^+$ 에서 picolinate 또는 OH 하나가 매트릭스인 α -cyano-4-hydroxycinnamate와 치환되어 생긴 이온들로 생각된다.

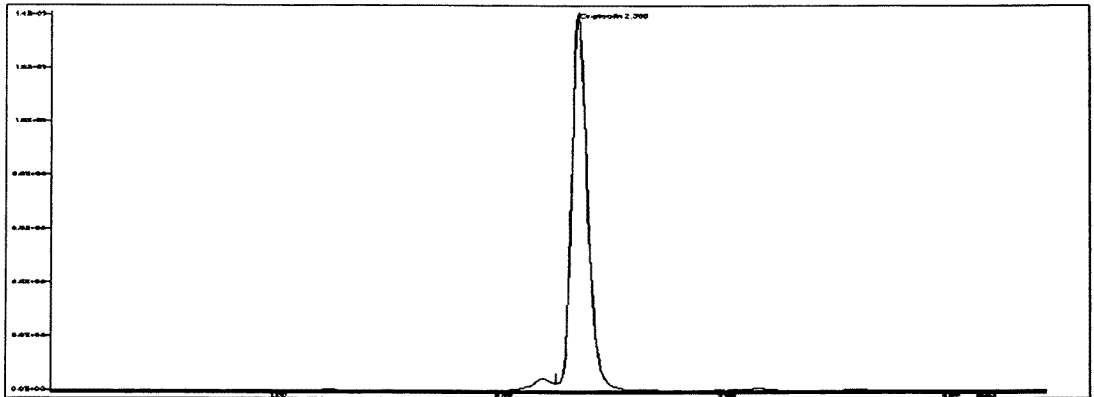


Fig. 1. Chromatogram of the material obtained by the synthetic method 1

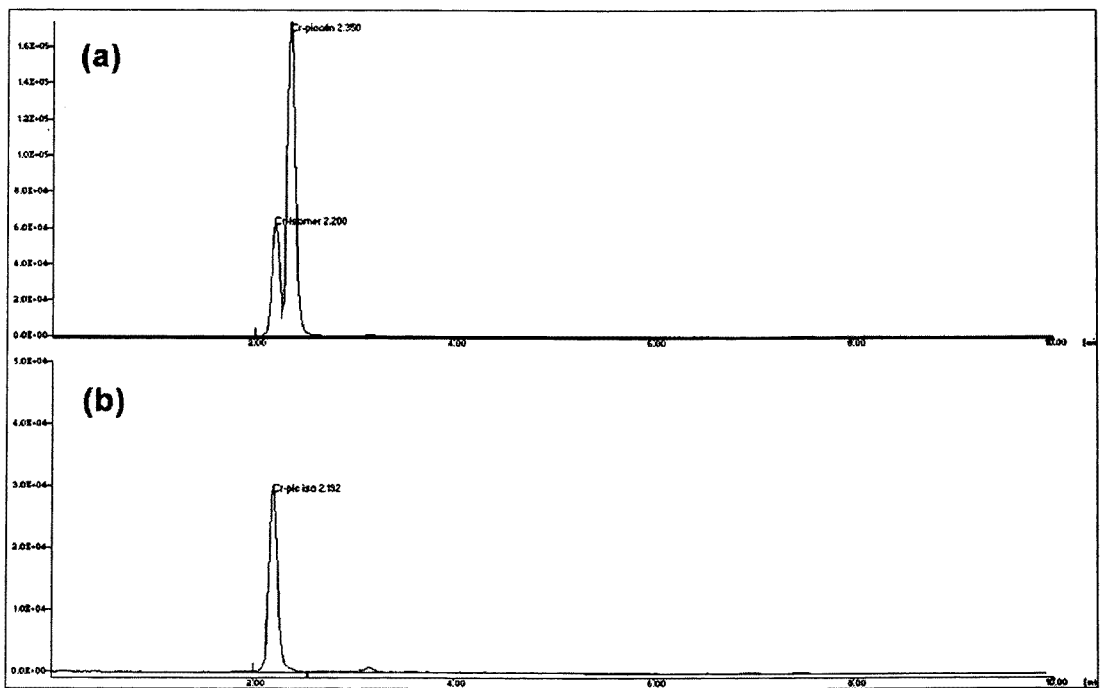


Fig. 2. Chromatogram of (a) the material obtained by the synthetic method 2, and (b) after purification of material B.

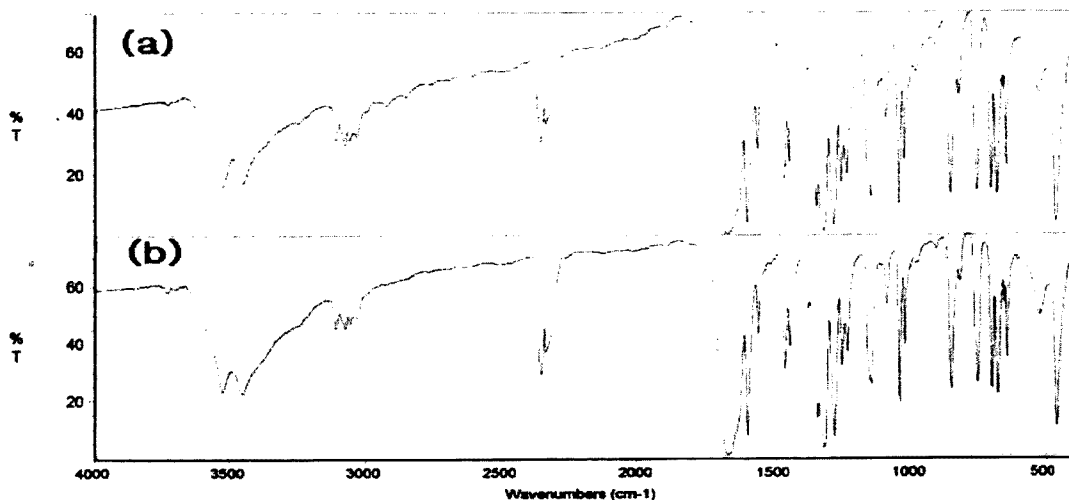


Fig. 3. FT-IR of (a) the material obtained by synthetic method 1
(b) commercially available $\text{Cr}(\text{pic})_3$

Table 3. FT-IR spectra of material A and B

| | s | s | m | m | s | m | m | m | m | m | m | w | w | s |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| material A | 1669 | 1608 | 1473 | 1327 | 1290 | 1153 | 1053 | 864 | 766 | 715 | 694 | 659 | ND | 475 |
| material B | 1648 | 1606 | 1468 | 1341 | 1285 | 1165 | 1049 | 866 | 762 | 714 | 692 | 656 | 537 | 463 |

Table 4. Operating conditions for MALDI-MS

| MALDI-Mass spectrometry Voyager-DETM STR Biospectrometry Workstation | |
|--|--|
| Mode of operation | reflector |
| Extraction mode | delayed |
| Polarity | positive |
| Accelerating voltage | 20000V |
| Grid voltage | 66 % |
| Mirror voltage ratio | 1.12 |
| Extraction delay time | 25 ns |
| Calibration matrix | α -cyano-4-hydroxycinnamic acid |

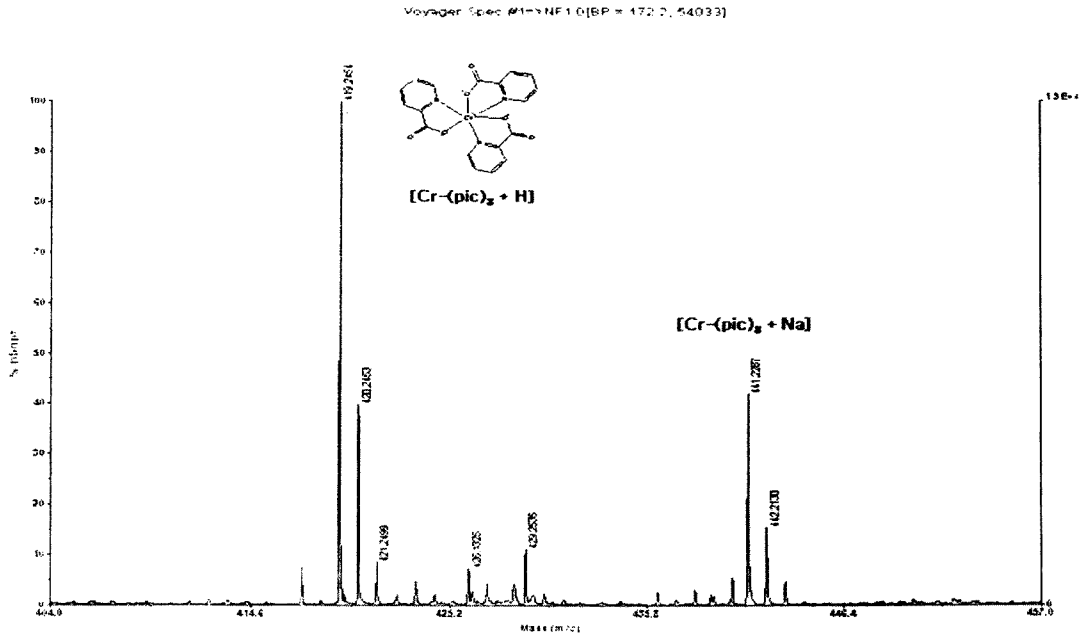


Fig. 4. Mass spectrum of material A

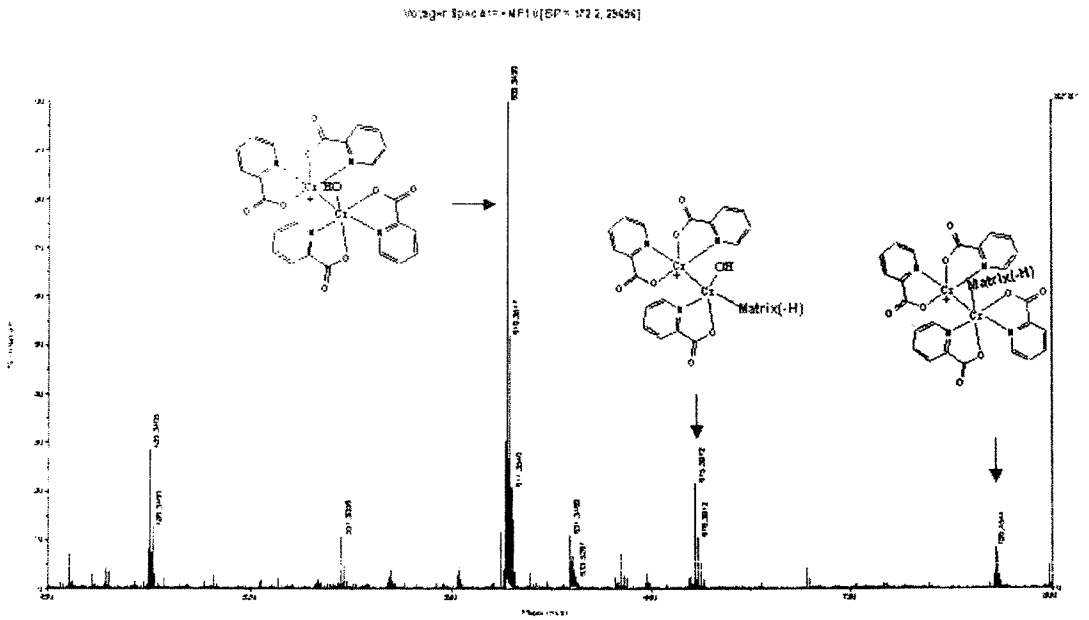
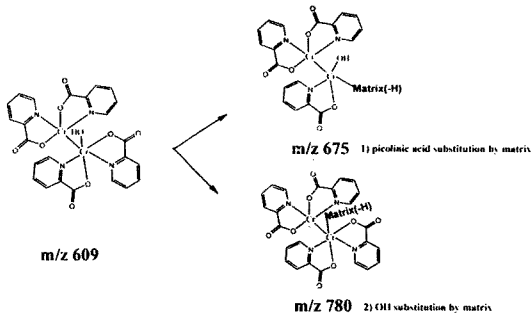


Fig. 5. Mass spectrum of material B



Scheme 3. Mass spectra of material B

4. 결론

본 연구에서는 두 가지 방법으로 Cr(III)-picolinate를 합성하고 원소분석, FT-IR, 고성능액체크로마토그래피 및 MALDI-MS 등으로 생성물 및 부산물의 순도와 구조를 확인하였다. 본 실험에서는 원소분석과 MALDI-MS 결과를 고려하여 판단할 때 Cr(pic)₃ 물질의 구조는 Stearns 등의 해석과 일치된 결과로 구조분석이 가능하였다. [Cr(pic)₂OH]₂의 경우에는 일부 매트릭스의 치환이 일어났으나, [Cr(pic)₂]₂OH⁺를 관찰함으로써 물질의 구조를 확인할 수 있었다.

참고 문헌

- G.W. Evan, D.K. Pouchnik, *J. Inorgan. Biochem.*, **49**, 177-187 (1993).
- S. Takata, E. Kyuno, R. Tsuchiya, *Bull. Chem. Soc.(Japan)* **41**, 3416-3418 (1968).
- G.W. Evans, T.D. Bowman, *J. Inorgan. Biochem.*, **46**, 243-250 (1992).
- A. Ravina, L. Slezack, *Harefuah*, **125**, 142(1993).
- R.A. Anderson, N. Cheng, N. Bryden, M. Polansky, N. Cheng, J. Feng., *Diabetes*, **46**, 178 (1997).
- G.W. Evans, D.J. Pouchnik, *J. Inorg. Biochem.*, **49**, 177 (1993).
- R.A. Anderson. 5th ed., Vol. 1, Academic Press, New York. 225(1987).
- T.G. Page, Ph.D thesis. Louisiana State University

- (1992).
- T.G. Page, T.L. Ward, L.L. Southern., *J. Animal Science Suppl.* **69**, 356 (1991).
- R.A. Anderson, N.A. Bryden, M.M. Polansky, *J. Am. Coll. Nutr.*, **16**, 273 (1997).
- D.M. Stearns, J.P. Wise Sr., S.R. Patierno, K.E. Wetterhahn, *FASEB J.*, **9**, 1643 (1995).
- D.M. Stearns, J.J. Belbruno, K.E. Wetterhahn, *FASEB J.*, **9**, 1650 (1995).
- J. Cerulli, D.W. Grabbe, M. Malone, M.D. McGoldrick, *Ann. Pharmacother.*, **32**, 428 (1998).
- A.J. Saraceno, B.P. Block, *Inorg. Chem.*, **2**, 864 (1963).
- D.M. Stearns, W.H. Armstrong, *Inorg. Chem.*, **31**, 5178 (1992).
- M. Bhattacharya, G.S. De, *Indian J. Chem.* **20A** 780 (1981).
- N.N. Borisova, A.A. Shabilalov, M.A. Azizov, *Koord. Khim.*, **13**, 1050 (1987).
- L. Campanella, E. Chiacchierini, G. De Angelis, V. Petrone, *Ann. Chim. (Rome)*, **67**, (1977) 385
- H. Ley, K. Ficken, *Ber.*, **50**, 1123 (1917).
- A.J. Saraceno, B.P. Block, *Inorg. Chem.*, **2**, 864 (1963).
- C. L. Broadburst, F. Walter, Schmidt, B. James., Reeves III, M.Marilyn, Polansky, K. Gautschi, A. Richard, *J. Inorg. Biochem.*, **66**, 119 (1997).
- K. F. Kingry, A. C. Royer, J. B. Vincent, *J. Inorg. Biochem.*, **72**, 79 (1998).
- N. E. Chakov, R. A. Collins, J. B. Vincent, *Polyhedron*, **18**, 2891 (1999).
- A.L. Burlingame, R.K. Boyd, S.J. Gaskell, *Anal. Chem.*, **68**, 599R (1996).
- F. Hillenkamp, M. Karas, R. Beavis, B.T. Chait, *Anal. Chem.*, **63**, 1193A (1991).
- M. Karas, U. Bahr, *Anal. Chem.*, **9**, 321(1990).
- F. Hillenkamp (Editor), *Int. J. Mass spectrum. Ion Processes (Special Issue)*, **169/170** (1997).
- J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. White-house, *Science*, **246**, 64 (1989).