

형광측정법을 이용한 히스타민 분석방법 개발 연구

이재성[†] · 김영상^{*} · 차기석[†] · 이희정^{*} · 홍천수^{**} · 남혜원^{***} · 명춘옥^{****} · 이기원^{*****} · 이양자^{*****}

[†] 한국과학기술연구원 특성분석센터

^{*} 고려대학교 화학과

^{**} 연세대학교 의과대학 내과학교실

^{***} 수원여자전문대학 식품영양학과

^{****} 오산전문대학 식품조리학과

^{*****} 경원대학교 식품영양학과

^{*****} 연세대학교 식품영양학과

(1996. 10. 4. 접수)

A Study on the Analysis of Histamine by Spectrofluorimetry

Jae Seong Rhee[†], Young Sang Kim^{*}, Ki Suk Cha[†], Hee Jung Rhee^{*}, Chein Soo Hong^{**},
Hae Won Nam^{***}, Choon Ok Myung^{****}, Ki Wan Lee^{*****}, Yang Cha Lee^{*****}

[†] Korea Institute of Science & Technology, Seoul 136-719, Korea

^{*} Department of Chemistry, Korea University, Jochiwon 339-700, Korea

^{**} Department of Internal Medicine, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

^{***} Department of Food and Nutrition, Suwon Womens University, Suwon 139-774, Korea

^{****} Department of Food and Cooking, Osan College, Osan 447-749, Korea

^{*****} Department of Food and Nutrition, Kyungwon University, Sungnam 461-701, Korea

^{*****} Department of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

(Received Oct. 4, 1996)

요약 : 생물학적 분비물에서 히스타민의 측정시 HPLC-fluorimetry가 많이 응용되어 발달되어 왔다. 그러나 시간 소비와 HPLC system을 최적의 운영조건으로 유지시키는 것이 상대적으로 어렵기 때문에 직접 형광법을 이용하여 히스타민을 분석하였다. 표준 용액에서 형광측정법의 경우 검출 한계는 $3.0 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mL}$ 였고 이 때 상대표준편차는 3.74%~16.2%였다. 시료에서 HPLC-fluorimetry와 형광측정법 사이의 상대적인 히스타민 농도비율은 1.5~3.5배의 차이를 보였다. 표준물첨가법에 의한 각각의 시료에 대한 수득률은 100%~125%였다.

Abstract : The application of high performance liquid chromatography(HPLC) with fluorimetric detection for the measurement of histamine in biological fluids has been developed recently. Because of time consumption during measurement and difficulties in controlling optimum operating condition for HPLC system, spectrofluorimetry was adopted to detect histamine. Detection limit by spectrofluorimetry was $3.0 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mL}$ with R. S. D. 3.74%~16.2% on standard solution. The relative ratio of histmine levels between the result from HPLC-fluorimetry and that from spectrofluorimetry ranged from 1.5 to 3.5.

The recoveries of each samples obtained from standard addition method by spectrofluorimetry have shown 100%~125%.

Key words : Histamine, Spectrofluorimetry.

1. 서론

히스타민은 신경학적 과정에서 매우 중요한 매개체이며 신경전달 및 식품 알레르기에 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌다. Hypersensitivity작용¹에 있어 히스타민은 비반세포²로부터 나오며 위산 분리에 중요한 역할을 지니고 있다.^{3,4} 생물학적 시료들 중에서 히스타민 검출을 위한 HPLC-fluorimetry 방법들이 최근에 많이 발표되고 있다. 현재까지 많은 생물학적 물질들 중에서 히스타민을 분석 정량하는 방법으로는 히스타민과 *o*-phthaldialdehyde(OPA) 응축에 근거를 둔 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)-fluorimetry 방법이 가장 일반적이나^{5,6} 시료를 HPLC에 이용하기에 앞서서 착물 제거를 위한 정제 단계가 필요하다. HPLC에 응용되는 가장 일반적인 두 가지 정제방법은 이온교환수지를 이용한 방법과⁷⁻⁹ 알코올 추출방법이다.¹⁰ 이들의 주요 장점은 다른 radioenzymatic 측정법^{11,12}이나 다른 형광측정법보다 상대적으로 경제적인 수 있다는 점에 있다. 그러나 HPLC-fluorimetry 측정법 역시 최적의 분석조건 상태를 일정하게 유지하는 것은 어려우며 직접형광측정법보다 간단하지는 않다.

직접형광측정법은 많은 시료를 분석할 경우에 더욱 편리하고 짧은 시간내에 분석을 완료할 수 있다. 형광측정법¹³은 흡광도폭을 좁히고 흡광 형태를 단순화시킨 전통적인 형광기술¹⁴을 개선시킨 간단한 방법이다. 이러한 개선은 흡광 파장이 겹치는 문제를 해결하였고 좋은 분리를 얻을 수 있도록 하였다. 최고의 형광 감도는 발광파장과 흡광파장의 차이가 파장 증가($\Delta\lambda$)와 일치할 때 얻을 수 있다.¹⁵ 이러한 이점 때문에 직접형광측정법을 이용할 경우 시간과 비용을 절약할 수 있는 장점이 있으며, 특정한 발광파장과 흡광파장을 동시에 고정시켜 최고의 감도를 얻을 수 있다.¹⁶ 본 연구는 일반적인 HPLC-fluorimetry 측정법과 직접형광측정법을 비교 분석함으로써 빠른 시간내에 경제적으로 많은 시료를 재현성 있게 분석할 수 있는 방법을 제시

하였으며, 현재까지 발표된 연구를 토대로 최적의 상태를 얻기 위해 pH, OPA 농도, 온도, 그리고 반응시간 등에 따른 분석의 효능에 대해 실험하였다.

2. 실험

2.1. 시료 및 시약

본 실험에 사용된 포장 시료는 국내 제조 회사의 제품을 사용하였으며, 그 외의 시료들은 시판되는 것을 사용하였고 사용 전까지는 0°C~4°C에 보관하였다. 추출에 사용된 메탄올은 J&T Baker(NJ, U.S.A.)의 HPLC급 100%를 사용하였고 형광 측정에 사용된 NaOH는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan) 96%를 사용하였다. HCl은 동양화학공업(Inchon, Korea) 시약을 사용하였으며, 히스타민-OPA 반응 정지에 사용된 H_3PO_4 는 85% J&T Baker의 시약을 사용했다. 표준물질로 사용한 histamine [2-(4-inidazolyl)ethylamine]과 유도체 만드는 데 사용된 OPA(*o*-phthaldialdehyde)는 Sigma Chemical(MO, U.S.A.) 99%를 사용했다. 컬럼 크로마토그래피에 충전된 수지는 DE-52 resin(diethyl-aminoethyl cellulose)으로 음이온 교환수지이며 Whatman International Ltd. (Baidston, U.K.) 제품을 사용했다. 물은 1차 증류한 후 2차로 이온교환수지를 통과시킨 것을 사용했다.

2.3. 기기

형광 측정에 사용된 동시분광광도계 LS-5 luminescence spectrometer는 Perkin Elmer(Bodenseewerk, Germany)사의 분광기로서 xenon 램프가 설치되어 있다. λ_{ex} 는 230nm에서 700nm까지, λ_{em} 은 250nm에서 800nm까지 동시에 측정할 수 있는 것을 사용하였다. 형광측정법과 비교하기 위해 사용된 HPLC는 Hewlett Packard 1050(Waldbronn, Germany)의 Hewlett Packard 1050 series를 사용했고 컬럼은 hyposil이었다. 형광검출기는 HP 1046A를 사용하였다.

2.4. 이온교환수지

DE-52 수지를 DE-OH 형태로 바꿔 주기 위해 2N NaOH 15mL/g을 수지에 가하고 약 30분간 젖는다. 2차 증류수를 이용하여 수지를 5~10회 닦아 낸다. 유리 컬럼[8cm(높이) × 1cm(내경) × 0.2cm(두께)] 바닥에 유리솜으로 충전한 다음 수지를 8cm 높이로 충전한다. 이 때 2차 증류수가 수지보다 약 2mm 위에 있어야 한다. 2차 증류수 10mL를 용리시킨다.

2.5. 분석 방법

맥주, 멸치, 참치, 치즈, 닭고기, 햄, 그리고 갈치의 무게를 쟀 다음 메탄올 100mL를 사용하여 3~4분간 추출하여 거른다. 이렇게 준비된 추출물을 이온교환수지 컬럼에 1mL 넣은 후 4~5mL 2차 증류수를 가한다. 이 때 1N HCl 5mL가 포함된 50mL 부피 플라스크에 용리액을 받는다. 컬럼 내부의 시료용액 높이가 2mm가 되었을 때 2차 증류수 5mL를 가한다. 컬럼으로부터 약 35mL의 용리액을 부피 플라스크에 받은 후 컬

럼 흐름을 정지시키고 50mL 정량선까지 2차 증류수로 맞춘다. HPLC의 이동상은 0.004M KH₂PO₄(pH 3.5: H₃PO₄를 사용하여 조정)와 CH₃CN을 30:70(v/v)으로 만들고, 흐름속도를 1.0mL/min으로 고정시킨다. 준비된 액체시료 10μL를 C8 컬럼(25cm × 0.46cm)을 장치한 HPLC(λ_{ex}: 350nm, λ_{em}: 444nm)에 주입한다. 직접형광측정법의 경우 위에서 준비된 액체시료 5mL를 삼각플라스크에 가한다. 0.1N HCl 10mL, 1N NaOH 3mL, 그리고 0.1% OPA 1mL를 가한다. 각 단계마다 용액이 완전히 섞이는 것이 매우 중요하다. 5분 후 3.57N H₃PO₄ 3mL를 가한 후 10분 이내에 형광세기(λ_{ex}: 350nm, λ_{em}: 444nm)를 측정한다. Fig. 1은 히스타민의 반응 단계를 나타낸 것이고¹⁷ Fig. 2는 실험의 전체적인 흐름도를 나타낸 것이다.

2.6. 계산법(농도)

직접형광측정법을 이용한 시료 중의 히스타민의 농도(μg/g)는 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{mg Histamine}/1000\text{g sample} = C_{\text{HS}} \times \text{FI}_s / \text{FI}_{\text{HS}} \times 100\text{mL} / W_s \times 50\text{mL} / 1\text{mL}$$

C_{HS}: Concentration of histamine standard solution

FI_s: Fluorescence intensity of sample

FI_{HS}: Fluorescence intensity of histamine standard solution

W_s: Weight of sample

100mL / W_s: 시료의 무게(g)를 정량하여 MeOH 100mL로 추출한 인자

50mL / 1mL: 추출 후 거른 시료 1mL를 이온교환수지에 넣어 용리시킨 후 50mL 정량선까지 증류수로 묽힌 인자

3. 결과 및 고찰

3.1. 발광파장과 흡광파장의 선택

최고의 감도를 나타내는 특정 발광파장 최대값과 흡광파장 최대값을 찾기 위해 발광파장은 250nm~800nm, 흡광파장은 230nm~720nm 사이에서 전체 주사해 보았다. 그 결과 λ_{em(max)}는 444nm에서, λ_{ex(max)}

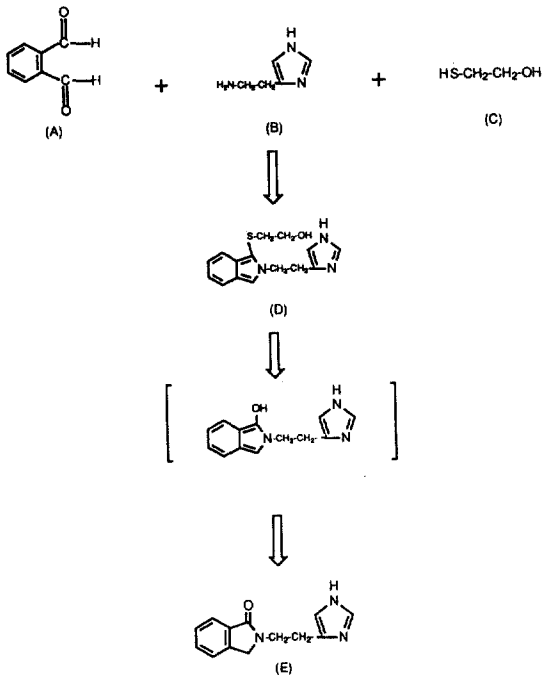


Fig. 1. The reaction mechanism of histamine with OPA derivatization reagent with (A) O-phthalaldehyde, (B) histamine, (C) ethanthiol, (D) isoindole and (E) 2,3-dihydro-1H-isoindole-1-one.

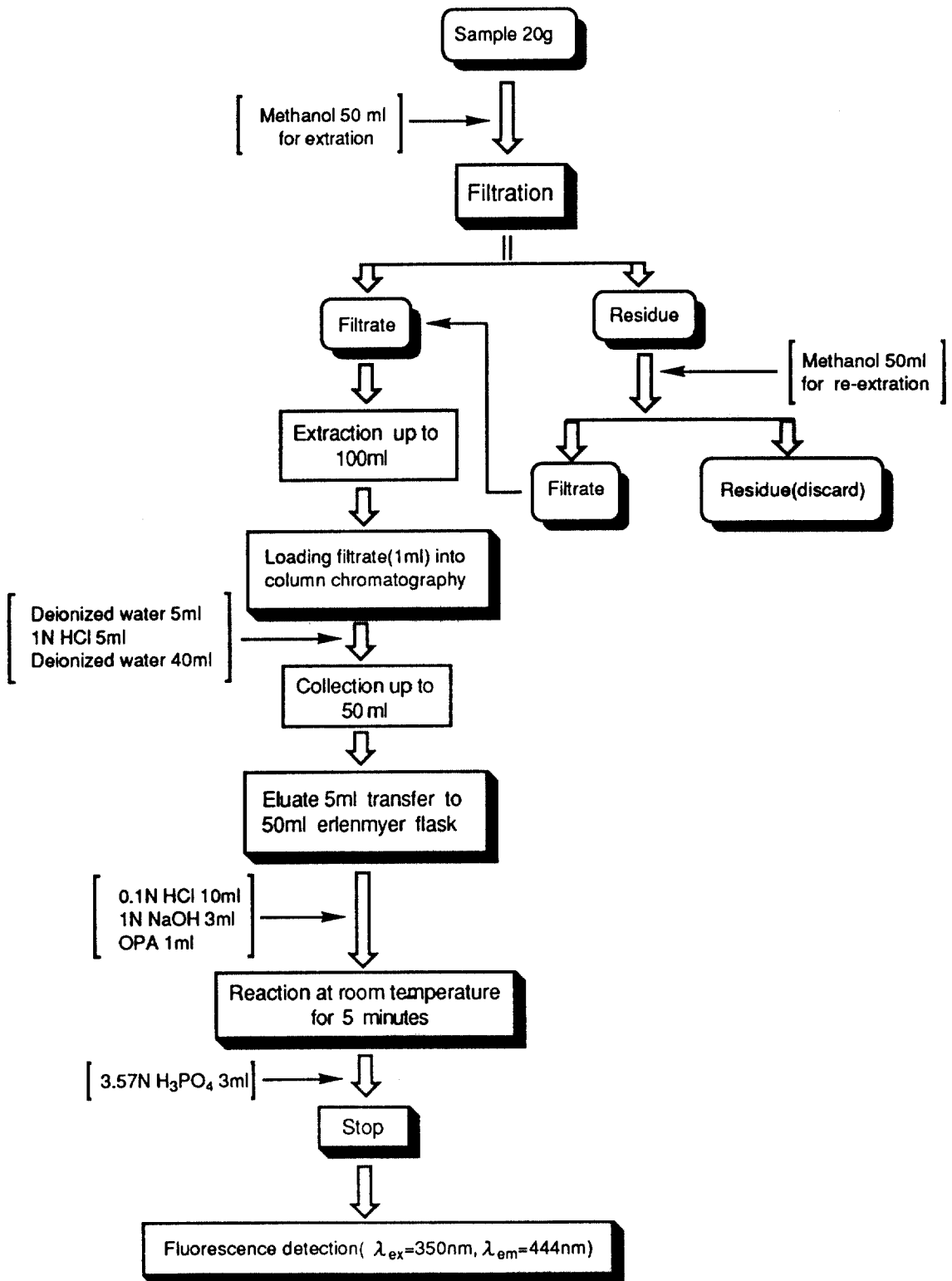


Fig. 2. Experimental flow chart for the determination of histamine in various samples under the help of OPA derivatization reagent, and followed by spectrofluorimetry.

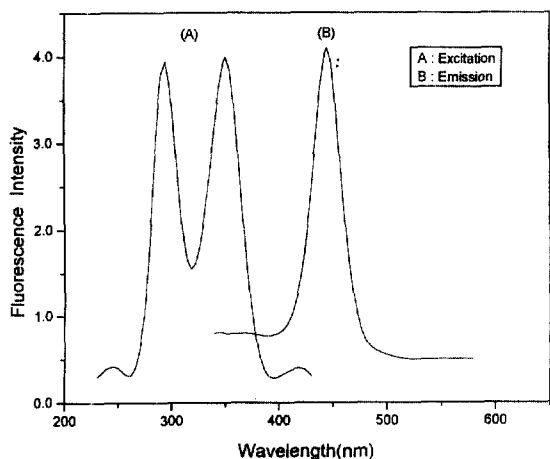


Fig. 3. (A) Excitation and (B) Emission spectra of the reaction products of OPA-histamine. (λ_{em} range : 380nm~600nm, λ_{ex} :fixed at 350nm, chart speed : 80nm/min, record speed : 10nm/cm, scan speed : 240nm/min).

는 350nm에서 최고 감도를 얻었다. Fig. 3-A)는 λ_{em} 을 444nm에 고정시킨 후 $\Delta\lambda_{ex}$ 를 250nm~430nm에서 주사한 것이며, Fig. 3-B)는 λ_{ex} 를 350nm에 고정시킨 후 $\Delta\lambda_{em}$ 을 380nm~600nm에서 주사한 것이다. 주사 속도가 증가하면 피크의 높이와 분리능이 증가하였다.

3.2. 검정곡선

동시형광측정법의 경우 특정 λ_{ex} 와 λ_{em} 을 동시에 선

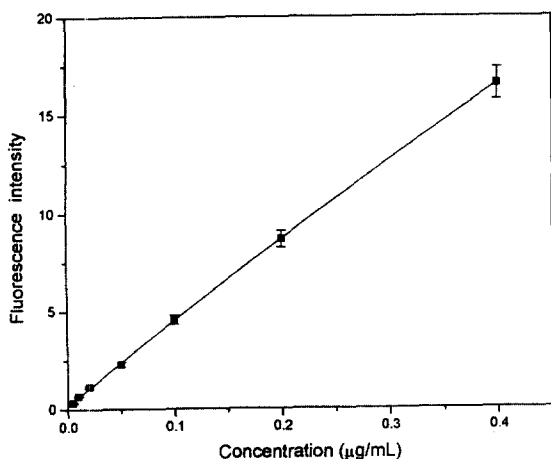


Fig. 4. The calibration curve of OPA-histamine adducts ranged from 0.005µg/mL to 0.4µg/mL by spectrofluorimetry at λ_{em} : 444nm λ_{ex} : 350nm.

택할 수 있고, 모든 흡수 화학종이 형광을 나타내지는 않으므로 형광의 감도와 선택도는 자외선흡수분광법보다 높고 검출 한계는 낮다. Fig. 3-A), B)에서 흡광 및 발광과장을 선택한 후 각 표준물을 농도에 따라 형광세기를 측정하였고 결과를 Fig. 4에 나타내었다. $5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ 에서 $4.0 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ 까지는 좋은 선형도를 얻었으며 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 이상에서는 직선성에서 벗어났다. 각 농도에 대해서 n=5회씩 측정된 결과 R.S.D.범위는 3.74%~16.18%였고 $2.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서는 편차가 상대적으로 컸다.

3.3. 온도 변화의 효과

히스타민과 OPA가 반응하여 생긴 형광물질 2, 3-dihydro-1H-isoindole-1-one(Fig. 1의 (E))이 형성된 후 온도를 증가시키면서 형광세기를 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 25°C~30°C에서는 형광감도 변화가 없었으며 35°C 이상이 되면 형광세기가 감소함을 알 수 있었다. 온도의 증가는 형광물질의 구조를 불안정하게 만든다는 것을 알 수 있다. 시료분석시 온도는 27°C였다.

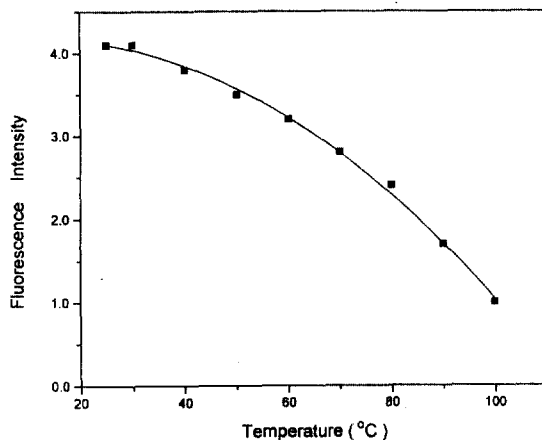


Fig. 5. The effect of temperature on the fluorescence intensity for the reaction of OPA and histamine from 25°C to 100°C.

3.4. pH 변화의 효과

일반적으로 OPA는 pH 9~11의 수용액에서 히스타민과 반응하여 isoindole(Fig. 1의 (D))을 빠른 속도로 형성시킨다. 본 실험에서의 경우 isoindole이 형성되었을 때의 pH는 12.3이었다. 0.01N HCl을 이용하여 pH

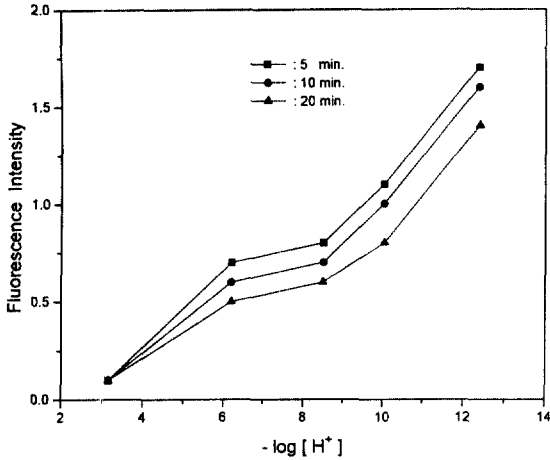


Fig. 6. The effect of pH on the fluorescence intensity of OPA and histamine reaction at various reaction time 5, 10 and 15 minutes.

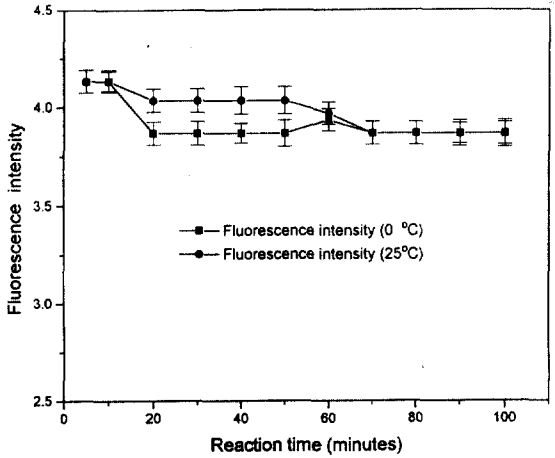


Fig. 7. The effect of reaction time between OPA and histamine reaction on the fluorescence intensity at 0°C and 25°C.

에 대한 영향을 살펴본 결과 Fig. 6에서와 같이 pH가 증가함에 따라 형광세기도 증가함을 알았다. 이 결과는 pH가 낮아짐에 따라 isoindole이 분해되어 형광을 나타내지 않는 물질로 감성됨을 보여 주며, OPA와 히스타민이 반응하여 얻는 감도는 pH 12.3에서 높은 형광세기를 얻을 수 있음을 뒷받침해 준다. OPA-히스타민의 반응을 정지시키는 방법으로 3.57N H₃PO₄를 가하여 pH를 낮춰 주는 방법이 이용되는 것도 이러한 원리 때문이다. 또한 OPA-히스타민의 반응 정지시간을 5분, 10분, 그리고 20분에서 각각의 pH에서 형광세기를 측정 한 결과 5분에서 상대적으로 높은 형광세기를 얻었다.

3.5. 반응시간에 따른 형광감도의 변화

반응온도 조건을 0°C와 27°C(실온)로 고정시킨 후 isoindole이 형성된 후 시간 변화에 따른 형광세기 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 형광세기는 5~10분에서 상대적으로 높았으며, 10분이 지나면서 감소함을 보였다. 이것은 Fig. 6에서처럼 isoindole이 시간이 경과하면서 형광을 나타내지 않는 물질로 감성되는 것으로 생각된다.

3.6. OPA 농도의 영향

형광측정법을 이용하여 1차 아민을 정량 및 정성분석하는 방법으로 OPA가 많이 사용된다. 1차 아민의

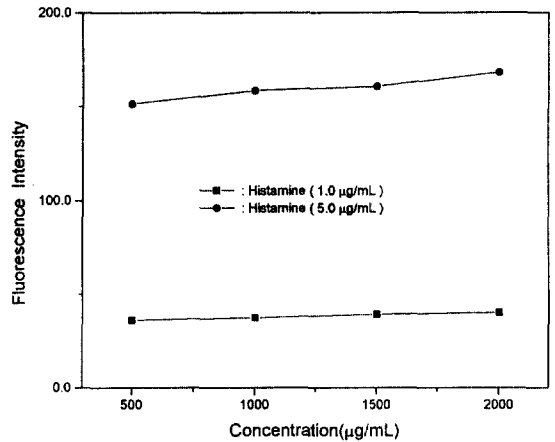


Fig. 8. The effect of OPA concentration on the fluorescence intensity of OPA-histamine reaction.

한 종류인 히스타민 정량분석에서 OPA의 농도가 반응에 어떤 영향을 끼치는지 Fig. 8에 보였다. 농도가 증가함에 따라서 형광세기는 증가하였으나 편차가 컸다. 따라서 본 실험에서 OPA 농도는 5.0 × 10² μg/mL의 농도를 이용했다.

3.7. 표준물질 첨가법에 의한 시료 중의 히스타민 수득률

형광측정법을 이용하여 각각의 시료에 대한 수득률을 측정하였다. 각각의 시료 일정량(20~30g)을 취하여 히스타민 표준용액 0.02μg/mL와 0.1μg/mL에 넣

Table 1. Recoveries of histamine obtained from ion exchange resin procedure after extraction by spectrofluorimetry on samples

Sample	Histamine level($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Recovery(%)
	added	found	
Beer	0.00	0.157	—
	0.02	0.194	108
	0.10	0.277	108
Anchovy	0.00	52.38	—
	0.02	52.89	100
	0.10	53.91	103
Tuna	0.00	8.57	—
	0.02	8.76	102
	0.10	9.17	106
Cheese	0.00	2.02	—
	0.02	2.22	109
	0.10	2.64	125
Chicken	0.00	18.93	—
	0.02	20.18	106
	0.10	22.54	118
Ham	0.00	2.79	—
	0.02	3.00	107
	0.10	3.32	115
Hairtail	0.00	8.41	—
	0.02	8.95	106
	0.10	9.82	115

Table 2. Comparison of histamine levels determined by HPLC and spectrofluorimetry

Sample	Histamine level($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Ratio ^a
	HPLC-fluorimetry	Spectrofluorimetry	
Beer	0.053	0.157	2.9
Anchovy	21.0	52.38	2.5
Tuna	2.44	8.57	3.5
Cheese	1.14	2.02	1.8
Chicken	12.83	18.93	1.5
Ham	1.23	2.79	2.3
Hairtail	4.48	8.41	1.9

a : The ratio of HPLC-fluorimetry and spectrofluorimetry concentration

어 시료를 추출하고 거른 후 1mL를 컬럼에 넣었다. 용리된 시료를 OPA와 유도체화반응을 시킨 후 형광측정법으로 측정하였다. 측정된 형광세기를 표준용액의

형광세기와 비교하여 수득률을 계산하였다. 그 결과 각각의 시료에 대한 수득률은 100~125%였고 Table 1에 나타내었다.

3.8. HPLC chromatograms 및 시료별 검출한계

지금까지의 결과를 토대로 HPLC와 형광측정법으로 실제 시료를 측정해 본 결과를 Table 2에 나타내었으며, 멸치에서 히스타민의 함유량이 가장 많았다. 시료의 HPLC-fluorimetry 크로마토그램은 Fig. 9에 나타내었고, 형광감도는 시료측정시 용리액의 pH나 농도와 같은 시료의 조건과 종류에 따라서 영향을 많이 받는다. Table 3은 두 방법에 의한 각 시료별 검출한계 범위를 나타내었다. 형광측정법을 이용할 경우 시료의 종류에 관계 없이 동일한 방법으로 시료를 용출 정제하여 측정한다. 따라서 matrix와 분리 정제된 시료 측정값은 기기적 환경이나 외부 요인의 영향을 적게 받

게 되며 모두 비슷한 검출한계를 갖는다. 두 방법상의 측정값이 다른 이유는 형광측정법에서는 OPA가 히스타민 이외의 물질들과 반응하여 생긴 화합물까지 검출함으로써 HPLC보다 높은 형광세기를 얻었다고 간주된다.

3.9. 방해효과의 제거¹⁶

히스타민을 정량하는 일반적인 방법은 OPA 유도체 화반응이다. 그러나 음식물 시료 중에는 히스타민과 구조가 비슷한 histidine, spermidine, tyramine, tryptamine 등의 생물학적 아민류가 있으며 OPA와 반응하여 형광물질을 형성할 수 있다. 그 중 histidine

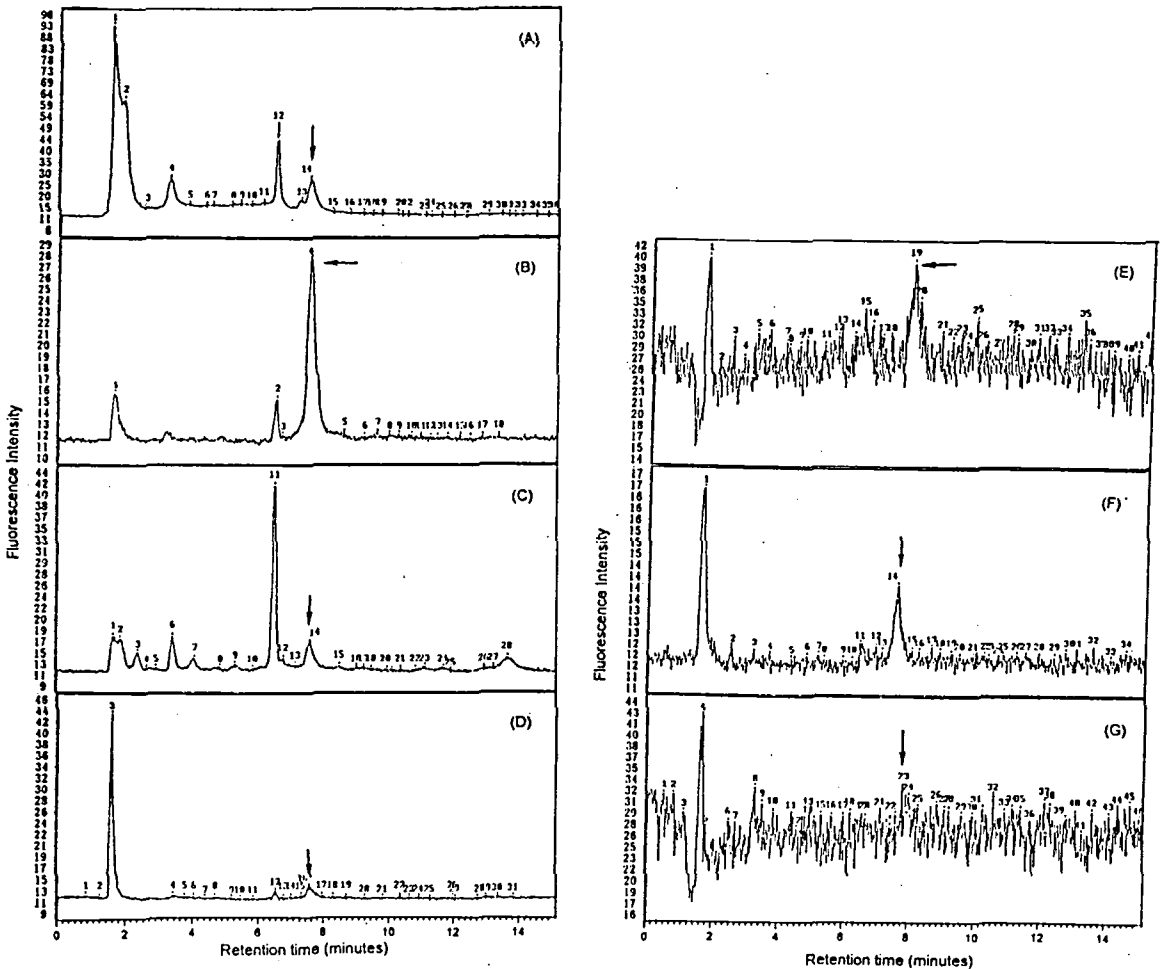


Fig. 9. The HPLC chromatogram of beer (A), anchovy (B), tuna (C), cheese (D), chicken (E), ham (F) and hairtail (G) on the determination of histamine. The presence of histamine is seen at the retention time of 7.5min.

Table 3. Comparison of detection limits on samples determined by HPLC and spectrofluorimetry

Sample	Detection limit($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	HPLC-fluorimetry ^a	Spectrofluorimetry ^b
Beer	6.25×10^{-2}	3.0×10^{-2}
Anchovy	4.46×10^{-2}	3.0×10^{-2}
Tuna	4.29×10^{-2}	3.0×10^{-2}
Cheese	2.14×10^{-2}	3.0×10^{-2}
Chicken	4.61×10^{-1}	3.0×10^{-2}
Ham	1.25×10^{-1}	3.0×10^{-2}
Hairtail	2.71×10^{-1}	3.0×10^{-2}

a : Detection limits were caculated at $S/N = 2$.

$$b : C_m = \frac{S_m - S_{bl}}{m}$$

$$S_m = \overline{S_{bl}} + kS_{bl}$$

C_m : Detection limit

S_m : Minimum distinguishable fluorescence intensity

$\overline{S_{bl}}$: Mean fluorescence intensity of blank

S_{bl} : Instrumental fluorescence intensity of blank

m : Slope of calibration graph

k : 3

과 spermidine의 방해가 크며 형광측정법에서는 2차 미분법으로 가능하다. 형광측정법에서 히스타민을 정량하는 방법으로는 특정 파장(λ_{em} 과 λ_{ex})을 동시에 고정시킨 후 형광세기를 측정하여 표준물질과 비교 분석한다. 그러나 방해물질의 파장이 근접하여 있을 경우에는 완전히 제거하기 어렵다. 따라서 히스타민의 $\lambda_{em(max)}$ 와 $\lambda_{ex(max)}$ 에서 2차 미분하여 얻은 형광세기를 측정하면 방해효과를 제거할 수 있다. 이 방법은 방해물질로부터 히스타민을 분리하는 과정을 생략할 수 있도록 한다.

4. 결론

현재 널리 이용되고 있는 고성능 크로마토그래피법은 형광측정법에 비해서 정확성을 지니고 있는 반면 Fig. 9의 크로마토그램에서처럼 최적 상태를 유지시켜야 하는 어려움이 있고 운영가격이 높은 단점이 있다. 반대로 형광측정법은 빠르고 단순하며, 따라서 시간 소비가 적고 상대적으로 높은 형광세기를 얻었다.

히스타민 분석에 관한 정량 및 정성분석방법은 오랜 기간 동안 연구되어 왔으나, 대부분 HPLC-Fluorimetry법이다. 따라서 형광분석법에 관한 연구의 필요성이 대두되었고, 최근에는 동시에 λ_{ex} 와 λ_{em} 을 고정시킨 후,

파장에 대하여 주사한 스펙트럼을 2차 미분하여 정량 분석하는 연구가 진행되기도 한다. 본 실험은 형광분석법을 연구하기 위한 첫 단계이며, 많은 노력이 필요하다고 생각된다. 실제 시료를 분석한 결과 두 방법간의 차이가 있는데, HPLC를 이용한 측정값보다 형광분석법의 측정값이 1.5~3.5배 높은 분석치가 나왔다. 이것은 유도체화 과정에서 OPA가 히스타민 이외의 다른 화합물과 반응하였음을 보여 준다. 따라서 이러한 부반응을 제거시키거나 같은 시료군에서 나오는 착물 효과 영향의 실험에 관하여 지속적인 연구가 필요하다. 형광측정법을 이용하여 실제 시료에 표준물질을 가하는 방법으로 측정한 결과 수득률은 100%~125%였다. 본 연구에서 형광분석법을 이용한 히스타민의 정량법을 실험하여 본 결과 $\lambda_{ex(max)}$ 는 350nm, $\lambda_{em(max)}$ 는 444nm에서 가장 높은 형광세기를 얻었으며, 직선성을 나타내는 농도 범위는 $5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL} \sim 4.0 \times 10^{-1} \mu\text{g}/\text{mL}$ 였다. 반응시키는 최적 온도는 $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 였으며, 반응 pH 의존성을 알아본 결과 12.88에서 상대적으로 높은 형광세기를 얻었다. 최적 반응시간은 5분이었으며 히스타민의 유도체화에 사용된 OPA의 농도는 크게 영향을 끼치지 않았다. 형광측정법의 경우 각 농도에 대한 R.S.D.(상대표준편차)는 3.74%~16.2%였다. 형광분석법을 이용한 시료분석 결과 맥주 0.16, 멸

치 52.4, 참치 8.6, 치즈 2.02, 닭고기 18.9, 햄 2.8, 그리고 갈치 8.4ppm의 결과를 얻었다.

참고문헌

1. R. Jarofke, *J. Chromatogr.*, **390**, 161(1987).
2. K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi and H. Nakazawa, *J. Chromatogr.*, **595**, 163(1992).
3. M. I. Grossman and S. J. Konturek, *Gastroenterology*, **66**, 517(1974).
4. A. H. Soll, *Gastroenterology*, **83**, 216(1982).
5. E. Kownatzki, G. Gruninger and N. Fuhr, *Pharmacology*, **34**, 17(1987).
6. D. S. Paul, M. L. Daniel, P. Martin and A. O. Stephen, *Analyst*, **115**, 1029(1990).
7. J. L. Deavalia, B. D. Sheinman and R. J. Davies, *J. Chromatogr.*, **343**, 407(1985).
8. D. Tsikas, R. Velasquez, C. Toledano and G. Brunner, *J. Chromatogr.* **614**, 37(1993).
9. R. Velasquez, D. Tsikas and G. Brunner, *Anal. Chem.*, **343**, 73(1992).
10. B. Washington, M. O. Smith, T. J. Robinson and R. F. Ochillo, *J. Liq. Chromatogr.*, **595**, 163(1992).
11. S. P. Ashmore, A. H. Thomson and H. Simpson, *J. Chromatogr.*, **496**, 435(1989).
12. P. T. Davies, C. W. Gehrke, L. W. Gehrke, T. D. Cunningham, K. C. Kuo, K. O. Gerhrdt, K. O., H. D. Johnson and C. H. Williams, *J. Chromatogr.*, **162**, 293(1979).
13. J. B. F. Lloyd, *Nature*, **231**, 64(1971).
14. T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.*, **50**, 396(1978).
15. M. C. Gutierrez, S. Rubio, A. Gomez-Hens and M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, **59**, 769(1987).
16. M. C. Gutierrez, S. Rubio, A. Gomez-Hens and M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta.*, **193**, 349(1987).
17. S. S. Jr. Simons and D. F. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7098(1976).