

Determination of aromatic amino acids by chemiluminometric assay with Luminol-H₂O₂-Cu(II) system

Kyung Min Kim, Young Ho Kim¹, ★ and Sang Hak Lee★

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

¹Research Institute of Advanced Energy Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received February 6, 2012; Revised April 18, 2012; Accepted April 18, 2012)

Luminol-H₂O₂-Cu(II) 시스템을 이용한 방향족 아미노산의 화학발광법적 정량

김경민 · 김영호¹, ★ · 이상학★

경북대학교 화학과, ¹경북대학교 차세대에너지기술연구소

(2012. 2. 6. 접수, 2012. 4. 18. 수정, 2012. 4. 18. 승인)

Abstract: A determination method of aromatic amino acids such as tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr), and phenylalanine (Phe) using luminol-H₂O₂-Cu(II) system has been presented. In the presence of an aromatic amino acid, the enhanced chemiluminescence (CL) intensity of luminol-H₂O₂-Cu(II) system was obtained by forming a complex between Cu(II) and the amino acid. Based on the above phenomenon, a sensitive and fast determination of three aromatic amino acids was performed using the CL method in batch-type detection system. To optimize determination conditions, the kinetic influence of an aromatic amino acid on the luminol-H₂O₂-Cu(II) system and the effects of H₂O₂ and Cu(II) concentration, pH, and buffers were investigated. Under the optimized conditions, the calibration curve was linear over the range from 1.0×10^{-6} to 2.0×10^{-5} M for Trp, 1.0×10^{-6} to 2.0×10^{-5} M for Try, and 2.0×10^{-6} to 2.0×10^{-5} M for Phe, respectively. In this range, reproducibility (RSD, n=4) of Trp, Try, and Phe were 3.21%, 2.64%, and 2.48%, respectively. The limit of detection ($3\sigma/s$) was calculated to be 6.8×10^{-7} M for Trp, 5.7×10^{-7} M for Try, and 9.6×10^{-7} M for Phe.

요 약: Luminol-H₂O₂-Cu(II) 시스템을 이용한 화학발광법을 사용하여 방향족 아미노산인 트립토판, 타이로신 및 페닐알라닌의 정량분석을 하였다. 세 종류의 방향족 아미노산(트립토판, 타이로신, 페닐알라닌)을 luminol-H₂O₂-Cu(II) 시스템에 첨가하였을 때 아미노산이 존재하지 않을 때보다 화학발광세기가 더욱 증가하는 현상을 관찰하였으며, 이러한 현상을 이용하여 각 방향족 아미노산을 정량분석 하였다. 방향족 아미노산의 최적분석 조건을 조사하기 위하여, Cu(II) 이온 촉매에 의한 루미놀과 과산화수소의 화학발광반응에 미치는 아미노산의 반응속도론적 영향을 조사하였고 과산화수소와 Cu(II) 이온의 농도 그리고 pH와 완충용액의 영향을 조사하였다. 루미놀 화학발광 시스템의 최적 분석조건 하에서 수용액 중의 방향족 아미노산 정량분석을 위해 얻은 검정곡선에서 직선성이 성립하는 농도 범위는 각각 트립토판은

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)53-950-5338, (0)53-950-7869 Fax : +82-(0)53-950-6330, (0)53-950-7879

E-mail : shlee@knu.ac.kr, youngkim@knu.ac.kr

$1.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ M, 타이로신은 $1.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ M 그리고 페닐알라닌은 $2.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ M 이었으며, 이 구간에서 각 아미노산에 대한 상대표준편차($n=4$)는 순차적으로 3.21%, 2.64% 그리고 2.48% 이었다. 그리고 각 아미노산의 검출한계($3\sigma/s$)는 트립토판 6.8×10^{-7} M, 타이로신 5.7×10^{-7} M, 페닐알라닌 9.6×10^{-7} M이었다.

Key words: luminol- H_2O_2 -Cu(II), chemiluminescence, aromatic amino acid

1. 서 론

아미노산은 모든 생물체의 조직을 구성하는 주요 성분이며 생체반응을 활성화하는 효소나 면역을 담당하는 항체를 구성하는 단백질의 기본 단위체이다. 또한 아미노산은 세로토닌과 멜라토닌 등 신경전달물질이나 티로신과 인돌아세트산(indole acetic acid) 등 호르몬을 합성하기 위한 유도체, 그리고 뉴클레오티드(nucleotide), 헴(heme) 및 엽록소 등의 질소를 포함하는 거대 생체분자의 합성에 필요한 전구체로 사용되는 등 생물체 내에서 매우 다양하고 중요한 역할을 담당하고 있다. 아미노산은 펩티드와 단백질의 구성 성분이기 때문에, 아미노산의 분석을 통하여 얻은 각 아미노산의 정성 및 정량적 결과는 펩티드와 단백질의 구조분석을 수행하는데 중요한 정보를 제공한다.¹⁻⁵ 따라서 극미량의 아미노산 시료를 고감도로 신속하게 분석하는 기술은 생물 및 생물기반 응용분야에서 매우 중요한 기술로 대두되어 왔다. 본 연구에서 아미노산 정량분석을 위해 사용한 화학발광법은 화학반응에 의해 발생하는 빛의 세기를 검출함으로써 분석을 수행하기 때문에, 광원과 단색화장치 없이 비교적 간단한 기기장치로 구성이 가능하며, 바탕잡음이 작기 때문에 높은 신호 대 잡음비(S/N비)를 갖는다는 장점이 있다.⁶⁻⁷ 따라서 화학발광법을 이용한 분석은 극미량의 물질을 분석할 수 있는 우수한 감도를 가지며, 비교적 넓은 범위의 직선성을 가진다. 그리하여 루미놀과 과산화수소의 산화반응에 기반한 화학발광법은 금속이온,⁸ 음이온,⁹ 당당류,¹⁰ 항산화제,¹¹ 그리고 신경전달물질¹² 등 다양한 물질을 고감도로 분석하기 위해 널리 사용되어 왔다. 또한 흐름주입법(flow injection analysis, FIA), 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC), 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis, CE) 등의 검출법으로 폭넓게 응용되고 있다.^{6-7,13-15} 일반적으로 화학발광을 이용한 정량법은 크게 2가지로 분류할 수 있다. 첫 번째, 분석물질이 화학발광반응에서 촉매작용을 하여 화학발광의 세기

를 증가시키거나 또는 퀸칭(quenching)작용을 하여 화학발광의 세기를 감소시키는 정도로 정량을 하는 방법과 두 번째는 간접(indirect) 화학발광법으로 불리는 것으로서 분석물질이 화학발광시약과 반응하기 전에 화학반응을 통하여 산화제를 생성하고, 이 산화제가 화학발광시약과 반응하여 방출되는 화학발광의 세기의 측정을 통하여 정량하는 방법이다.¹⁶ 그러나 아미노산은 화학발광반응에서 촉매나 산화제로 작용하지 않기 때문에, 상기와 같은 두 가지 방법을 통해 정량하는 것은 어렵다. 아미노산이 Cu(II) 이온의 리간드로 작용하여 금속이온 촉매 활성화에 영향을 미치는 현상을 이용하여 아미노산의 농도에 따른 화학발광세기의 변화량을 측정함으로써 아미노산을 정량분석하는 방법은 주로 FIA에 기반한 연구가 진행되어왔다.¹⁷⁻¹⁸ 본 연구에서는 간단한 기기장치로 신속하게 분석할 수 있는 SFA(stopped-flow analysis)를 이용하여 실험을 진행하였다. 이와 같이 본 연구에서는 luminol- H_2O_2 -Cu(II) 시스템을 이용하여 생물체의 20개 아미노산 중 방향족 결사슬을 가진 트립토판(tryptophan, Trp), 타이로신(tyrosine, Tyr), 그리고 페닐알라닌(phenylalanine, Phe)을 신속하고 고감도로 정량분석 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

본 실험에 사용한 방향족 아미노산 저장용액은 각각 트립토판, 타이로신 그리고 페닐알라닌(Sigma-Aldrich)을 1×10^{-3} M NaOH 용액에 녹여 5×10^{-3} M, 루미놀 용액은 0.0366 g 루미놀(Sigma-Aldrich)을 1×10^{-3} M NaOH 용액에 녹여 2×10^{-3} M, Cu(II) 이온 저장용액은 $CuSO_4$ (Duksan)를 탈이온수에 녹여 1×10^{-2} M, 과산화수소 저장용액은 과산화수소(Junsei)를 사용하여 1 M로 제조하였고, 과산화수소 저장용액은 1주일을 주기로 새로 만든 것을 사용하였다. 루미놀 표준용액의 저장용기는 알루미늄 호일로 감싸서 외부 빛의 노출을 차단하였으며, 과산화수소 저장용액과 동일하게 4 °C가

유지되는 냉장고에 보관하였다. pH 조절을 위하여 사용된 완충용액은 0.1 M의 붕산(H₃BO₃), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 인산이수소칼륨(KH₂PO₄), 그리고 트리스(Tris, (HOCH₂)₃CN₂) 50 mL 용액에 1 M NaOH 용액을 각각 일정 비율로 더하여 원하는 pH로 조절하였으며, pH 미터를 사용하여 최종적으로 pH를 확인하였다. Co(II)-EDTA 용액은 Co(NO₃)₂ · 6H₂O(Alfa)과 Na₂EDTA(Junsei), 그리고 10 mM Fe(CN)₆³⁻ 저장용액은 K₃Fe(CN)₆(Junsei)를 증류수에 녹여 준비하였다. AgNPs(Ag-nano particles) 용액은 1 mM AgNO₃(Junsei) 용액과 2 mM NaBH₄(Merck) 용액을 사용하여 합성하였다.¹⁹

2.2. 기구 및 장치

본 실험에 화학발광을 측정하기 위해 사용한 장비는 Model F-4500 Spectrofluorometer (Hitachi, 일본)이며, 광원을 꺼놓은 상태에서 실험을 수행하였다. 시료에서 방출되는 화학발광의 검출은 Model R928 (Hamamatsu, 일본)의 광전증배관(photomultiplier tube, PMT)을 사용하였다. 모든 실험에서 PMT에 걸리는 전압을 700 V로, 검출기 입구의 슬릿(emission slit)은 5.0 nm로 조절하였으며, 미디언 보정(median smooth)을 통해 바탕잡음을 보정하였다. UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, 일본)를 사용하여 UV-Vis 흡수스펙트럼을 측정하였고, 완충용액의 pH 조절은 pH 미터(Mettler-toledo MP 220, 미국)를 사용하였다. 화학발광과 흡광도 측정은 표준규격의 1 cm × 1 cm 석영재질의 셀을 사용하였다.

2.3. 분석과정

루미놀 화학발광 시스템을 이용한 아미노산 정량을 위해 다음과 같은 절차에 의해서 실험을 진행하였다. 마이크로 피펫을 사용하여 방향족 아미노산 표준용액, Cu(II) 이온, 완충용액, 루미놀 순으로 각각 0.4 mL를 셀에 주입하고, 과산화수소 0.4 mL를 주입한 후 화학발광의 세기를 측정하였다. 시약의 주입 순서에 따라 화학발광의 세기와 지속시간이 큰 차이를 나타내었다. 상기 세 가지 방향족 아미노산 용액을 루미놀 화학발광 시스템을 이용하여 340~550 nm 파장 범위에서 방출스펙트럼 측정(wavelength-scan) 결과 화학발광신호의 최고 지점이 430 nm에서 나타남을 확인하였고, 본 실험에서 측정된 모든 화학발광 세기는 430 nm에서의 빛 세기를 1초 간격으로 60초 동안 측정(time-scan)한 뒤 1~5 초간 신호세기의 평균값을 적용하였으며, 각 측정은 3회 이상 수행하여 평균값과 표준편차를 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 촉매의 종류에 따른 루미놀 시스템의 반응속도론적 특성

화학발광 시스템에서 하나의 고정된 파장에서의 화학발광 세기를 시간에 따라 측정하면 직접적으로 반응속도에 대한 정보를 얻을 수 있으며, 또한 반복측정과 분석신호와 바탕신호의 비교를 통해 최상의 감도와 재현성을 갖는 구간을 도출할 수 있다.²⁰ 루미놀 화학발광 시스템은 촉매의 종류에 따라 화학발광신호의 프로파일이 다양한 형태를 나타내며, 이는 분석 감도와 정밀도에 직접적인 영향을 미치기 때문에 트립토판의 존재 하에서 다양한 촉매에 대한 430 nm 파장에서 빛의 방출세기를 60초간 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fe(CN)₆³⁻와 Co(II)-EDTA 같은 착물 형태의 촉매는 상대적으로 자유금속이온으로 존재하는 Cu(II)나 나노입자가 콜로이드 형태로 존재하는 AgNPs보다 화학발광의 지속시간이 길고 안정적이었지만, 반응 용액 내 아미노산의 존재여부에 따른 화학발광 세기 변화가 거의 없었다. AgNPs 촉매의 경우 화학발광의 지속시간이 3~5초로 매우 짧아서 신호의 편차가 매우 크기 때문에 재현성이 낮아지는 단점이 있었다. 그리고 Cu(II) 촉매를 루미놀 화학발광 시스템에 적용하였을 때, 특히 화학발광 신호차가 큼을 확인하였는데 이는 음전하를 갖는 아미노산이 금속이온에 리간드로 작용하여 과산화수소가 ·OH(hydroxyl radical)과 ·O₂⁻(superoxide radical) 등의 라디칼 종을 생성할 때 영향을 주는 것으로 판단된다.²¹⁻²²

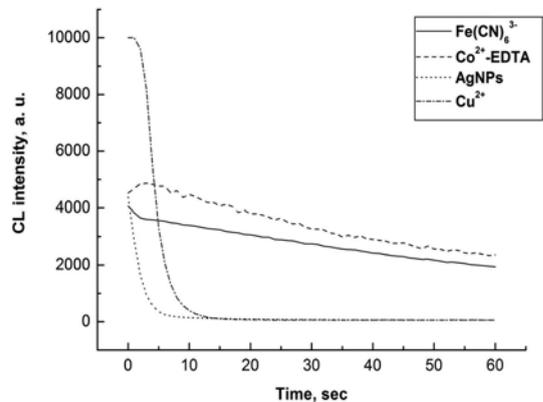


Fig. 1. Different catalytic effect of each catalyst on luminol-H₂O₂ CL reaction. Conditions: [luminol], 4×10^{-4} M; [H₂O₂], 2×10^{-4} M; [Trp], 2×10^{-5} M; [catalyst*], 2×10^{-5} M; pH, 12.8; λ_{em} , 430 nm.
*Except AgNPs

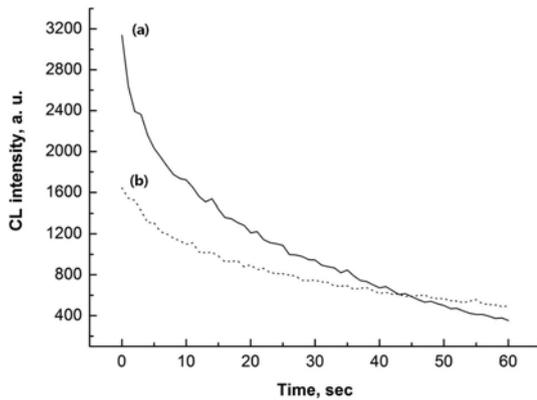


Fig. 2. CL intensity as a function of time (a) with Trp and (b) without Trp: Conditions: [luminol], 4×10^{-4} M; $[H_2O_2]$, 2×10^{-4} M; $[Cu^{2+}]$, 1×10^{-5} M; [Trp], 2×10^{-5} M; pH 12.8; λ_{em} , 430 nm.

3.2. Luminol- H_2O_2 -Cu(II) 시스템 내에서 방향족 아미노산의 영향

Cu(II) 이온 촉매를 사용한 루미놀 화학발광 시스템에 트립토판의 유무에 따른 화학발광 세기를 시간에 따라 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 트립토판이 존재할 때 초기 화학발광의 세기가 2배 가량 증가하였고, 40초 가량 경과 후 화학발광 세기가 역전되었으며, Cu(II)에 타이로신과 페닐알라닌을 첨가하였을 때, 같은 형태의 화학발광신호를 보였다. 화학발광 세기가 증가하는 원인은 Cu(II) 이온과 트립토판이 착물 형태의 결합을 형성하여 Cu(II)의 촉매활성을 증가시키기 때문이라고 판단된다. Fig. 3은 각각 트립토판, Cu(II) 이온 그리고 Cu(II) 이온과 트립토판 혼합물의 UV-Vis 스펙트럼을 나타내었다. Cu(II) 이온의 d-d 오비탈 전이에 의해서 700 nm에서 흡수과장대를 가지는데,²³⁻²⁴ 여기에 트립토판을 첨가 시 흡광도가 증가하면서 45 nm 가량 청색과장 이동하는 것을 확인하였다. 이 결과를 토대로 Cu(II) 이온과 트립토판이 배위

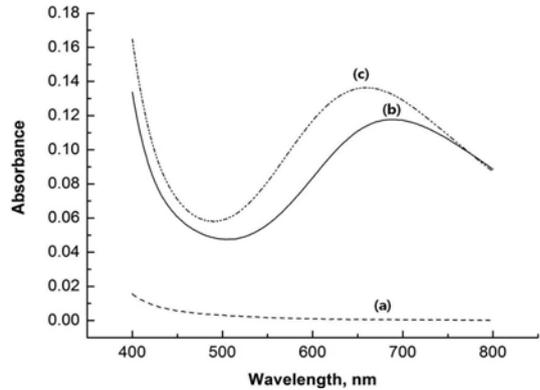


Fig. 3. UV-Vis spectra of (a) Trp, (b) Cu(II) and (c) Cu(II)-Trp complexes. Conditions: $[Cu^{2+}]$, 3.3×10^{-3} M; [Trp], 1.7×10^{-3} M.

결합 형태의 상호작용이 있음을 확인할 수 있다.

3.3. 시약 주입 순서에 따른 화학발광 세기의 영향

각각 루미놀, 과산화수소, 방향족 아미노산 용액, Cu(II) 이온, 그리고 완충용액을 어떠한 순서로 주입하느냐에 따라 화학발광의 세기와 지속시간에 영향을 주었다. 화학적 조성에 따른 영향을 조사하기 전 시약의 주입 순서를 최적화하고자 Table 1과 같이 동일한 농도의 용액을 3가지 다른 순서로 시약을 주입하였을 때, 각각의 화학발광 세기와 4번 반복 측정된 신호의 상대표준편차를 비교하였다. 각 용액을 '절차 1'(트립토판 표준용액, Cu(II) 이온, 완충용액, 루미놀, 그리고 과산화수소) 순으로 주입하였을 때, 바탕신호 대비 분석신호의 화학발광 세기 증가량이 157%로 '절차 2'의 102%와 '절차 3'의 134%보다 컸다.

3.4. pH 및 완충용액의 영향

루미놀 화학발광반응은 염기성 조건하에서 반응이 진행되며 작은 pH의 변화에도 화학발광 세기가 크게

Table 1. The effect of reagents injection procedure on CL intensity^a

| # | Mixing order | Blank | | Sample | |
|---|--|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| | | CL intensity | RSD ^b , % | CL intensity | RSD ^b , % |
| 1 | Analyte ^c -Cu(II)-buffer-luminol- H_2O_2 | 4471 | 3.65 | 7021 | 3.54 |
| 2 | Analyte ^c -Cu(II)-buffer- H_2O_2 -luminol | 2460 | 2.13 | 2515 | 2.56 |
| 3 | Buffer-Cu(II)-analyte ^c -luminol- H_2O_2 | 4238 | 4.23 | 5677 | 3.76 |

^aConditions: [luminol], 4×10^{-4} M; $[H_2O_2]$, 2×10^{-4} M; $[Cu^{2+}]$, 2×10^{-5} M; [Trp], 2×10^{-5} M; pH, 12.8.

^bRelative standard deviation of four measurements.

^cTryptophan used as an analyte.

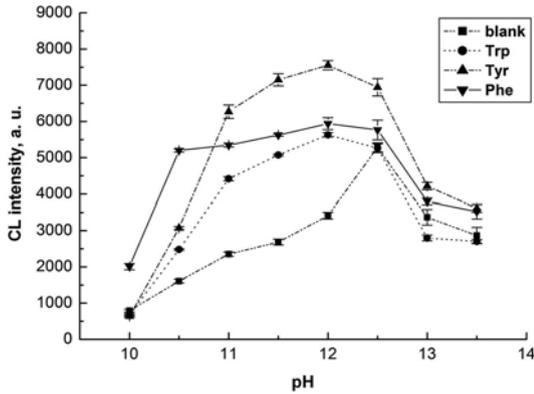


Fig. 4. Effect of pH on CL intensity of the system. Conditions: [luminol], 4×10^{-4} M; [H₂O₂], 2×10^{-4} M; [Cu²⁺], 1×10^{-5} M; [amino acids], 2×10^{-5} M.

영향을 받는다.²⁵ 또한 pH 변화는 아미노산의 전하에도 영향을 주어 Cu(II) 이온 촉매와의 상호작용에도 영향을 미칠 수 있다. 아미노산 존재 하에서 루미놀 화학발광 시스템의 pH에 따른 영향을 조사하기 위해 붕산염 완충용액을 사용하여 pH 10~13.5 범위 내에서 조절해 가면서 화학발광 세기를 각각 측정하였고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 특징적인 것은 아미노산을 첨가하였을 때 바탕신호 세기보다 신호 세기가 증가함을 확인할 수 있었으며 또한 아미노산을 첨가하지 않았을 때와 비교하여 pH 11~12.5 범위에서 화학발광 세기 변화의 폭이 상대적으로 작았다. 본 실험에서 방향족 아미노산의 정량분석의 감도를 극대화하기 위해서는 분석신호 세기와 바탕신호 세기의 차이가 크고, 3회 반복 측정된 상대표준편차가 3.27%로 가장 재현성이 높은 pH 11을 최적 pH 조건으로 선정하였다.

화학발광에서 완충용액은 pH 조절 역할 뿐만 아니라 화학발광 반응에 간접적인 영향을 주기 때문에 완충용액의 종류에 따라서 분석감도와 정밀도가 다른 결과를 보였다. 각각 pH 11의 탄산염, 인산염, 트리스, 그리고 붕산염 완충용액을 사용하였을 때의 화학발광 세기를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 상기 각 완충용액과 비교를 위해 측정된 1×10^{-3} M NaOH (pH 11)를 주입하였으나, 루미놀 시약 자체가 pH 11.7이므로 실제 혼합되어 반응할 때의 pH는 11 이상이었다. 탄산염 완충용액의 화학발광 세기가 가장 큰 값을 가졌으나, 본 연구에서는 아미노산의 유무에 따른 화학발광 세기의 비율이 클수록 분석감도가 증가하기 때문에 바탕신호에 대한 분석신호의 비를 비교하였고, 루미놀 화학발광 시스템에 트립토판

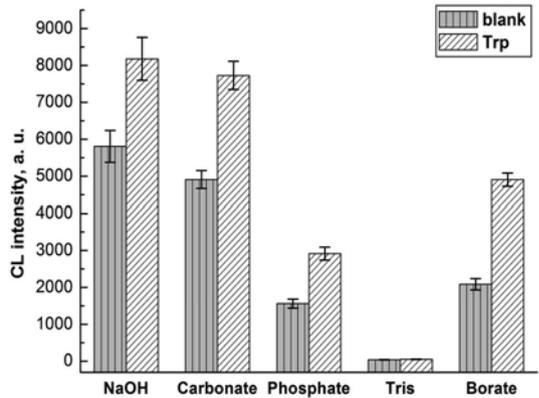


Fig. 5. Effect of buffer solution on CL intensity of the system. Conditions: [luminol], 4×10^{-4} M; [H₂O₂], 2×10^{-4} M; [Cu²⁺], 1×10^{-5} M; [Trp], 2×10^{-5} M; pH 11.

을 주입하였을 때 탄산염은 1.57배, 인산염은 1.86배, 그리고 붕산염은 2.35배 각각 신호의 세기가 증가하였다. 정밀도(RSD) 역시 붕산염이 3.65%로 다른 완충용액(4~5%)보다 높았다.

3.5. H₂O₂와 Cu(II) 이온 농도의 영향

산화제 농도가 화학발광 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 과산화수소의 농도를 2×10^{-6} ~ 2×10^{-3} M 범위로 조절해 가면서 화학발광 세기를 측정하였고 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 과산화수소의 농도가 2×10^{-6} 에서 2×10^{-4} M로 증가할 때까지 분석신호와 바탕신호의 차가 증가하다가 농도가 더욱 증가함에 따라 다시 감소하는 경향을 보였다. 과산화수소 농도에 대한 화학발광 세기 측정 시 과산화수소의 농도가

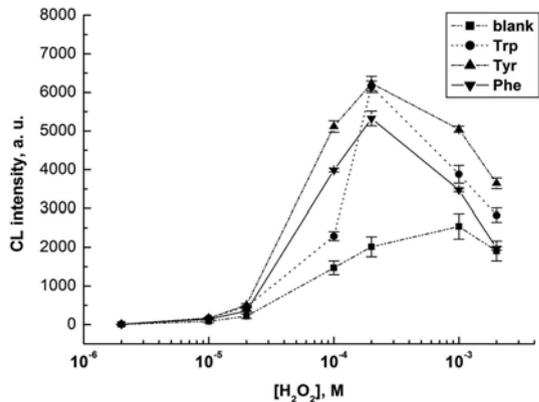


Fig. 6. Effect of H₂O₂ concentration on CL intensity of the system. Conditions: [luminol], 4×10^{-4} M; [Cu²⁺], 1×10^{-5} M; [amino acids], 2×10^{-5} M; pH 11.

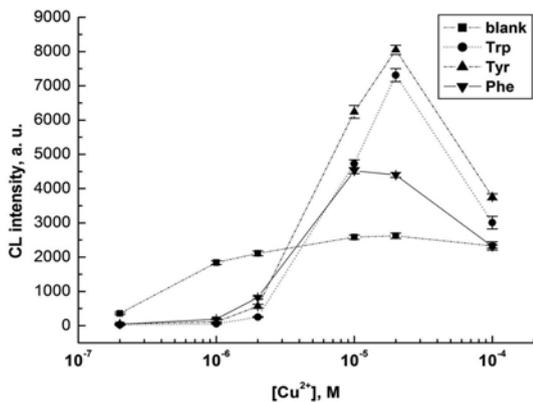


Fig. 7. Effect of Cu(II) concentration on CL intensity of the system. Conditions: [luminol], 4×10^{-4} M; $[H_2O_2]$, 2×10^{-4} M; [amino acids], 2×10^{-5} M; pH 11.

증가할수록 화학발광 반응의 속도가 증가하기 때문에, 초기 화학발광 세기는 과산화수소의 농도가 증가할수록 계속 증가하는 경향성을 보였으나, 2×10^{-4} M를 초과한 농도에서는 방출 지속시간이 급격히 감소하여 1-5초간 화학발광 세기의 평균값은 감소하는 경향을 나타내었다.

Fig. 7은 루미놀 화학발광 시스템에서 촉매작용을 하는 Cu(II) 농도에 따른 화학발광 세기를 측정 한 결과이다. 각 아미노산의 농도를 2×10^{-5} M로 고정하고 Cu(II) 농도를 $2 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ M 범위에서 변화시키면서 화학발광 세기를 측정하였다. Cu(II)과 아미노산의 몰비가 1:10보다 작을 때는 분석신호의 세기가 바탕신호보다 현저히 감소하였으며, 1:2 이상에서는 분석신호의 세기가 바탕신호보다 증가하는 현상을 나타내었다. Cu(II) 이온이 아미노산보다 5배 이상 과량으로 존재할 때는 화학발광 반응에 아미노산에 의한 영향이 급격히 감소하여 바탕신호와 분석신호의 차이가

거의 없었다.

3.6. 방향족 아미노산 농도에 따른 화학발광 세기 측정

루미놀 화학발광 시스템에 아미노산을 첨가하였을 때 화학발광 세기가 증가하는 현상을 이용하여 앞 실험에서 최적화된 조건으로 각 세가지 방향족 아미노산의 농도를 $1 \times 10^{-8} \sim 2 \times 10^{-4}$ M 범위로 조절해 가면서 화학발광 세기를 4회 측정하였고, 검정범위 내에서 정밀도(RSD), 검출한계($3\sigma/s$), 검정곡선식, 그리고 직선성을 나타내는 상관계수(R)를 도출하였으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 본 연구의 화학발광법을 이용한 방향족 아미노산 정량분석법은 루미놀 화학발광 시스템에서 촉매로 작용하는 Cu(II) 이온과 분석물질인 방향족 아미노산의 상호작용에 의한 화학발광 세기의 증가를 측정하였기 때문에, 직선성 구간이 Cu(II) 이온 농도에 의존하였으며, 상대적으로 좁은 범위의 직선성을 보였다.

4. 결 론

Luminol- H_2O_2 -Cu(II) 시스템에 아미노산을 주입하였을 때 아미노산이 Cu(II)와 착물을 형성하는 과정에 의해 화학발광 세기가 증가하는 현상을 이용하여 방향족 아미노산인 트립토판, 타이로신, 그리고 페닐알라닌의 정량분석을 하였다. 본 연구의 화학발광법을 이용한 방향족 아미노산 정량법은 광원이 필요 없기 때문에 측정 장치의 소형화에 용이하며, 배치 형태의 SFA를 이용하여 비교적 간단한 기기장치를 사용하여 신속하게 분석할 수 있다. 이와 같은 장점을 활용하여 연동펌프에 의한 시료 주입 자동화와 생체 시료 및 음식물의 고 효율 분석에 본 연구의 결과를 활용할 수 있다.

Table 2. The results of quantitative analysis of three aromatic amino acids^a

| | Trp | Tyr | Phe |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Dynamic range, μ M | 1~20 | 1~20 | 2~20 |
| Detection limit, μ M | 0.68 | 0.57 | 0.96 |
| Precision (RSD ^b), % | 3.31 | 2.64 | 2.48 |
| Correlation coefficient (R) | 0.988 | 0.980 | 0.963 |
| Calibration equation | $y = 105.7x^c + 3120$ | $y = 228.4x + 2794$ | $y = 178.8x + 2790$ |

^aConditions: [luminol], 4×10^{-4} M; $[H_2O_2]$, 2×10^{-4} M; $[Cu^{2+}]$, 1×10^{-5} M; pH 11.

^bRelative standard deviation of four measurements.

^cUnit: μ M.

감사의 글

본 연구는 한국표준과학연구원(KRISS)을 통하여 한국기초기술연구회(KRCF)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. T. McKee and J. R. McKee, 'Biochemistry: An introduction', 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, 1999.
2. B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, 'Essential cell biology', 2nd Ed., Garland Science, New York, 2003.
3. S. Broer and M. Palacin, *Biochem. J.*, **436**, 193-211 (2011).
4. W. Leuchtenberger, K. Huthmacher and K. Drauz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 1-8 (2005).
5. K. A. Massey, C. H. Blakeslee and H. S. Pitkow, *Amino acids*, **14**, 271-300 (1998).
6. Z. Zhang, S. Zhang and X. Zhang, *Anal. Chim. Acta.*, **541**, 37-47 (2005).
7. A. M. Powe, S. Das, M. Lowry, B. El-Zahab, S. O. Fakayode, M. L. Geng, G. A. Baker, L. Wang, M. E. McCarroll, G. Patonay, M. Li, M. Aljarrah, S. Neal and I. M. Warner, *Anal. Chem.*, **82**, 4865-4894 (2010).
8. M. R. Sangi, D. Jayatissa, J. P. Kim and K. A. Hunter, *Talanta*, **62**, 924-930 (2004).
9. J. Lv, Z. Zhang, J. Li and L. Luo, *Forensic Sci. Int.*, **148**, 15-19 (2005).
10. D. T. Bostick and D. M. Hercules, *Anal. Chem.*, **47**(3), 447-452 (1975).
11. I. Parejo, C. Codina, C. Petrakis and P. Kefalas, *J. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 507-512 (2000).
12. J. S. Lee and H. B. Lim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**(12), 2315-2318 (2007).
13. P. Fletcher, K. N. Andrew, A. C. Calokerinos, S. Forbes and P. J. Worsfold, *Luminescence*, **16**, 1-23 (2001).
14. C. A. Marquette and L. J. Blum, *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 546-554 (2006).
15. L. G. Gracia, A. M. G. Campana, J. F. H. Perez and F. J. Lara, *Anal. Chim. Acta.*, **640**, 7-28 (2009).
16. I. P. A. Morais, I. V. Toth and A. O. S. S. Rangel, *Talanta*, **66**(2), 341-347 (2004).
17. K. Tsukagoshi, M. Sumiyama, R. Nakajima, M. Nakayama and M. Maeda, *Anal. Sci.*, **14**, 409-412 (1998).
18. Y. M. Liu and Z. L. Liu, *Chinese Chem. Lett.*, **21**, 856-859 (2010).
19. S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz and L. Mulfinger, *J. Chem. Educ.*, **84**(2), 322-325 (2007).
20. H. A. Mottola and D. P. Bendito, *Anal. Chem.*, **66**(12), 131-162 (1994).
21. S. Y. Liao and C. W. Whang, *J. Chromatogr. A.*, **736**, 247-254 (1996).
22. Z. Li, K. Li and S. Tong, *Analyt. Lett.*, **32**(5), 901-913 (1999).
23. S. Kanhathaisong, S. Rattanaphani, V. Pattanaphani and T. Manyum, *Suranaree J. Sci. Technol.*, **18**(2), 159-165 (2011).
24. O. Altun and S. Bilcen, *Spectrochim. Acta. A.*, **75**, 789-793 (2010).
25. D. Badocco, P. Pastore, G. Favaro and C. Macca, *Talanta*, **72**, 249-255 (2007).