

= 단신 =

형광광도법에 의한 Histidine의 정량에 관한 연구

차기원* · 황화자

인하대학교 화학과

(2004. 2. 10 접수, 2004. 3. 11 승인)

Determination of Histidine by Spectrofluorometry

Ki Won Cha* and Huazi Huang

Department of chemistry, Inha university, Incheon 402-751, Korea

(Received Feb. 10, 2004, Accepted Marc. 11, 2004)

요 약 : 형광광도법을 이용하여 histidine 아미노산을 간단하고미량까지 정확하게 정량 하는 방법을 연구 하였다. Eu^{3+} - TTA- histidine 착물의 방출 봉우리는 235 nm에서 들뜰 때 470 nm에서 나타나며 그의 형광 세기는 histidine을 1×10^{-7} - 4×10^{-6} M 까지 가함에 따라 직선적으로 증가하였다 .이를 이용하여 histidine을 정량 하는 방법을 연구하였다. 검출 한계는 5×10^{-7} M이었으며 이때의 상대표준편차는 3.5%이었다. 이 방법을 합성 시료에서 histidine을 정량 하는데 이용하였다.

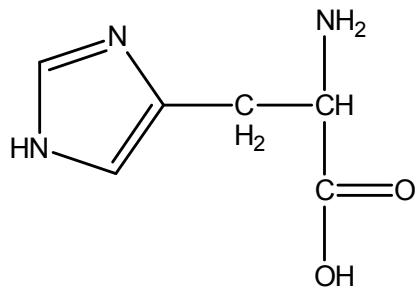
Abstract : A simple and sensitive determination method of histidine has been investigated using the spectrofluorometry. An emission peak of Eu^{3+} - TTA- histidine complex occurs at 470 nm in aqueous solution with excitation at 235 nm and the fluorescence intensity increased linearly with addition of histidine in the range of 1×10^{-7} - 4×10^{-6} M. The detection limits was 5×10^{-7} M with 3.5% RSD. The present method was applied to determine histidine content in the synthetic sample.

Key words : Histidine, Amino acids, Eu^{3+} , TTA(thenoyltrifluoroacetone), EDTA(ethylenediaminetetracetic acid)

1. 서 론

Histidine 은 필수 아미노산의 일종으로 염기성이고 그 구조는 Scheme 1과 같다. Histidine 은 인간 피부에 존재하여 피부암의 원인이 되는 것으로 알려졌다.¹지금 까지 histidine을 분석하는 방법을 보면 아미노산을 다른 유도체로 변형한 후 HPLC로 분리하여 분석하거나^{2,3,4} 음이온 교환수지에 시료를 넣고 NaOH와 sodium acetate 용리액으로 용리한 후 IPMD(integrated pulsed amperometric detection) 법^{5,6,7}으로 검출하여 주로 분석하였다. 그러나

이들 방법은 한가지 아미노산을 신속 정확하게 분석하는 방법으로는 적합하지 않고 많은 시간과 노력이 필요하다.



Scheme 1. Structure of histidine.

★ Corresponding author

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

E-mail: kwcha@inha.ac.kr

필자는 Eu^{3+} - TTA(thenoyltrifluoroacetone) 착물의 형광 세기가 glycine의 농도에 따라 증가하는 현상을 이용하여 glycine을 형광법으로 정량하는 방법을 발표한다. ⁸ 희토류원소는 빛 흡수에서 진동자세기가 낮아 형광이 약하나 TTA 같이 베타다케톤의 리간드와 착물을 이루면 에너지 이동에 의해 형광이 증가된다. ^{9,10} 여기에 다른 리간드가 들어가면 3성분 착물 형성에 의해 착물의 형광 세기가 변한다. ¹⁰ Eu^{3+} - TTA(thenoyltrifluoroacetone) 착물의 형광의 세기가 histidine의 농도에 직선적으로 증가하는 조건을 연구하여 이를 간단하고 선택적으로 미량까지 정확하게 분석하는 연구를 하였다.

2. 실험

2.1 시약과 장치: 형광광도계는 Shimatzu RF-5301PC를 사용하였고 셀은 1 cm 형광 측정용 석영 셀을 사용하였다. 들뜨기와 방출의 단색화 장치의 슬릿너비는 10 nm 이었다. 광원은 150 W Xenon 등을 사용하였다. pH는 Mettler Toledo Mp 220 pH 미터를 사용하였다.

각종 아미노산과 Eu_2O_3 와 TTA 시약은 Aldrich 제로서 99.95%의 순도를 사용하였고 그 외 시약은 분석용 시약이며 물은 탈이온수를 사용하였다. Eu^{3+} 의 표준용액은 Eu_2O_3 을 염산에 녹이고 휘산 후 증류수로 묽혀 준비하고 TTA 용액은 소량의 에틸 알코올로 녹인 후 증류수로 묽혀 준비하였다. 각종 아미노산은 증류수에 녹여 준비하였다. 용액의 pH는 아세트산완충용액과 인산완충용액을 사용하였다.

2.2 실험과정: 50 mL 용량 플라스크에 1.0×10^{-4} M Eu^{3+} 의 표준용액 1 mL, 1.0×10^{-4} M의 TTA용액 3 mL, pH 8.5인 완충용액 5 mL 그리고 각종 농도의 아미노산 5 mL를 넣고 증류수로 표선까지 묽힌다. 이 용액 일부를 셀에 넣고 바탕용액(아미노산만 제외한 용액)을 대조용액으로 하여 형광의 세기를 25에서 측정한다.

3. 결과 및 고찰

3.1 들뜨기 및 방출 스펙트럼

Eu^{3+} - TTA, Eu^{3+} - TTA - histidine 및 Eu^{3+} -EDTA, Eu^{3+} -EDTA - histidine의 스펙트럼은 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. Fig. 1의 a와 a'는 Eu^{3+} - TTA와 Eu^{3+} - TTA-histidine의 들뜨기 스펙트럼이며 b와 b'는 그들의 방출 스펙트럼이고,

Fig. 2의 a와 a'는 Eu^{3+} - EDTA와 Eu^{3+} - EDTA - histidine의 들뜨기 스펙트럼이며 b와 b'는 그들의 방출 스펙트럼이다.

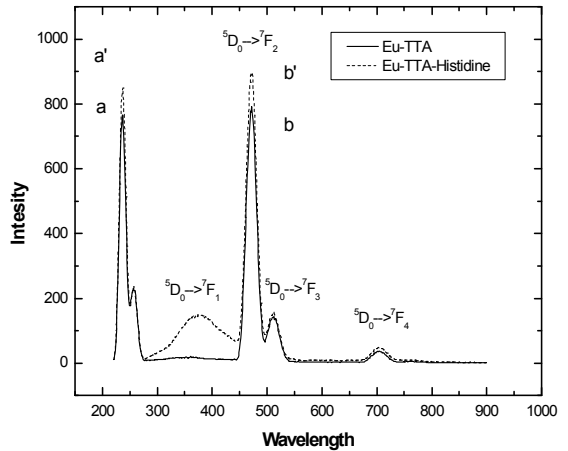


Fig. 1. Spectra of Eu^{3+} - TTA and Eu^{3+} - TTA Histidine [Eu^{3+}]= 1×10^{-5} M, [TTA]= 3×10^{-5} M.

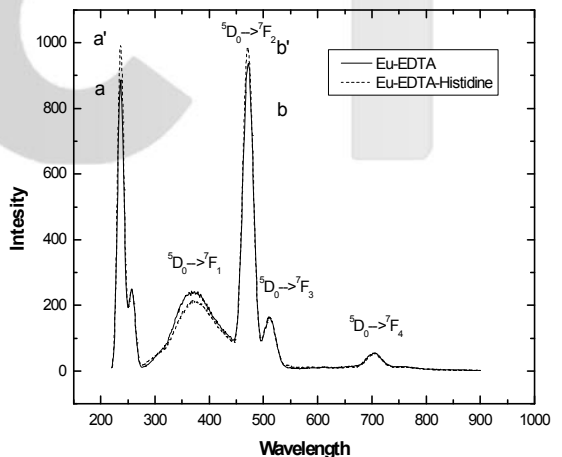


Fig. 2. Spectra of Eu^{3+} -EDTA and Eu^{3+} - EDTA Histidine [Eu^{3+}]= 1×10^{-5} M, [EDTA]= 3×10^{-5} M.

Fig. 1과 2를 보면 리간드를 TTA 대신 EDTA로 바꾸었을 때 스펙트럼의 변화는 생기지 않음을 알 수 있다. 최대 들뜨기와 방출파장은 각각 235 nm와 470 nm이다. 5개의 방출봉우리는 Eu^{3+} 의 $5\text{D}_0 - 7\text{F}_{1,2,3,4}$ 전이에 각각 해당된다. 470 nm의 파장에서 Eu^{3+} - TTA - histidine의 봉우리

세기는 Eu^{3+} -TTA의 봉우리 세기보다 큼을 알 수 있다. 이는 이성분 착물 보다는 3성분 착물의 흡광도와 방출세기가 증가 됨을 알 수 있다. 그러나 Eu^{3+} -EDTA-histidine의 470 nm의 봉우리 세기는 Eu^{3+} -EDTA 봉우리 세기와 차이가 거의 없다. Eu^{3+} -TTA-histidine 착물의 형광세기는 histidine의 농도 증가에 따라 증가하였다. 따라서 이를 이용하여 histidine을 정량하는 최적 조건을 연구하고자 한다. Eu^{3+} -EDTA-histidine 착물에서는 histidine의 농도 증가에 따라 형광의 세기가 증가하지 않았다.

3.2 pH 와 리간드 농도 선택

470 nm의 방출세기를 이용하여 histidine을 분석하기 위해 이 봉우리의 세기가 용액의 pH에 따라 어떻게 변하는가를 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3을 보면 Eu^{3+} -TTA의 형광의 세기는 7.5 이상에서 가장 크게 나타나고 Eu^{3+} -TTA-histidine의 경우에는 pH 8.5에서 방출세기가 가장 크다. 따라서 용액의 pH는 8.5로 조절하기로 하였다. Eu^{3+} 와 TTA의 결합비는 1:3으로¹¹ 알려졌기 때문에 TTA의 리간드의 농도는 Eu^{3+} 농도의 3배로 고정하였다.

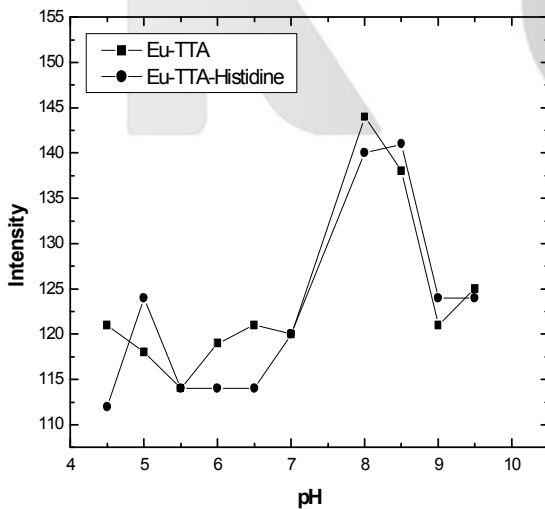


Fig. 3. Effect of pH on fluorescence intensity of Eu^{3+} -TTA and Eu^{3+} -TTA-Histidine complex [Eu^{3+}] = 1×10^{-5} M, [TTA] = 3×10^{-5} M, [Histidine] = 5×10^{-5} M.

3.3 검정선

Eu^{3+} -TTA-histidine (Eu^{3+} -EDTA-histidine)의 방출

봉우리 높이가 histidine의 농도에 따라 어떻게 변화하는가를 본 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4를 보면 histidine의 농도가 4×10^{-6} M 까지 증가함에 따라 형광의 세기가 직선적으로 증가한다. 다른 아미노산(cystine, glutamic acid, phenylalanine)에서는 이들 농도증가에 따라 방출세기의 변화가 없다. Fig. 5에서는 Eu^{3+} -EDTA-Amino acid의 착물에서 아미노산의 농도변화에 따라 470 nm에서 방출세기의 변화를 측정하였다. 여기서는 cysteine의 농도 증가에 따라 방출 세기가 감소하고, glutamic acid의 경우는 농도 증가에 따라 직선적으로 방출 세기가 증가하며 phenylalanine과 histidine에서는 변화가 없다. 이런 현상은 Eu^{3+} -TTA-histidine 착물에서 histidine의 농도에 따라 방출세기가 증가하는 현상과 다르다. 리간드를 TTA에서 베타디케톤의 일종인 EDTA로 바꾸면 삼성분 착물의 방출 세기는 서로 다름을 알 수 있다. Fig. 5의 현상을 이용하면 glutamic acid나 cysteine을 정량할 수 있음을 알 수 있다.

3.4 방해 이온

470 nm에서 Eu^{3+} -TTA-histidine 착물의 방출 세기가 histidine의 농도에 따라 직선적으로 증가하는 현상을 이용하여 이를 정량할 때 다른 아미노산이나 여기에 공존 가능한 물질의 방해정도를 실험한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1의 결과는 histidine의 농도가 1×10^{-6} M에서의 허용 한계이다.

Table 1. Tolerance limits of foreign ions

Ions	Tolerance(M)
Citrate	1×10^{-4}
Oxalate	1×10^{-5}
Palmitate	5×10^{-5}
Cysteine	1×10^{-5}
glutamic acid	1×10^{-5}
Phenylalanine	1×10^{-5}
Glycine	5×10^{-5}
SO_4^{2-}	2×10^{-4}

허용오차농도는 histidine의 방출세기가 기타 이온을 가했을 때 5% 이상 벗어나는 농도로 측정하였다.

3.5 본 분석법의 응용

본 분석방법의 검증을 위해 두 가지 합성시료를 만들고 이를 본 분석법을 이용하여 표준물 첨가법으로 분석한 결과는 Table 2와 같다. Table 2의 결과를 보면 오차가 약 10 %이고 RSD(n = 5)은 3.5 %이다. 오차가 큰 것은 공존이온이 많고 그들의 농도가 histidine의 농도에 비해 크기 때문인 것 같다.

Table 2. Analytical data of histidine in synthetic sample

Concentration	Found(M)
Sample 1: 1×10^{-5} M of glutamic acid, phenylalanine, cystine, citric acid in 1.00×10^{-6} M histidine	1.21×10^{-6} M
Sample 2: 1×10^{-5} M of glutamic acid, phenylalanine, cystine, citric acid in 5.00×10^{-6} M histidine	5.61×10^{-6} M

955(1970).

10. G.A. Crosby, R.E. Whan, R.M. Alire, *J. Chem. Phys.* **34**, 744(1961).

11. F. Halverson, J.S. Bimen, J.R. Leta, *J. Chem. Phys.* **41**, 157(1964).

감사의 말씀

이 논문은 인하대학교 2003년도 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

참고 문헌

1. K. Hermann, D. Abeck, *J. chromatography B*, **749**, 41-47(2000).
2. N. Tateda, K. Matsuhisa, K. Hasebe, T. Miura, *Analytical science*, **17**, 775(2002).
3. N. Tateda, K. Matsuhisa, K. Hasebe, N. Kitajima, *J. chromatography B*, **718**, 235(1998).
4. K. Kurima, T. Sakano, *Analytical science*, **15**, 489 (1999).
5. V.P. Hanko, J.S. Rohrer, *Analytical Biochemistry*, **324**, 29(2004).
6. H. Yu, Y. S. Ding, S. F. Mou, P. Jandik, *J. Chromatography*, **A. 966**, 89(2002).
7. Y. Ding, H. Yu, S. Mou, *J. Chromatography*, **A. 982**, 237(2002).
8. K. W. Cha, C. I. Park, K. W. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 633(2002).
9. S. Sato, M. Wada, *Bull. Japan Chem. Soc.* **43**,