

화학발광법에 의한 비타민 P₁의 정량

진승오 · 이상학★

경북대학교 자연과학대학 화학과
(2007. 10. 29. 접수. 2008. 1. 2. 승인)

Determination of vitamin P₁ by chemiluminescence method

Seung Oh Jin and Sang Hak Lee★

Department of Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
(Received October 29, 2007; Accepted January 2, 2008)

요 약: 본 연구에서는 lucigenin과 H₂O₂에 의한 화학발광을 이용하여 vitamin P₁을 정량하는 방법에 대하여 연구하였다. 분석의 최적 조건을 구하기 위해서 화학발광에 영향을 미치는 H₂O₂의 농도, pH 그리고 lucigenin의 농도를 조사하였다. 이러한 분석 최적조건의 검정곡선에서 직선성이 성립하는 범위는 7.5×10⁻⁶에서 5.0×10⁻⁴ mol/L이었고, 검정곡선에서 직선성이 성립하는 농도구간에서 구한 검출한계는 5.7×10⁻⁷ mol/L이었다. 최적 vitamin P₁의 농도인 7.5×10⁻⁵ mol/L에서의 상대표준편차는 0.75 % (n=10), 상관계수(S/N=3)는 0.9984이었다.

Abstract: A chemiluminescence method has been developed to determine vitamin P₁ in aqueous solution which is based on the enhancement of the intensity of lucigenin using lucigenin-H₂O₂ as chemiluminogenic system. The effects of experimental parameters such as concentrations of lucigenin, pH and concentrations of H₂O₂ were studied. The present method allows the determination of vitamin P₁ over the range 7.5×10⁻⁶~5.0×10⁻⁴ mol/L. The detection limit was 5.7×10⁻⁷ mol/L. The relative standard deviation was 0.75 % for 10 determinations of 7.5×10⁻⁵ mol/L vitamin P₁. The correlation coefficient of the working curve was 0.9984 (S/N=3).

Key words: vitamin P₁, chemiluminescence, lucigenin

1. 서 론

Vitamin P₁(Rutin)은 플라보놀 배당체의 하나로서 케르세틴의 3번 탄소에 루티노오스가 결합한 배당체이다.^{1,2} Vitamin P₁은 항균작용, 항바이러스작용, 혈관 계조절작용, 간장작용, 항암작용 등의 각종 질병의 치

료에 식이요법으로 사용되고 있다.³ Vitamin P₁의 정량을 위한 분석법은 여러 문헌에 소개되어 있지만 화학발광법을 이용한 방법은 아직 보고된 바가 없다.^{4,5} 화학발광(chemiluminescence)이란 화학반응에 수반하여 생기는 전자기적인 발광으로 화학루미네선스라고도 한다.⁶ 빛의 형태로 에너지를 발산하는 화학반응을

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)53-950-5448 Fax : +82-(0)53-950-6330

E-mail : shlee@knu.ac.kr

말한다.^{7,8} 화학발광 시약에는 많은 화합물이 있지만, lucigenin, luminol, luciferin, aryl oxalate, acridinium esters, peroxyoxalates, dioxetanes, aesculin, cerium, 1,10-phenanthroline, Galloycyanin, Diphenoyl peroxide, coumarin 및 tris (2,2'-bipyridine)ruthenium(II) (RUBY)₃²⁺ 등이 분석화학에 널리 이용된다.⁹ 정량 할 때의 최적 pH는 경우에 따라 다르지만 일반적으로 9에서 13 이고, 검출한계는 정량하려는 물질의 종류에 따라서 수 $\mu\text{mol/L}$ 에서 pmol/L 로 다양하다. 1670년 G.브란트가 노란인(黃燐)이 공기 중 어두운 곳에서 미약하게 청록색으로 발광하는 것을 보고 화학발광을 밝혀내었다. 그 이후 NaCl 수용액에 HCl를 통과시키거나, 기체 NH₃에 HCl를 반응시킬 때, pyrogallol과 HCOH의 혼합 알칼리 용액을 H₂O₂로 산화시키는 경우 등 많은 화학발광이 발견되었다.^{10,11} 또 유기화합물 중, luminol의 강알칼리성 용액을 H₂O₂, H₂SO₅, H₂S₂O₈, K₃[Fe(CN)₆] 등으로 산화시키면 낮에도 보일 정도로 강한 청자색 발광이 나타난다. 이 중 H₂O₂의 경우는 약하지만 오래 계속되는 발광이 나타나며, 특히 헤민, 카탈라아제 등 Cu 나 Fe을 함유하는 착화합물(錯化合物)에 의하여 촉진된다.^{12,13} 이들의 발광은 생체 내 산화·환원이나 생물 발광과의 관계를 암시하고 있는 것으로 여겨지고 있어, 이에 많은 연구가 진행 중이다.¹⁴⁻¹⁶ 최근에는 미셀(micell)을 이용하여 분석대상 물질의 용해도를 증가시키고 감도를 높이는 연구가 진행되고 있다.¹⁷⁻¹⁹ 화학발광은 측정방법이 간단하고 반응이 빠르며 감도가 좋아서 응용 분야에서는 'light stick', 야광뉘시찌 등이 있으며, 분석화학분야에서 산화, 환원반응의 지시약,²⁰ 박테리아 농도측정, 용수 중 미량금속의 선택적 분석²¹ 등에 이용되고 있다. 본 연구에서는 회분법을 이용하여 화학발광법으로 vitamin P₁을 정량하였다.^{22,23} 이 방법은 알칼리성 용액에서 lucigenin에 H₂O₂가 산화제로 작용하였을 때 화학발광의 세기가 증가하는 것을 기초로 하였다.²⁴ 분석의 최적조건을 구하기 위해서 화학발광에 영향을 미치는 H₂O₂의 농도, pH 그리고 lucigenin의 농도를 조사하였다. 이러한 분석 최적조건에서 화학발광법을 이용하여 vitamin P₁을 정량할 때의 검정곡선을 얻었으며 검출한계를 구하였다.

2. 실험

2.1. 시약

화학발광 시약으로는 1.0×10^{-2} mol/L N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate(lucigenin, guaranteed

reagent, Aldrich, USA) 저장용액을 제조한 후, 적절히 묽혀서 사용하였다. pH가 화학발광의 세기에 미치는 영향을 조사하기 위해 1.0 mol/L KOH 완충용액을 사용하였다. 산화제로는 H₂O₂(guaranteed reagent, Junsei Chem. Co., Ltd., Japan)를 사용하였고, 표준물질로 vitamin P₁(rutin)(Aldrich chem. Co. Ltd., USA)을 사용하였다. 본 실험에서 사용한 다른 시약들은 특급시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 모든 용액의 제조는 Millipore사 (Bedford, MA, USA)의 Milli-Q water system으로 얻은 탈이온수를 사용하였으며, 표준용액은 실험 직전에 적당한 농도로 묽혀서 사용하였다.

2.2. 기기

Lucigenin에 광원을 이용하여 측정 한 형광측정은 spectrofluorometer (Spex, Model FL111, USA)를 이용하였으며 Fig. 1에 나타내었다. 이 기기는 광원으로 450 W Xe Lamp, 두 개의 단색화장장치, 기준검출기 photomultiplier tube (PMT, Hamamatsu社. Model R928) 구성되어 있으며 모든 장치는 SPEX DM 3000에 의해 제어되었다.

시료의 형광을 측정하기 위한 형광 셀로는 사면이 투명한 1×1 cm 석영 셀을 사용하였고, increment와 integration time은 각각 1 nm와 1 sec로 하였으며 데이터 처리를 위하여 Origin version 6.0 professional soft를 사용하였다. Increment와 integration time은 각각 1 nm와 1 sec로 하였고, 화학발광 스펙트럼을 얻기 위해 acquisition mode를 signal로 선택하였으며 분석하는 동안 외부 광원은 모두 차단시켰다.

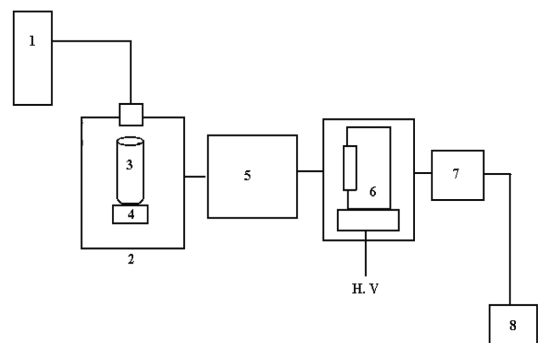


Fig. 1. Schematic diagram of chemiluminescence measurements; 1. Peristaltic pump, 2. Light-tight housing, 3. Reaction cell, 4. Magnetic stirring bar, 5. Emission monochromator, 6. Photomultiplier tube, 7. Amplifier, 8. Spectroscopy computer.

2.3. 분석방법

본 실험에서 사용한 용액은 다음과 같이 제조하였다. 100 mL 용량 플라스크에 1.0×10^{-2} mol/L lucigenin 저장용액을 만들어 탈이온수로 묽혀서 사용하였으며, 산화제인 H_2O_2 와 pH를 11.4로 맞추기 위하여 사용한 KOH의 농도는 각각 0.5 mol/L, 1.0 mol/L로 하였다. Vitamin P₁의 검정곡선을 얻기 위하여 0.5 mol/L KOH, 농도대별 vitamin P₁ 표준용액 및 7.5×10^{-4} mol/L lucigenin의 혼합용액에 0.5 mol/L의 H_2O_2 를 도입하였으며 시험의 재현성을 위하여 이와 같은 과정을 각 농도별로 3회 실시하였다. 석영 셀에서 발생하는 화학발광은 473.0 nm로 고정된 단색화 장치를 통과시킨 후 측정하였다. 검출한계를 구할 때의 신호 대 잡음비는 3으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. H_2O_2 의 영향

Vitamin P₁의 정량에서 주입되는 산화제의 농도에 따른 화학발광 세기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우선 산화제 종류에 따른 화학발광 세기를 조사해본 결과(Fig. 2) 산화제로 쓰인 H_2O_2 의 화학발광 세기가 현저하였음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 H_2O_2 의 농도가 화학발광 세기 미치는 영향을 알아보기 위하여 1.0×10^{-3} mol/L의 lucigenin, 1.0×10^{-3} mol/L 농도의 vitamin P₁, pH 11.4 및 방출파장을 473 nm로 고정하고, H_2O_2 의 농도를 변화시키면서 화학발광 세기를 측정하였고 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 H_2O_2 는 0.5 mol/L의 농도에서

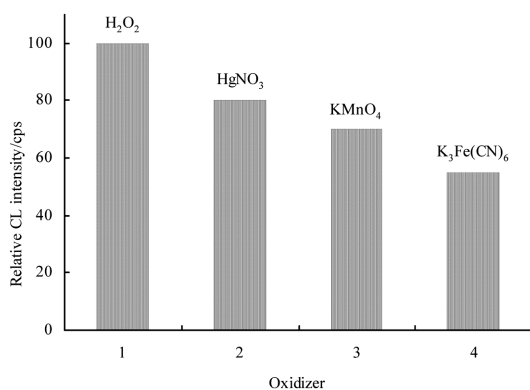


Fig. 2. Effect of oxidants on CL intensity. Conditions: vitamin P₁, 1.0×10^{-3} mol/L; lucigenin, 7.5×10^{-4} mol/L; pH, 11.4; λ_{em} =473 nm.

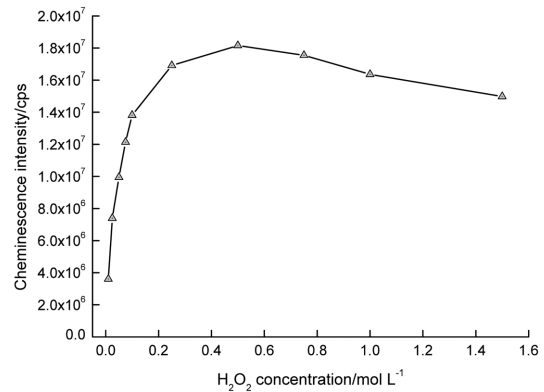


Fig. 3. Effect of concentration of H_2O_2 on the chemiluminescence intensity of lucigenin- H_2O_2 in the presence of vitamin P₁. Conditions: lucigenin, 7.5×10^{-4} mol/L; vitamin P₁, 1.0×10^{-3} mol/L; pH, 11.4; λ_{em} =473 nm.

가장 큰 화학발광세기를 나타내었다. 따라서 이후 실험에서는 H_2O_2 의 농도를 0.5 mol/L로 고정하여 실험하였다.

3.2. pH의 영향

화학발광시약인 lucigenin과 산화제인 H_2O_2 의 반응에서 화학발광세기에 미치는 pH의 영향을 알아보았다. Lucigenin은 실험조건에 따라 pH 9.0~13.0 범위 내에서 산화반응이 일어나므로 pH 9.0~13.0 범위에서 화학발광의 세기를 넓은 pH 변화 값으로 측정하였고, 화학발광의 세기가 가장 큰 부분에서는 좁은 pH 변화 값으로 측정하였다. Lucigenin과 H_2O_2 의 농도를 각각 1.0×10^{-3} mol/L과 0.5 mol/L을 사용하였고, KOH 용액을 0.01 mol/L에서 2.0 mol/L의 농도별로 1 mL씩 첨

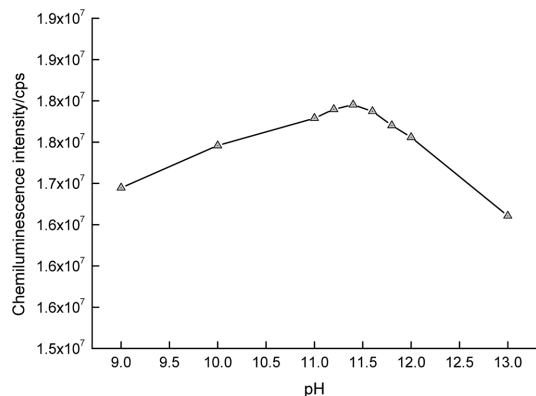


Fig. 4. Effect of pH on the chemiluminescence intensity. Conditions: lucigenin, 7.5×10^{-4} mol/L; vitamin P₁, 1.0×10^{-3} mol/L; H_2O_2 , 0.5 mol/L; λ_{em} =473 nm.

가하여 pH를 10.0~13.0으로 변화시켜 가면서 방출파장 473 nm에서의 화학발광세기를 측정하였고, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 pH가 증가함에 따라 화학발광세기가 증가하다가 pH 11.4에서 가장 큰 세기를 나타내었고, 그 이후에는 세기가 감소하였다. 실험결과 화학발광시약의 pH 범위가 10.0~13.0 범위에서 화학발광세기가 가장 크다고 보고 된 것과 잘 일치함을 알 수 있었다. 따라서 이후의 실험에서 pH를 11.4로 고정하여 실험하였다.

3.3. Lucigenin 농도의 영향

Vitamin P₁ 정량에서 주입되는 lucigenin의 농도에 따른 화학발광 세기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1×10⁻³ mol/L 농도의 vitamin P₁, 0.5 mol/L 농도의 H₂O₂, pH 11.4 및 방출파장을 473 nm로 고정하고, lucigenin의 농도를 변화시키면서 화학발광세기를 측정하였고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 lucigenin은 7.5×10⁻⁴ mol/L 농도에서 가장 큰 세기를 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서도 lucigenin의 농도를 7.5×10⁻⁴ mol/L로 고정하여 실험하였다.

3.4. Kinetic curves

회분식 시료주입 방식에서 time base scanning을 통한 lucigenin-H₂O₂ 구조에 vitamin P₁을 포함한 것[Fig. 6(I)]과 그렇지 않은 것[Fig. 6(II)]의 화학발광세기를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 vitamin P₁을 첨가한 것의 화학발광세기가 증가한 것을 알 수 있다. 이 결과를 통해 vitamin P₁은 lucigenin

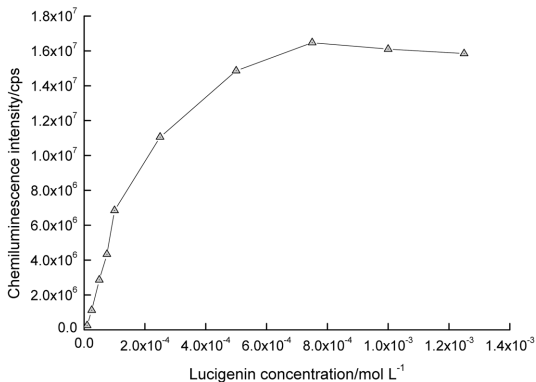


Fig. 5. Effect of concentration of lucigenin on the chemiluminescence intensity of lucigenin-H₂O₂ in the presence of vitamin P₁. Conditions: pH, 11.4; vitamin P₁, 1.0×10⁻³ mol/L; H₂O₂, 0.5 mol/L; λ_{em}=473 nm.

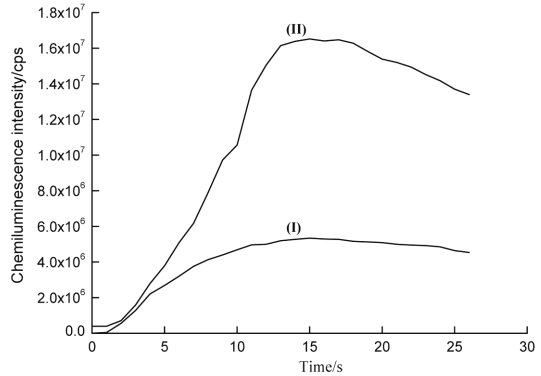


Fig. 6. CL kinetic curves of system; (I): lucigenin-H₂O₂ in the absence of vitamin P₁; and system (II): lucigenin-H₂O₂ in the presence of vitamin P₁. Conditions: lucigenin, 7.5×10⁻⁴ mol/L; vitamin P₁, 1.0×10⁻³ mol/L; H₂O₂, 0.5 mol/L; pH, 11.4; λ_{em}=473 nm.

의 화학발광에 관여를 하는 것으로 보인다. 화학발광의 세기는 scanning 15초 후에 가장 큰 값을 나타내었으며 그 후 신호는 서서히 줄어들었다.

3.5. Vitamin P₁의 검정곡선

앞에서 조사한 최적조건 하에서 각 농도별 vitamin P₁의 화학발광세기를 측정하여 vitamin P₁을 정량하기 위한 검정곡선을 얻었고 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Vitamin P₁의 정량을 위한 최적조건은 H₂O₂ 0.5 mol/L, lucigenin 7.5×10⁻⁴ mol/L이며, 이 혼합용액은 KOH 완충용액에 의해 pH를 11.4로 조절하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 직선성이 성립되는 범위는 7.5×10⁻⁶에서 5.0×10⁻⁴ mol/L이었으며, 이 농도 범위

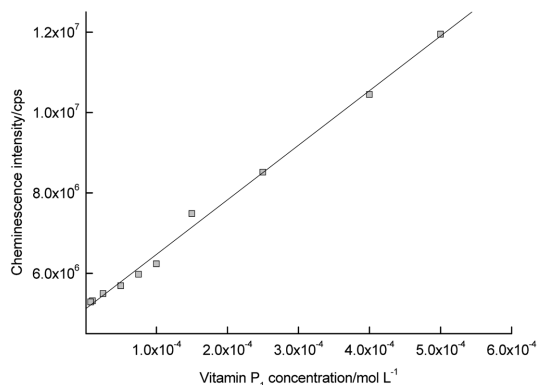


Fig. 7. Calibration curve for vitamin P₁. Conditions: lucigenin, 7.5×10⁻⁴ mol/L; pH, 11.4; H₂O₂, 0.5 mol/L; λ_{em}=473 nm.

서 상관계수는 0.9984이었다. 검정곡선에서 직선성이 성립하는 농도구간에서 구한 검출한계는 5.7×10^{-7} mol/L 이었다.

4. 결 론

본 연구에서는 lucigenin과 H_2O_2 에 의한 화학발광을 이용하여 vitamin P_1 을 정량하는 방법에 대하여 연구하였다. Vitamin P_1 의 정량에 최적 H_2O_2 의 농도, pH 및 lucigenin의 농도는 각각 0.5 mol/L, 11.4 및 7.5×10^{-4} mol/L이었다. 이러한 최적 조건 하에서 얻은 vitamin P_1 의 검정곡선에서 직선성이 성립하는 범위는 7.5×10^{-6} 에서 5.0×10^{-4} mol/L이었으며 검정곡선에서 직선성이 성립하는 농도구간에서 구한 검출한계는 5.7×10^{-7} mol/L이었다. 최적 vitamin P_1 의 농도인 7.5×10^{-5} mol/L에서의 상대표준편차는 0.75 % (n=10)이었으며 상관계수(S/N=3)는 0.9984이었다. 본 연구에서 이용한 화학발광법은 vitamin P_1 을 정량하는데 응용할 수 있다고 생각된다.

참고문헌

1. B. Abad-Garcia, L. A. Berrueta, D. M. Lopez-Marquez, I. Crespo-Ferrer and B. Gallo, F. Vicente, *J. Chromatogr. A*, **1154**, 87-96(2007).
2. J-Y. Lin and C-Y. Tang, *Food Chem.*, **101**, 140-147(2007).
3. R. Guo and P. Wei, W. Liu, *J. Phar. and Biomed. Anal.*, **43**, 1580-1586(2007).
4. Y. Zu, C. Li, Y. Fu and C. Zhao, *J. Phar. and Biomed. Anal.*, **41**, 714-719(2006).
5. M. A. Rodriguez-Delgado, M. L. Perez, R. Corbella, G. Gonzalez and F. J. Garcia Montelongo, *J. Chromatogr. A*, **871**, 427-438(2000).
6. G. Mellbin and B. E. F. Smith, *J. Chromatogr.*, **312**, 203(1984).
7. P. W. Meijboom and G. A. Jongenotter, *J. Am. Oil Client Soc.*, **56**, 33(1979).
8. K. S. Subramanian, *Anal. Chem.*, **60**, 11(1998).
9. ANA M. Garcia-Campana and Willy R. G. Baeyens(eds.), "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", 2001, Marcel Dekker, Inc., New York.
10. L. Wang, P. Yang, Y. Li, H. Chen, M. Li and F. Luo, *Talanta*, **72**, 1066-1072(2007).
11. M. Kaczmarek, K. Staninski and M. Elbanowski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **154**, 273-277(2003).
12. Y. Yu, F. Yan and X. Wang, *J. Luminescence*, **40-41**, 842-843(1988).
13. M. Nakazono, A. Uesaki and K. Zaitso, *Talanta*, **70**, 128-132(2006).
14. K. Tsukagoshi, Y. Obata and R. Nakajima, *J. Chromatogr. A*, **971**, 255-260(2002).
15. J. Van Bragt, L. M. Rohrbaugh and S. H. Wender, *Phytochem.*, **4**(6), 963-965(1965).
16. N. Zoulis and C. Efstathiou, *Analytica Chimica Acta*, **320**, 255-261(1996).
17. T. Hasebe and T. Kawashima. *Anal. Sci.*, **12**, 773 (1996).
18. T. Hasebe, J. Nagao and T. Kawashima, *Anal. Sci.*, **13**, 93(1997).
19. T. Fujiwara, Y. Oramoto and T. Kumamaru, *Anal. Sci.*, **14**, 203(1998).
20. M. A. K. Shlezinger, *Fluorimetric Analysis*, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, (1965).
21. M. Yamada, T. Komatsu, S. Kakhara and S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta.*, **155**, 259(1983).
22. Z. Legnerova, D. Satinsky and P. Solich, *Analytica Chimica Acta*, **497**, 165-174(2003).
23. L. Diesing, J. S. Ahmed and E. Schein, *Veterinary Parasitology*, **20**(1-3), 229-235(1986).
24. K. Glue, W. Petsch. *Angew Chem.*, **48**, 57(1935).