

다변량 분석법을 이용한 Tryptophan과 Tyrosine의 형광분광법적 정량

李相學* · 朴襄垠 · 孫凡睦
경북대학교 자연과학대학 화학과
(2002. 2. 14 접수)

Simultaneous Determination of Tryptophan and Tyrosine by Spectrofluorimetry Using Multivariate Calibration Method

Sang Hak Lee*, Ju Eun Park, and Bum Mok Son

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

(Received February 14, 2002)

요 약. 형광분광법에 의하여 주성분 회귀분석(principal component regression, PCR)과 부분 최소자승법(partial least squares, PLS)을 이용하여 아미노산(tryptophan and tyrosine)을 동시에 정량하는 방법에 대하여 연구하였다. 아미노산 혼합물의 형광스펙트럼은 들뜸파장을 257 nm로 고정하여 측정하였다. 두 가지 아미노산이 서로 다른 농도로 혼합되어 있는 32개의 시료용액을 280 nm- 500 nm 범위에서 스펙트럼들을 얻었고, 이를 이용하여 PCR과 PLS 회귀 모델을 얻었다. 두 가지 아미노산이 서로 다른 농도로 포함된 6 개의 외부검정용 시료들의 스펙트럼들을 이용해서 회귀모델의 적합성을 검증하기 위하여 외부검정용 시료의 농도를 계산하였다. 계산된 농도를 이용하여 relative standard error of prediction(RSEP_c)를 얻었고, 같은 방법으로 overall relative standard error of prediction(RSEP_o)도 구하였다.

주제어: 다변량 분석법, Tryptophan, Tyrosine

ABSTRACT. A spectrofluorimetric method for the simultaneous determination of amino acids (tryptophan and tyrosine) based on the application of multivariate calibration method such as principal component regression and partial least squares (PLS) to luminescence measurements has been studied. Emission spectra of synthetic mixtures of two amino acids were obtained at excitation wavelength of 257 nm. The calibration model in PCR and PLS was obtained from the spectral data in the range of 280-500 nm for each standard of a calibration set of 32 standards, each containing different amounts of two amino acids. The relative standard error of prediction (RSEP_c) was obtained to assess the model goodness in quantifying each analyte in a validation set. The overall relative standard error of prediction (RSEP_o) for the mixture obtained from the results of a validation set, formed by 6 independent mixtures was also used to validate the present method.

Keywords: Multivariate Calibration, Tryptophan, Tyrosine

서 론

Tryptophan(Trp)과 tyrosine(Tyr) 등은 아미노산은 영양학과 약학에서 중요한 역할을 한다.¹ Trp는 인간과 초식동물에 있어서 필수 아미노산이며, 발육과 체중 유지

에 중요한 작용을 하고, 식욕증진, 조혈, 빛의 분비촉진에도 유효한 작용을 한다. 식이요법을 하는 사람에게 Trp이 부족하게 되면 우울증을 보이기도 한다. Tyr과 Trp의 충분한 섭취는 정상적인 단백질 합성, 환자의 성장과 발달을 돕는다.

이러한 두 가지 아미노산을 정량하려는 다양한 분석적 접근들을 예로 들면 전기화학적 분석법(electrochemical analysis),^{2,5} 원자흡수 분광법(atomic absorption spectrophotometry, AAS),⁶ 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC),^{7,9} 및 형광분광법 등을 들 수 있다. 이들 중에서 형광분광법은 감도가 좋아서 높은 농도 범위까지 적용될 수 있고, 직진감응 범위가 넓다.¹⁰⁻¹³ 그러나 매질 중에 분석대상 물질과 가까운 파장에서 형광을 내는 물질이 존재하게 되면 스펙트럼의 중첩으로 인하여 분석대상 물질만의 형광을 측정하기 어렵다.^{14,16} 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 최근에는 컴퓨터와 통계적 다변량 분석법이 빠른 속도로 발전하고 있다.¹⁷⁻¹⁹ 기존의 방법은 최대 방출파장의 방출세기를 측정하여 검정곡선을 얻어서 농도를 계산하는 반면에 다변량 분석법은 다양한 파장에서 얻은 스펙트럼을 이용하여 분석대상 물질의 농도를 계산하기 위한 이용되거나, 측정된 스펙트럼을 효율적으로 해석하기 위한 방법으로 이용된다. 따라서, 다변량 분석법은 여러 가지 방해물 물질들이나 분석대상 물질들에 의한 방출 봉우리의 중첩이 일어나도 전혀거나 분리과정 없이 분석대상 물질들을 선택적으로 분석할 수 있다. 이러한 다변량 분석법은 자외선-가시선 분광법(uv-visible spectrophotometry), 적외선 분광광도법(infrared spectroscopy), 라만 분광법(raman spectroscopy), 전자스핀공명 분광법(electron spin resonance spectrometry), 핵자기공명 분광법(nuclear magnetic resonance spectroscopy) 등^{20,21}에 응용하고 있다.

본 연구에서는 Trp와 Tyr을 동시정량하기 위하여 형광분광법으로 스펙트럼들을 얻은 후에 주성분 회귀분석(principal component regression, PCR)과 부분 최소자승법(partial least squares, PLS)을 이용하여 스펙트럼 데이터를 처리하는 검정곡선을 얻는 방법에 대하여 연구하였다. 아미노산 혼합물의 형광스펙트럼은 들뜸파장을 257 nm로 고정하고, 방출파장 280 nm-500 nm 범위에서 얻었다. 얻은 회귀모델의 적합성을 검증하기 위하여 두 가지 아미노산 혼합용액이 서로 다른 농도로 포함된 6개의 검정용 시료들의 스펙트럼들을 이용하여 농도를 계산하였고, 계산된 농도를 이용하여 relative standard error of prediction(RSEP)를 계산하였고, 같은 방법으로 overall relative standard error of prediction (RSEP_o)도 계산하였다.

실 험

시약. Trp와 Tyr은 Sigma(St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였다. 실험에 사용한 각각의 Trp와 Tyr 저장용액은 일정한 Trp와 Tyr를 탈이온수에 녹여 농도가 1.0×10^{-3} M이 되도록 제조하였으며, pH 9.5 완충 용액으로 사용된 boric acid-borate용액은 H_3BO_3 6.18 g과 NaOH 2.8 g을 증류수 1 l에 녹여서 제조하였다.²² 증류수는 Millipore사(Bedford, MA, USA)의 Milli-Q water system을 이용해 얻은 18.2 M Ω 이상의 저항을 가진 탈이온수를 사용하였으며, 모든 용액은 실험 직전에 제조하여 사용하였다.

기기. 본 실험에서 사용한 형광분광계는 SPEX사(Edison, NJ, USA)에서 제작된 Model FL111 Spectrofluorimeter를 사용하였다. 광원으로는 450 W Xe Lamp, 기준검출기(reference detector)로는 silicon diode 검출기, 시료의 형광을 측정하는 방출 검출기(emission detector)로는 Hamamatsu사(Bridgewater, NJ, USA) Model R928 PMT를 사용하였다. 측정파장을 1 nm씩 증가시키면서 1 초 동안 적분하여 데이터를 얻었고, 보정된 스펙트럼을 얻기 위해 acquisition mode를 scan 선택하였다. 시료의 pH를 측정하기 위해서 Mettler사(Schwerzenbach, Switzerland) Model MA235 pH/Ion analyzer를 사용하였다.

실험방법. Trp, Tyr의 혼합용액의 방출 스펙트럼을 측정하기 위하여 사용한 용액은 다음과 같이 만들었다. 각각 1.0×10^{-3} M- 1.0×10^{-6} M의 Trp와 Tyr 용액을 제조한 후에 10 mL의 용량플라스크에 제조한 각각의 Trp와 Tyr 용액을 일정한 양 넣고 혼합한 후에 pH 9.5 boric acid - borate 완충용액으로 표시까지 채워서 표준용액과 외부검정용 시료용액을 제조하였다. 이 용액을 1 cm \times 1 cm 석영 셀에 담고, 들뜸 파장을 257 nm로 하여 방출 파장을 바꾸어 가면서 형광스펙트럼을 얻었다. 이러한 방법으로 얻은 형광스펙트럼을 GRAMS32(Galactic Industries Co., NH, USA)에서 읽어들이 처리하였다.

스펙트럼 데이터의 처리. 주성분회귀분석(principal component regression, PCR)^{20,21}은 스펙트럼 자료들에 대하여 주성분분석을 행하여 주성분 점수를 구하고, 농도와 구한 주성분 점수 사이를 회귀분석하여 회귀모델을 구하는 방법이다. 스펙트럼 행렬과 분석대상 물질의 농도 행렬과의 주성분회귀분석을 실행하기 위하여 스펙트럼 행렬을 이용하여 주성분분석(식 (1))을 행하였고,

계산된 주성분 점수(principal component score)들과 농도행렬 사이의 회귀방정식을 구하는 과정(식 (2))을 실행하였다.

$$X = TP' \cdot E_X \quad (1)$$

$$Y = TB \cdot E_Y \quad (2)$$

X 는 스펙트럼 행렬, Y 는 주성분 점수 행렬, P' 주성분 행렬, E_X 는 스펙트럼잔차(residual spectra) 행렬이다. T 는 농도행렬, B 는 회귀계수 행렬(regression coefficient)이며 $E_Y(n \times m)$ 는 농도잔차 행렬이다.

부분 최소자승법(partial least squares regression, PLS)^{20,21}은 농도와 스펙트럼 자료들에 대하여 동시에 주성분분석을 행하여 농도의 주성분 점수와 스펙트럼 자료의 주성분 점수 사이를 회귀분석하여 회귀모델을 구하는 방법이다. 스펙트럼 행렬과 분석대상 물질의 농도행렬과의 부분 최소자승 회귀모델을 구하기 위하여 스펙트럼 행렬과 농도 행렬을 동시에 주성분분석(식 (3), 식 (4))하였고, 구한 두 주성분 점수들 사이의 내부관계(inner relation, B)를 구하여 회귀모델을 구하는 과정(식 (5))을 실행하였다.

$$X = TP' \cdot E_X \quad (3)$$

$$Y = UQ' \cdot E_Y \quad (4)$$

$$Y = TBQ' + E \quad (5)$$

X 는 스펙트럼 행렬, T 는 스펙트럼 행렬의 주성분 점수 행렬, P' 주성분 행렬, E_X 는 스펙트럼잔차 행렬, Y 는 농도 행렬, U 는 농도 행렬의 주성분 점수 행렬, Q' 는 농도 행렬의 주성분 점수 행렬, E 는 농도잔차 행렬이고, E 는 회귀모델의 잔차이다.

최적 회귀모델을 구하기 위하여 교차검정(cross validation)과정을 수행하여 회귀모델을 구하는 데에 이용할 최적 주성분의 수를 결정하였다. 예측된 농도와 실제 농도를 이용하여 주성분점수의 수에 따른 prediction residual error sum of squares(PRESS, 식 (6))를 구하였다.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (c_{act} - c_{pred})^2 \quad (6)$$

n 은 새로이 구성된 시료의 수, k 는 분석대상 물질의 수, C_{pred} 는 회귀모델을 이용하여 구한 분석대상 물질의 농도이며 C_{act} 은 실제 농도이다. 구한 PRESS는 F -검정

을 통하여 PRESS의 변화가 없다고 할 수 있는 주성분의 수를 회귀모델을 구하기 위한 최적의 주성분 수로 하였다.

이상점(outlier)을 검출하기 위하여 스펙트럼잔차를 이용하여 Mahalanobis 거리(d)를 계산하여 군집분석을 행하거나, F -ratio를 바로 이용하거나 F -ratio를 이용하여 F -검정을 실행하여 이상점을 검출하였다.

$$d = (R - \bar{R})' \sum^{-1} (R - \bar{R})' \quad (7)$$

$$F \text{ ratio} = \frac{(n-1)r_i}{\sum_{j=1}^n r_j} \quad (8)$$

d 는 Mahalanobis 거리, R 은 잔차행렬, \bar{R} 는 평균잔차행렬, Σ^{-1} 는 분산-공분산 행렬이다. n 은 시료의 수, r_i 와 r_j 는 각 시료의 농도잔차 이다. Mahalanobis 거리를 이용할 때는 Mahalanobis 거리의 평균을 중심으로 표준편차의 3배에 해당하는 거리보다 큰 거리에 있는 시료를 이상점으로 하였고, F -ratio를 바로 이용하는 경우는 F -ratio가 1보다 큰 점을 이상점으로 하였고, F -ratio를 이용하여 F -검정을 행할 때는 유의수준 α 를 0.01로 하여 이상점을 검출하였다.

회귀모델의 적합성을 검증하기 위하여 외부검정(external validation) 시료 중의 분석대상 물질에 대한 relative standard error of prediction(RSEP)를 구하였고, 분석대상 물질 전체의 relative standard error of prediction(RSEP_m)을 구하였다. RSEP_a와 RSEP_m를 구하는 식을 다음에 나타내었다.

$$RSEP_a = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{q=1}^k (C_{found} - C_{add})^2}{\sum_{q=1}^k C_{add}^2}} \quad (9)$$

$$RSEP_m = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{q=1}^k \sum_{r=1}^n (C_{found} - C_{add})^2}{\sum_{q=1}^k \sum_{r=1}^n C_{add}^2}} \quad (10)$$

k 는 외부검정 시료의 수, n 은 분석대상 물질의 수, C_{found} 는 회귀모델을 이용하여 구한 외부검정세트의 농도이며 C_{add} 은 외부검정 시료의 실제농도이다.

결과 및 고찰

형광스펙트럼. Trp과 Tyr의 방출 스펙트럼을 측정하기 위하여 각각 농도가 다른 Trp과 Tyr 혼합용액을 이용하여 들뜸 파장 257 nm에 고정시키고 얻은 방출 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 300 nm에서는 Tyr의 방출 봉우리가 나타났고, 350 nm에서는 Trp의 방출 봉우리가 나타났다. 또한 두 아미노산의 형광스펙트럼들의 중첩이 일어나기 때문에 기존의 정량방법으로 두 아미노산의 동시정량이 어렵다는 것을 알았다.

PCR 모델. 회귀모델에 사용할 주성분 점수들을 구하기 위하여 주성분 분석을 하였고, 주성분에 따른 고유값(eigenvalue)을 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 볼 수 있듯이 첫 번째 주성분(PC1)이 가

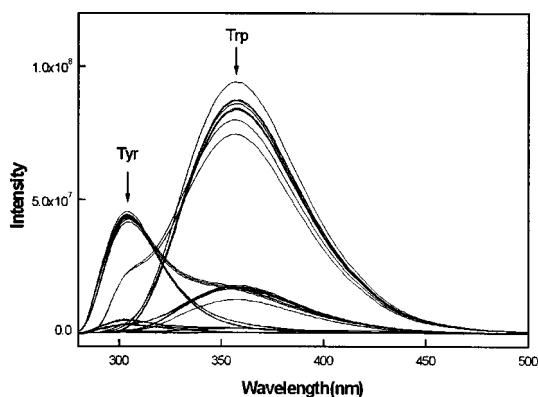


Fig. 1. Fluorescence spectra of thirty eight mixtures containing different amounts of tryptophan, tyrosine in aqueous media; excitation wavelength, 257 nm; pH, 9.5.

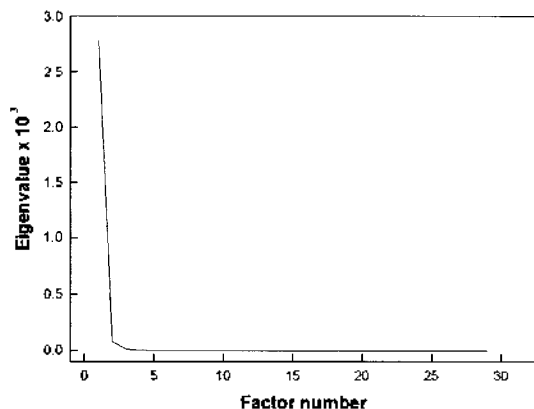


Fig. 2. Plots of eigenvalue versus the PC number.

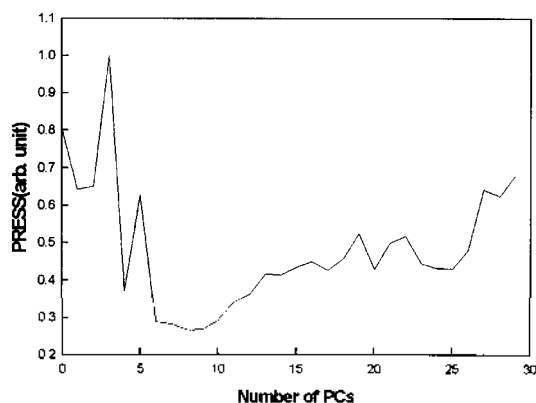


Fig. 3. Plots of PRESS versus the numbers of PC from cross validation analysis of the 32 sample set for PCR model.

장 큰 고유값을 가지고, 다음으로 두 번째 주성분(PC2)이 큰 고유값을 가진다. 주성분의 번호가 증가할수록 고유값이 점점 줄어드는 것을 알 수 있다. 이는 고유값이 작은 주성분들은 주성분 분석에 사용한 자료들을 설명함에 있어서 기여도가 작다는 것을 의미한다.

최적의 PCR 회귀모델을 구하기 위하여 교차검정 과정을 수행하여 PRESS를 구했고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 하나의 주성분을 이용했을 때의 PRESS가 2개의 주성분을 이용했을 때의 PRESS보다 작았고, 3개의 주성분을 이용했을 때의 PRESS는 다시 증가하였다. 4개의 주성분을 이용했을 때의 PRESS는 크게 감소하였고, 5개의 주성분을 이용했을 때의 PRESS는 증가를 나타내었다. 6개의 주성분을 이용했을 때의 PRESS는 다시 감소하였고, 7개에서부터 10개의 주성분을 이용하여 구한 PRESS는 점차적인 감소를 나타내었다. 그러나 10개 이상의 주성분을 이용했을 때에 구한 PRESS는 점점 증가하였다. 이러한 PRESS들을 이용하여 F -검정($\alpha=0.01$)을 수행하였을 때 PRESS의 변화가 없다고 할 수 있는 주성분의 수는 6이었다.

회귀모델에서의 이상점(outlier)을 검출하기 위하여 스펙트럼잔차를 구하였고, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 구한 스펙트럼잔차를 이용하여 Mahalanobis거리를 계산하여 군집분석을 행하였고, F -ratio를 계산하였고, F -검정을 수행하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 19번 시료가 가장 큰 스펙트럼잔차를 나타내었고 이 시료는 Trp와 Tyr의 농도가 각각 3.30×10^{-7} M로 높은 시료였다. Fig. 4에 나타낸 스펙트럼잔차를 이용하여 Mahalanobis

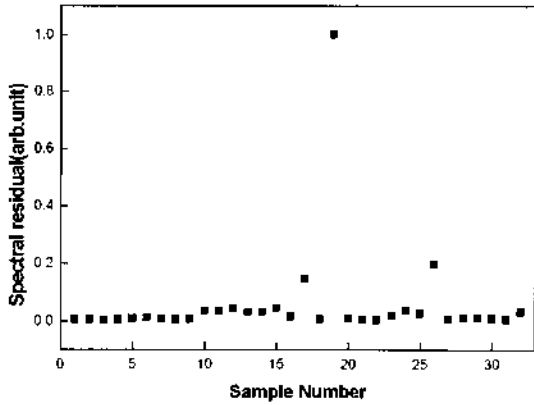


Fig. 4. Plots of spectral residual versus sample number.

거리를 계산하여 군집분석을 행하였을 때 이상점으로 검출된 시료는 19번 시료이었고, *F-ratio*가 1.0 이상의 값을 가지는 것을 이상점으로 했을 때 검출된 이상점은 19번, 26번 시료이었고, 계산된 *F-ratio*를 이용하여 *F*-검정을 행하였을 때의 이상점은 검출되지 않았다. 따라서, 이상점 검출방법 중에서 가장 민감한 것은 *t-ratio*를 이용한 방법임을 알았다.

PLS1 모델. Trp의 정량을 위한 최적의 PLS1 회귀 모델을 구하기 위하여 교차검정(cross validation)과정을 수행하여 *PRESS*를 구했고, Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에서 볼 수 있듯이 하나의 주성분을 이용했을 때의 *PRESS*가 2개의 주성분을 이용했을 때의 *PRESS*보다 크고, 3개 및 4개의 주성분을 이용했을 때의 *PRESS*는 다시 증가하였지만 5개의 주성분을 이용하면

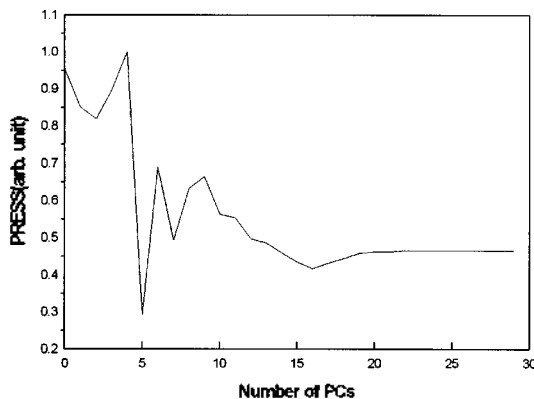


Fig. 5. Plots of the calculated *PRESS* using the PLS1 model of Trp versus the numbers of PC from cross-validation analysis of the 32 samples.

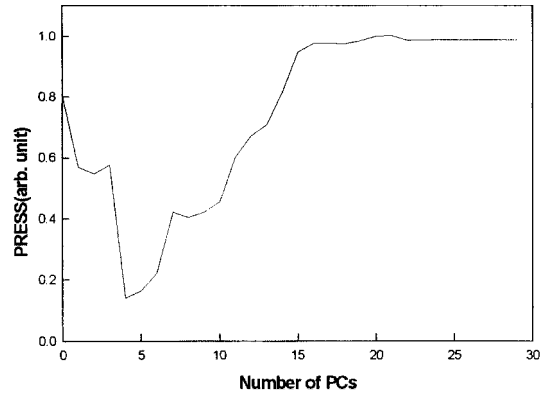


Fig. 6. Plots of the calculated *PRESS* using the PLS1 model of Tyr versus the numbers of PC from cross-validation analysis of the 32 samples.

다시 큰 감소를 보였다. *PRESS*는 주성분의 수가 증가할수록 증가와 감소를 거듭하면서 주성분의 수가 17일 때까지 감소하다가 주성분의 수가 17에서부터 20까지 서서히 증가한다. 주성분의 수가 20일 때부터는 일정한 값을 가진다. Fig. 5에 나타낸 *PRESS*들을 이용하여 *F*-검정($\alpha=0.01$)을 수행하였을 때 *PRESS*의 변화가 없다고 할 수 있는 주성분의 수는 5이었다.

Tyr의 정량을 위한 최적의 PLS1 회귀모델을 구하기 위하여 교차검정과정을 수행하여 *PRESS*를 구했고, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 주성분의 수가 5일 때까지 급격하게 감소하다가 6부터 급격하게 증가하였다. 주성분의 수가 16일 때부터는 일정한 값을 나타낸다. Fig. 6에 나타낸 *PRESS*들을 이용하여 *F*-검정을 수행하였을 때 *PRESS*의 변화가 없다고 할 수 있는 주성분의 수는 4이었다.

Trp와 Tyr에 대한 PLS1 회귀모델에서의 이상점을 검출하기 위하여 스펙트럼잔차를 구했고, 그 결과를 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 7에서 볼 수 있듯이 19번 시료가 가장 큰 스펙트럼잔차를 나타내었다. 19번 시료는 Trp의 농도가 각각 3.30×10^{-7} M로 높은 시료였다. Fig. 7에 나타낸 스펙트럼잔차를 이용하여 Mahalanobis 거리를 계산하여 군집분석을 행하였을 때 이상점으로 검출된 시료는 19번, 26번 시료이었고, *F-ratio*가 1.0 이상의 값을 가지는 것을 이상점으로 했을 때 검출된 이상점은 19번 시료이었고, 계산된 *F-ratio*를 이용하여 *F*-검정을 행하였을 때의 검출된 이상점은 없었다. Fig. 8에서는 19번 시료가 가장 큰 스펙트럼잔차를 나타내었다. 21번 시료는 Trp와 Tyr의 농도가 각각 3.30×10^{-7}

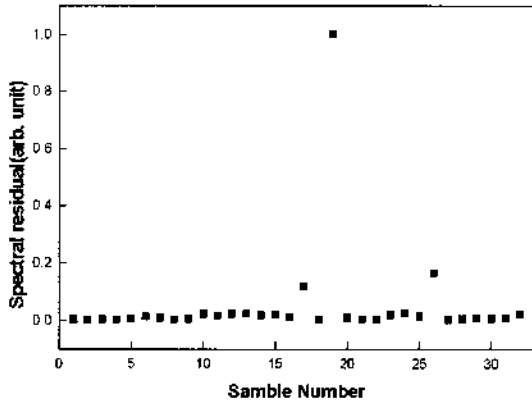


Fig. 7. Plots of the calculated spectral residual using the PLS1 model of Trp versus sample number.

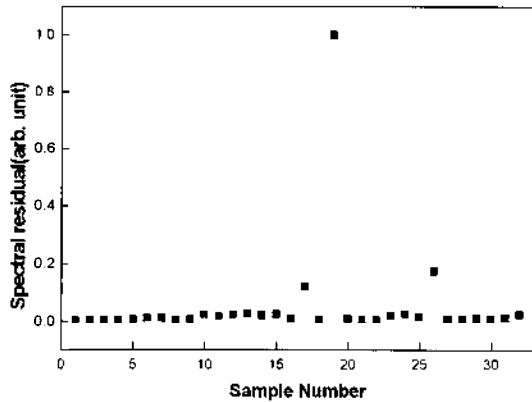


Fig. 8. Plots of the calculated spectral residual using the PLS1 model of Tyr versus sample number.

M로 붉은 시료였다. Fig. 8에 나타난 스펙트럼잔차를 이용하여 Mahalanobis 거리를 계산하여 군집분석을 행하였을 때 이상점으로 검출된 시료는 19번, 26번 시료이었고, F -ratio가 1.0 이상의 값을 가지는 것을 이상점으로 했을 때 검출된 이상점은 19번 시료이었고, 계산된 F -ratio를 이용하여 F -검정을 행하였을 때의 검출된 이상점은 없었다.

PLS2 모델. PLS2 과정의 최적의 회귀모델을 구하기 위하여 교차검정을 수행하여 PRESS를 구했고, Fig. 9에 나타내었다.

Fig. 9에서 볼 수 있듯이 주성분의 수가 증가할수록 PRESS는 점차적으로 감소함을 알 수 있고, 주성분의 수가 8일 때부터 PRESS가 일정한 값을 가진다. Fig. 9에 나타난 PRESS값을 이용하여 F -검정을 행하였을 때

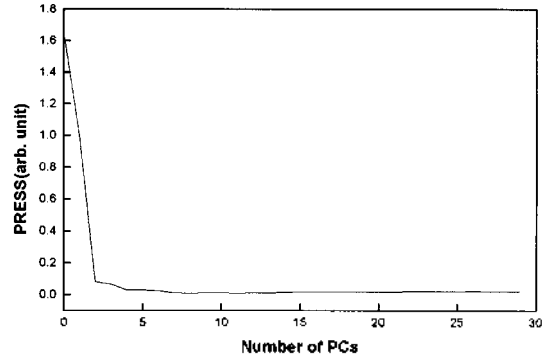


Fig. 9. Plots of the calculated PRESS using PLS2 model versus the numbers of PC from cross-validation analysis of the 32 sample set for PLS2.

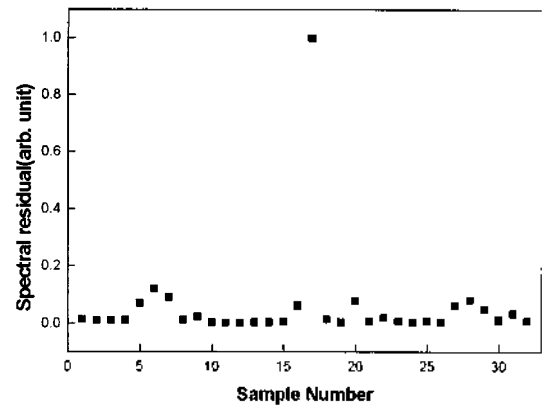


Fig. 10. Plots of spectral residual versus sample number to PLS2 model.

PRESS의 변화가 없더라고 할 수 있는 주성분의 수는 7이었다.

PLS2 회귀모델에서의 이상점을 검출하기 위하여 스펙트럼잔차를 구 했고, 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10에서 볼 수 있듯이 17번 시료가 가장 큰 스펙트럼잔차를 나타내었다. Fig. 10에 나타난 결과를 이용하여 Mahalanobis 거리를 이용하여 군집분석을 행하였을 때 이상점으로 검출된 시료는 17번 시료이었고, F -ratio가 1.0 이상의 값을 가지는 것을 이상점으로 했을 때 검출된 이상점은 17번 시료이었고, 계산된 F -value를 이용하여 F -검정을 행하였을 때의 검출된 이상점은 없었다.

외부검정. 회귀모델의 검정을 위하여 외부 검정 세트의 실제농도와 회귀모델을 이용하여 분석대상 물질의 농도를 계산하였고, 정량결과의 정확도를 나타내는

Table 1. Analytical results for tryptophan obtained by applying PCR, PLS1 and PLS2 to fluorescence spectral data^a

Actual	Predicted		
	PCR	PLS1	PLS2
3.30 · 10 ⁻⁵	3.17 · 10 ⁻⁵	3.35 · 10 ⁻⁵	3.34 · 10 ⁻⁵
3.30 · 10 ⁻⁴	3.64 · 10 ⁻⁴	3.41 · 10 ⁻⁴	3.46 · 10 ⁻⁴
3.30 · 10 ⁻⁵	3.92 · 10 ⁻⁵	3.45 · 10 ⁻⁵	3.48 · 10 ⁻⁵
3.30 · 10 ⁻⁶	3.93 · 10 ⁻⁶	3.24 · 10 ⁻⁶	3.46 · 10 ⁻⁶
3.30 · 10 ⁻¹	3.12 · 10 ⁻¹	3.36 · 10 ⁻¹	3.05 · 10 ⁻¹
3.30 · 10 ⁻¹	3.04 · 10 ⁻¹	3.39 · 10 ⁻¹	3.20 · 10 ⁻¹

^aRSEP₀: PCR, 8.2% ; PLS1, 5.7% ; PLS2, 5.6%.

Table 2. Analytical results for tyrosine obtained by applying PCR, PLS1 and PLS2 to fluorescence spectral data^a

Actual	Predicted		
	PCR	PLS1	PLS2
3.30 · 10 ⁻¹	3.58 · 10 ⁻¹	3.57 · 10 ⁻¹	3.39 · 10 ⁻¹
3.30 · 10 ⁻¹	2.87 · 10 ⁻¹	3.27 · 10 ⁻¹	3.51 · 10 ⁻¹
3.30 · 10 ⁻⁶	2.19 · 10 ⁻⁶	3.17 · 10 ⁻⁶	3.90 · 10 ⁻⁶
3.30 · 10 ⁻¹	3.04 · 10 ⁻¹	3.32 · 10 ⁻¹	3.22 · 10 ⁻¹
3.30 · 10 ⁻⁵	2.10 · 10 ⁻⁵	3.63 · 10 ⁻⁵	3.67 · 10 ⁻⁵
3.30 · 10 ⁻¹	3.29 · 10 ⁻¹	3.42 · 10 ⁻¹	3.35 · 10 ⁻¹

^aRSEP₀: PCR, 8.9% ; PLS1, 4.5% ; PLS2, 3.8%.

RSEP₀와 RSEP₀도 계산하였으며 그 결과를 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

외부검정세트는 측정된 38개의 스펙트럼들 중에서 무작위로 6개를 추출하여 구성하였다. Table 1에는 Trp의 정량결과를 나타내었다. Table 1에서 볼 수 있듯이 PCR에 의하여 구한 분석대상 물질의 RSEP₀의 8.2%로 가장 큰 값을 가지고, PLS2에 의하여 구한 분석대상 물질의 RSEP₀의 5.6%로 오차가 가장 작음을 알 수 있다. Table 2에는 Tyr의 정량결과를 나타내었다. Tyr의 경우에도 Trp와 같은 결과를 준다. PCR에 의하여 구한 분석대상 물질의 RSEP₀가 8.9%로 가장 큰 값을 가지고 PLS2에 의하여 구한 분석대상 물질의 RSEP₀가 3.8%로 오차가 가장 작음을 알 수 있다. 전체분석대상 물질의 정량결과 대한 회귀모델의 정확도를 평가하기 위하여 RSEP₀를 구하였다. PCR을 이용하여 구한 전체 분석대상 물질의 RSEP₀은 8.6% 이었고, PLS1을 이용하여 구한 전체 분석대상 물질의 RSEP₀은 5.1% 이었으며, PLS2를 이용하여 구한 전체 분석대상 물질의 RSEP₀은 4.6%이었다. RSEP₀의 결과도 마찬가지로 PLS2가 가장 오차가 작음을 나타내고 있다.

결론

Trp와 Tyr의 형광스펙트럼이 서로 겹치지만 다변량 분석법인 PCR, PLS1및 PLS2를 이용하여 Trp와 Tyr을 정량 할 수 있다. 스펙트럼간차를 이용하여 각각의 방법에서 Mahalanobis 거리에 의한 군집분석법, *F*-ratio 및 *F*-검정으로 이상점을 검출하였을 때 *F*-ratio를 이용하는 방법이 가장 민감한 방법이었다. 각 검정방법으로 검정시료의 농도를 예측하고, RSEP₀와 RSEP₀를 구했을 때 PLS2에 의하여 예측한 Trp와 Tyr의 농도가 가장 작은 RSEP₀와 RSEP₀을 나타내었다.

인용문헌

- Davies, J. S. *Amino Acids and Peptides*; Chapman & Hall, London, 1985.
- Vahjen, W.; Bradley, J.; Biliteuski, U.; Schmid, R. D. *Anal. Lett.* **1991**, *24*, 1445.
- Villarta, R. L.; Cuningham, D. D.; Guilhauff, G. G. *Talanta* **1991**, *38*, 49.
- Tsai, H.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2897.
- Saurina, J.; Hernandez-Cassou, S.; Fregas, E.; Alegret, S. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *405*, 153.
- Song, J.; Wang, X.; Xu, F.; Jiangyan, L. *Huaxue Fence* **1991**, *27*, 225.
- Watanabe, A. *J. Chromatogr Biomed. Appl.* **1992**, *121*, 241.
- Polanuer, B.; Sholin, A.; Demina, N.; Rumiantsova, N. *J. Chromatogr.* **1992**, *594*, 173.
- Wills, R. B. II.; Wimalasiri, P.; Greenfield, H. *J. Micro-nutr. Anal.* **1985**, *1*, 23.
- Yang, J.; Zhao, W. *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 2291.
- Jie, N.; Yang, J.; Zhan, Z. *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 2283.
- Damiani, P.; Ibanez, G.; Olivieri, A. *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 247.
- Mohamed, F. A. *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 2491.
- Konstantianos, D. G.; Ioannou, P. C.; Efsthathiou, C. E. *Analyst* **1991**, *116*, 373.
- Konstantianos, D. G.; Ioannou, P. C. *Analyst* **1992**, *117*, 877.
- Gorges, J.; Ghazarian, S. *Anal. Chim. Acta.* **1993**, *276*, 401.
- Soper, S. A.; Warner, I. M.; McGown, L. B. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 477.
- Giamarchi, P.; Stephan, L.; Salomon, S.; Le Bihan, A. *J. Fluorescence* **2000**, *10*, 393.
- Guiteras, J.; Beltr n, J. L.; Ferrer, R. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *361*, 233.

20. Martens, H. Naes, T. *Multivariate Calibration*; Wiley, New York, **1989**.
21. Sharaf, M. A.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R. *Chemometrics*; Wiley, New York, **1986**.
22. Hernández, M. J. M.; Camacho, R. M. V.; Cuenca, E. M.; Alvarez-Coque, M. C. G. *Analyst* **1990**, *115*, 1125.
-