

= 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.  $\text{Eu}^{3+}$  - TTA- histidine 착물의 방출 봉우리는 235 nm에서 들뜰 때 470 nm에서 나타나며 그의 형광 세기는 histidine을  $1 \times 10^{-7}$  -  $4 \times 10^{-6}$  M 까지 가함에 따라 직선적으로 증가하였다. 이를 이용하여 histidine을 정량 하는 방법을 연구하였다. 검출 한계는  $5 \times 10^{-7}$  M이었으며 이때의 상대표준편차는 3.5%이었다. 이 방법을 합성 시료에서 histidine을 정량 하는데 이용하였다.

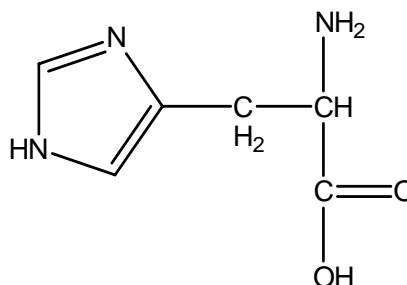
**Abstract :** A simple and sensitive determination method of histidine has been investigated using the spectrofluorometry. An emission peak of  $\text{Eu}^{3+}$  - TTA- histidine complex occurs at 470 nm in aquous solution with excitation at 235 nm and the fluorescence intensity increased linearly with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

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

### 1. 서 론

Histidine은 필수 아미노산의 일종으로 염기성이고 그 구조는 Scheme 1과 같다. Histidine은 인간 피부에 존재하여 피부암의 원인이 되는 것으로 알려졌다.<sup>1</sup> 지금 까지 histidine을 분석하는 방법을 보면 아미노산을 다른 유도 체로 변형한 후 HPLC로 분리하여 분석하거나<sup>2,3,4</sup> 음이온 교환수지에 시료를 넣고 NaOH와 sodium acetate 용리액 으로 용리한 후 IPMD(integrated pulsed amperometric detection) 법<sup>5,6,7</sup>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  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA(thenoyltrifluoroacetone) 착물의 형광 세기가 glycine의 농도에 따라 증가하는 현상을 이용하여 glycine을 형광법으로 정량하는 방법을 발표한바 있다.<sup>8</sup> 희토류원소는 빛 흡수에서 진동자세가 낮아 형광이 약하나 TTA 같이 베타디케톤의 리간드와 착물을 이루면 에너지 이동에 의해 형광이 증가된다.<sup>9,10</sup> 여기에 다른 리간드가 들어가면 3성분 착물 형성에 의해 착물의 형광 세기가 변한다.<sup>10</sup>  $\text{Eu}^{3+}$ -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 슬릿나비는 10 nm 이었다. 광원은 150 W Xenon 등을 사용하였다. pH는 Mettler Toledo Mp 220 pH 미터를 사용하였다.

각종 아미노산과  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ 와 TTA 시약은 Aldrich제로서 99.95%의 순도를 사용하였고 그 외 시약은 분석용 시약이며 물은 탈이온수를 사용하였다.  $\text{Eu}^{3+}$ 의 표준용액은  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ 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  $1.0 \times 10^{-4}$  M  $\text{Eu}^{3+}$ 의 표준용액 1 mL,  $1.0 \times 10^{-4}$  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

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

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

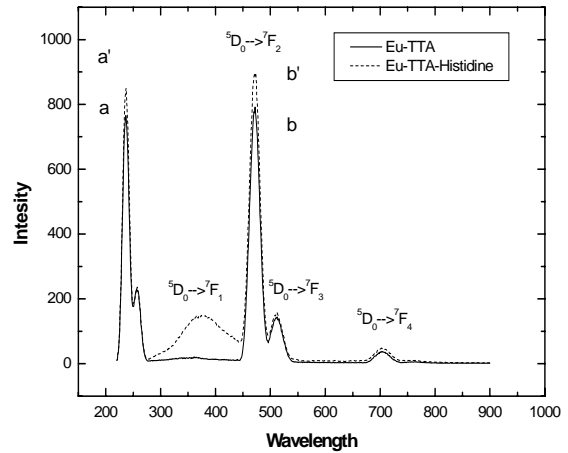


Fig. 1. Spectra of  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA and  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA-Histidine [ $\text{Eu}^{3+}$ ]=  $1 \times 10^{-5}$ M, [TTA]=  $3 \times 10^{-5}$ M.

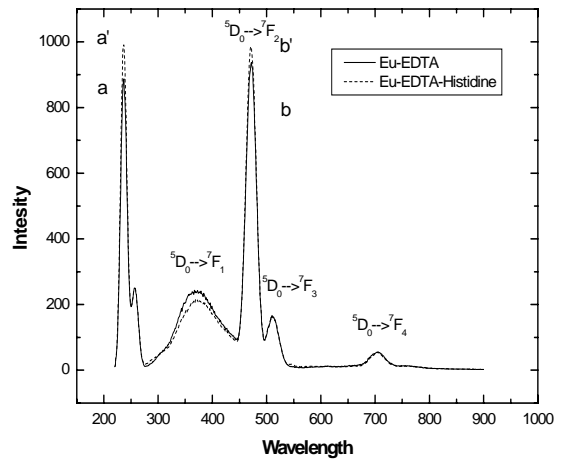


Fig. 2. Spectra of  $\text{Eu}^{3+}$ -EDTA and  $\text{Eu}^{3+}$ -EDTA-Histidine [ $\text{Eu}^{3+}$ ]=  $1 \times 10^{-5}$ M, [EDTA]= $3 \times 10^{-5}$ M.

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

세기는  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA의 봉우리 세기보다 크을 알 수 있다. 이는 이성분 착물 보다는 3성분 착물의 흡광도와 방출세기가 증가 됨을 알 수 있다. 그러나  $\text{Eu}^{3+}$ -EDTA-histidine의 470 nm의 봉우리 세기는  $\text{Eu}^{3+}$ -EDTA 봉우리 세기와 차이가 거의 없다.  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA-histidine 착물의 형광세기는 histidine의 농도 증가에 따라 증가하였다. 따라서 이를 이용하여 histidine을 정량하는 최적 조건을 연구하고자 한다.  $\text{Eu}^{3+}$ -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  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA의 형광의 세기는 7.5이상에서 가장 크게 나타나고  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA-histidine의 경우에는 pH 8.5에서 방출세기가 가장 크다. 따라서 용액의 pH는 8.5로 조절하기로 하였다.  $\text{Eu}^{3+}$ 와 TTA의 결합비는 1 : 3 으로<sup>11</sup> 알려졌기 때문에 TTA의 리간드의 농도는  $\text{Eu}^{3+}$  농도의 3배로 고정하였다.

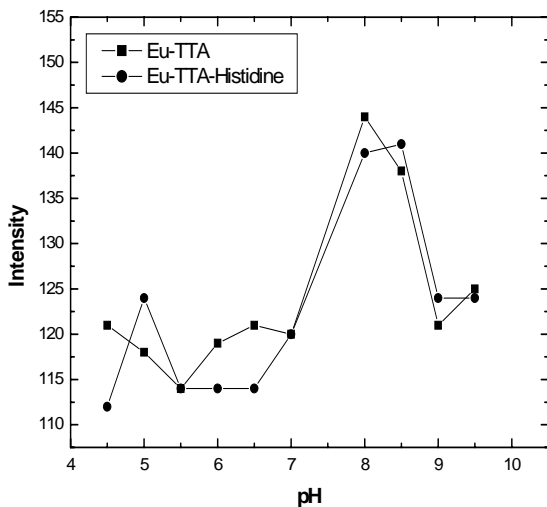


Fig. 3. Effect of pH on fluorescence intensity of  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA and  $\text{Eu}^{3+}$ -TTA-Histidine complex  
 $[\text{Eu}^{3+}] = 1 \times 10^{-5}\text{M}$ ,  $[\text{TTA}] = 3 \times 10^{-5}\text{M}$ ,  $[\text{Histidine}] = 5 \times 10^{-5}\text{M}$ .

### 3.3 검정선

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

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

### 3.4 방해 이온

470 nm에서  $\text{Eu}^{3+}$ -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  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 에서의 허용 한계이다.

Table 1. Tolerance limits of foreign ions

Ions	Tolerance(M)
Citrate	$1 \times 10^{-4}$
Oxalate	$1 \times 10^{-5}$
Palmitate	$5 \times 10^{-5}$
Cysteine	$1 \times 10^{-5}$
glutamic acid	$1 \times 10^{-5}$
Phenylalanine	$1 \times 10^{-5}$
Glycine	$5 \times 10^{-5}$
$\text{SO}_4^{2-}$	$2 \times 10^{-4}$

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: $1 \times 10^{-5}$ M of glutamic acid, phenylalanine, cystine, citric acid in $1.00 \times 10^{-6}$ M histidine	$1.21 \times 10^{-6}$ M
Sample 2: $1 \times 10^{-5}$ M of glutamic acid, phenylalanine, cystine, citric acid in $5.00 \times 10^{-6}$ M histidine	$5.61 \times 10^{-6}$ M

### 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. Hanco, 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**, 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).