

# ODI 화학발광(1,1'-oxalyldiimidazole chemiluminescence)의 이론과 식품에서의 응용

Understanding of ODI chemiluminescence and its Applications in Food Science

김영택\*, 김경원

Young Teck Kim\*, Kyungwon Kim

버지니아공과대학 임산과학과 식품포장전공

Packaging Systems and Design, Department of Wood Science and Forest Products, Virginia Tech

## I. 서론

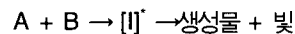
현재 화학발광을 이용한 분석화학적 방법은 일반적으로 식품안전성 분야에서 이용되어져 왔으나, 식품 상품에 대한 상업적 이용 혹은, 분석화학적 공인 검사방법으로는 많이 이용되지 않아왔다. 대표적인 이유로서는 일반적인 화학발광법은 상대적으로 많은 시간이 요구되어지고, 또한 용해도와 혹은 안전성과 같은 시료에 대한 제한적 응용성을 들 수 있다. 그러나, 본연구팀에서 개발한 1,1'-oxalyldiimidazole chemiluminescence (ODI-CL)의 다양한 응용은 다양한 식품들에 대한 분석시, ODI를 이용한 화학발광법이 효과적으로 기존의 크로마토그래피법, 분광학적 검사를 대체할 수 있음을 보여준다(1-5).

여러 화학발광법중, peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL)를 이용한 측정방법은 생지표물질, 생독성물질 또는 환경독성 화학물질과 같은 다양한 분석시료들을 측정하기 위해서 활발하게 개발되어져왔고 이용되어지고 있다. 대표적인 이유로서는, PO-CL 측정법이 경제적 효율성이 있고,

간단하며, 흡광법 그리고 형광법과 같은 다른 분광적 검사법보다 높은 정확도 및 선택적 특이성이 있기 때문이다(5-6).

화학발광이라 함은 화학반응에 의해서 발생하는 에너지에 의해 물질이 들뜬 상태가 된 후 빛을 내면서 떨어지는 경우를 일컫는다. 자연에서 보여지는 대표적인 자연화학발광으로서 반딧불의 경우 luciferin이라는 물질이 생체내의 luciferase라는 효소에 의해 분해되면서 빛을 내는 것으로 알려져 있는데, 이러한 화학발광법은 bioluminescence라고 불리워진다.

일반적인 화학발광에는 시료물질 (fluorophore), 산화제 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 산화물질(fuel) 또는 촉매제 (catalyst)와 같은 4가지의 기본적인 물질들이 요구되어진다.



으로 표시할 수 있는데 여기서 [I]<sup>\*</sup>는 들뜬 상태에 있는 중간체를, A와 B는 반응을 통하여 고에너지를 발생할 수 있는 연료를 의미한다. 어떤 경우에는 [I]<sup>\*</sup>가 형광을 내는 효율이 떨어져서 다른 물질(sensitizer, F)을 사용하기도 하는데 이 반응은 다음과 같이 순차적으로 나타낼 수 있다.

\*Corresponding author: Young Teck Kim

Packaging Systems and Design, Department of Wood Science and Forest Products, Virginia Tech University

VA, 24061, USA

Tel: +540-231-7107

Fax: +540-231-8868

e-mail: ytkim@vt.edu

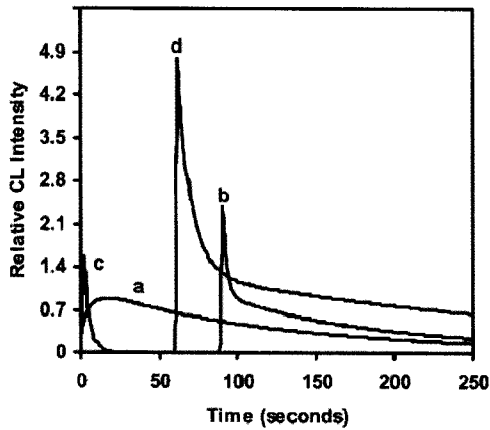
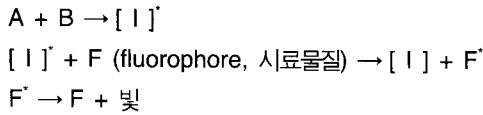


그림 1. 다양한 반응환경에서의 시간함수에 따른 CL 감도: (a) TCPO-CL reaction. (b) Addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and perylene after TCPO reaction with ImH for 90 sec. (c) ODI-CL reaction. (d) addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and perylene after mixing TCPO with ODI for 60 sec.(1)



촉매제를 이용하여 Aryl oxalate와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 사이에서의 반응을 통한 peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL)에 대한 연구는, 위에서 언급한 방법중 후자에 속한다. 장점으로는, fluorescence 와 UV 흡광도와 비교시 높은 정확도로 인하여, 다양한 미량의 물질 fluophore를 분석하기 위해서 효과적일수 있다는 점이다(1-2). Aryl oxalate 류로서는, bis (2, 4-diitrophenyl) oxalate (DNPO), bis (2, 4, 6-trichlorophenyl) oxalate (TCPO), 그리고, pentachlorophenyl oxalate (PCPO)와 같은 불안정한 oxalate류들이 포함된다.

Rauhut와 그의 동료들이(8) 1,2-dioxetanedione를 고에너지 중간물질 (high energy intermediate)로서 보고한 이후, 다른 가능한 중간 물질의 구조와 특성들이 연구되어져 왔었다. Alvarez와 그의 동료들은(9) PO-CL 반응에서 적어도 2가지 이상의 물질이 존재할수있다는 것을 보고하였고, 다른 연구자들은 고에너지 중간물질의 다양한 발생메카니즘이 존재함을 제안해왔었다. 가장 기본적인 반응물질로서, 많은 연구자들은(2,4,9), imidazole (ImH)을 가장 효과적인 촉매제로서 인식하고 반응 주요 물질로서 사용하였다. 이러한 고에너지 중간물질중, PO-CL반응의 ODI의

형성은 획기적인 고에너지 중간물질로서 인식되어진다.

2002년, Lee와 그의 동료(1)들에 의해서, PO-CL반응을 통한 perylene emission intensity가 시간과 시약들의 반응 순서에 따라서 처음으로 연구 되어졌고, 이러한 연구를 통하여, 처음으로 각각의 시약들의 반응경로와 중간물질의 생성과정이 규명되어졌다. 이 연구의 가장 주목할 만한 사항은, 형광물질의 측정시 ODI와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와의 반응을 통하여 매우 높은 intensity와 빠른 반응 속도(fast decaying emission curve)를 얻을수 있다는 점이다(그림 1). 또한, 이러한 반응은 물 (H<sub>2</sub>O)의 존재가 큰문제가 될수 다른 화학발광법과 달리 빠른 반응을 통하여 물의 영향을 줄일수 있고, 과산화 수소와 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 imidazole의 농도 및 반응 시간조절을 통하여 상대적 intensity를 조절할수 있다는 점이 기존 반응과 다른 점이다. 또한, 기존의 화학발광 반응은, 상대적으로 많은 시간이 요구되어져 왔기 때문에, 이러한 발견은 PO-CL반응을 통한 화학발광에서 획기적인 일로서 간주 되어지고 있다.

## II. 반응기작

### A. ODI chemiluminescence

Lee 와 그의 동료들은(1) 그림 2에서 보여지듯이, 통용

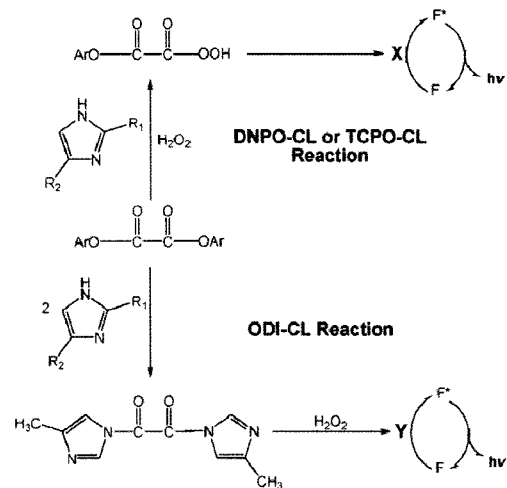


그림 2. DNPO-CL (or TCPO-CL) and ODI-CL 반응기작. Ar: 2, 4-dinitrophenyl or 2, 4, 6-trichlorophenyl, R<sub>1</sub>: H, CH<sub>3</sub>, or CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H or CH<sub>3</sub>, F: fluorescent compound, X (Y): high-energy intermediate capable of transferring energy to F (2).

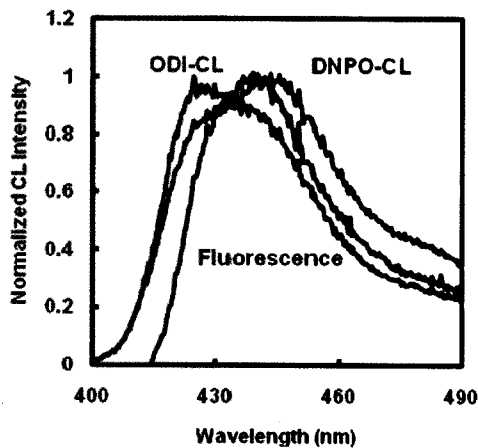


그림 3. 1-Aminopyrene의 형광발광 (fluorescence), DNPO-CL 그리고 ODI-CL spectra(5).

적으로 인식되어져 왔던 반응 경로에서 설명되어질 수 없었던 다양한 문제점들을 중간물질, z,의 형성으로서 설명하였고, 이러한 가설은 현재 가장 적합한 모델로서 인식되어지고 있다. 즉, 고에너지 중간물질, Y,는 PO-CL 반응에서 가장 중요한 에너지 전달과정에서 관련된 중간물질이며, 이것은 imidazole의 촉매제로서에 대한 인식을 바꾸게 되었다. 이들의 발견은 다음과 같이 요약되어질수 있다. TCPO와 Imidazole의 반응을 통하여 ODI가 형성이 되고, ODI는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응을 하여 빠르고 인텐서티가 높은 반응을 일으킨다는 점이다. 따라서, reagent들의 반응 순서는 PO-CL반응의 핵심적 요소임을 알수 있다.

### B. Peroxyoxalate 화학발광의 Multiple pathways

이러한 다양한 다양한 PO-CL 반응경로들을 더욱 자세히 설명하기위해서, 본 연구팀은 고세소자 분광기 (charge coupled spectrometer)를 이용하여, 다양한 PO-CL 반응과정아래에서의 CL emission spectra 비교분석하였고,고 에너지 중간물질, X 와Y의 형성에 관련된, PO-CL 반응의 다양한메카니즘을 제안하였다(2).

그림 2에서 보여진것처럼, CL 반응법에 사용된 CL 반응물질들이 같다 할지라도, 4-mehtylimidazole (4MImH)의 존재하에 DNPO-CL 반응으로부터 형성된 고에너지 중간물질 (X)는 ODI-CL반응에서 형성된 물질 (Y)와 다르다는 것이 보여진다.

그림 3에서 보여진 1-aminopyrene (1-AP)의 세가지 다른 일련의 emission spectra는 다음의 설명들을 증명한다. 첫째로, ethylacetate에서 0.1 mM DNPO와 0.4mM 4MImH의 5분 반응에서 형성된 ODI-CL 반응으로부터의 Y의 구조와 특성은 DNPO-CL 반응 (1.0 mM DNPO, 1.0 mM 4MImH in Ethylacetate,와 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에서 형성된 X와 다르다는 것이 보여진다. 둘째로, 두개의 peak를 가진 1-AP의 CL spectrum은 1-AP에게 에너지를 전달할수 있는 고에너지 중간물질의 특성에 의존적이다. 셋째로, 두가지 다른 CL반응들로부터 관찰된 1-AP의 CL spectra는 PX-2 Pulsed Xenon Lamp에 의해 얻어진 1-AP의 steady-state 형광 spectrum과 다르다는 것이 보여진다. 또한, 이러한 반응은 ImH의 농도에 따라서 다른 형태의 고에너지 중간물질이 형성되어질 수 있음도 제안되었다(2).

높은 감도를 지닌 photomultiplier tube와 stop-flow injection이 장착된 형광분광기를 이용하여 백그라운드들의 상태를 분석시, ODI-CL의 백그라운드 emission은 400에서 420 nm까지 증가하였다가 inflection point 없이 지속적으로 감소하였다. 다양한 백그라운드 emission 연구를 통하여, ODI-CL반응에서 형성되어진 고에너지 중간물질의 구조는 그림 2에서 보여진 것처럼 TCPO-CL 혹은 DNPO-CL에서 형성되어진 것과는 다른 새로운 고에너지 중간물질이 존재함을 알수 있었다. 이것은 화학발광 spectrum의 기본적 형태를 가지고 있다 할지라도, ODI-CL과 DNPO-CL에서 형성된 고에너지중간체의 특성에 의존한다는 것을 지적한다.

## III. 식품과학에서의 응용

### A. 유제품에서의 melamine 검출

2007년 중국에서 생산된 우유를 이용한 유제품에 melamine(2,4, 6-triamino-1,3,5-triazine)이 검출되어 상당한 사회적 이슈가 발생했었다. 멜라민은 구조상 66%의 질소를 함유하고 있고, 이는 우유의 질소 함량을 높이는데 이용되었으며, 이러한 멜라민의 섭취는 인체내 신장과 같은 여러장기에서 심각한 질병을 유발시킬수 있는 물질로 알려져 왔다. 이로인하여, 멜라민의 식품내 사용은 다양한 국가에서 금지되어져 왔다(3,10).

표 1. 전통적 분석방법의 검출한계와 식품재료

분석방법	검출한계 (LOD)	식품 재료
GC/HPLC	10 ppb~200 ppm	-
SERS	33 ppb	Aquous solution
ELISA	< 20 ppb	Dog food
CLEIA	6.3 ppb	milk

전통적인 멜라민을 검출방법은 UV나 mass spectrometry를 장착한 HPLC나 GC를 통한 크로마토그래피 법이다. 이러한 방법의 검출한계(limit of detection, LOD)는 분석 시료들의 특성에 의존한다. 그럼으로, 크로마토그래피의 검출한계는 일반적으로 10ppb~200ppm으로 알려져 왔고, 이러한 방법은 미국 FDA에서도 사용되어지고 있다. 최근에는 다양한 분석 기기, 즉, surface-enhanced raman spectroscopy, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 그리고 lumino-CL을 이용한 competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA)가 멜라민을 분석하기 위해서 이용되어져 왔다. 이들의 검출한계는 다음 표 1과 같다(3,10,11).

그러나, 일반적인 PO-CL 측정법은 매우 감도가 높고 선택성이 높은것으로 밝혀졌으나, 사용되어지는 시약들 즉, DNPO 혹은 TCPO들의 물에 대한 불안정성으로 인하여 쉽게 적용되어질수 없다. 그러나, 본연구팀에서 개발된 변형된 ODI-CL 법은 상대적으로 매우 빠른 반응과 감도를 통하여 수용적상황(aqueous solution)에서도 쉽게 적용되어질수있다. 이러한 반응적 특성은 그림 4에서 보여지는것과 같은 새로운 멜라민 측정법, ODI-CLEA 법이 가능함을 보여준다(3).

표 2에서 보여진 것처럼, 본연구팀은 최초로 fat이 함유된 유제품을 competitive ODI CLEIA 방법을 통하여 직접적으로 검출하였고 정량화되어졌다. 이러한 측정법은 높은 선택적 반응법으로 인하여, 다양한 식품산업 및 바

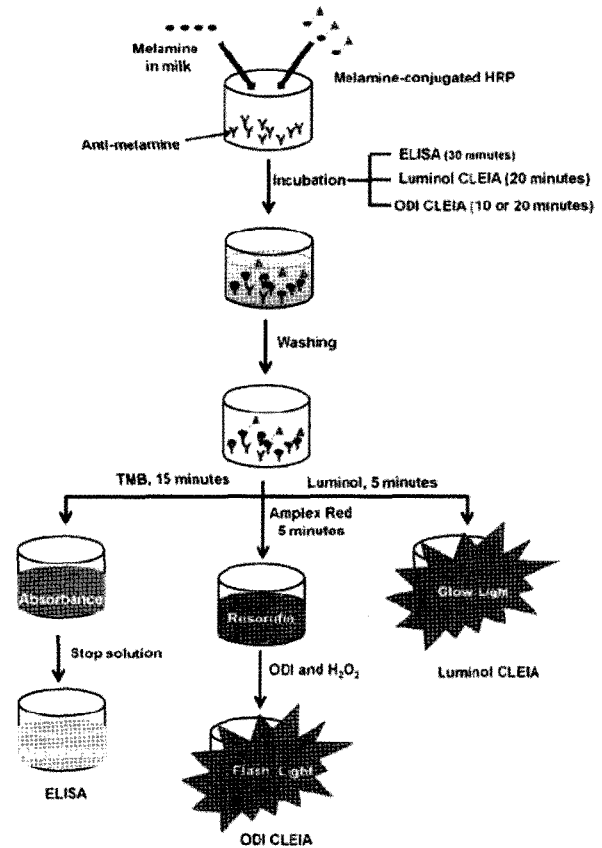


그림 4. ELISA, Luminol CLEIA 그리고 ODI CLEIA의 측정모식도(3)

이오산업에 직접적응용이 예상되어질수 있다(3).

B. 우유에서 살균지표 (ALP)의 측정

Alkaline Phosphatase(ALP)는 유제품이 적절하게 살균(pasteurized)되어졌는지에 대한 지표로서 사용되어져 왔다(4). 이것은 ALP가 식품병원성균을 사멸하는 공정조건보다 높은 온도에서 비활성화 되기때문이다. 그림 5에서처럼 ODI-CL를 통한 ALP의 활성 threshold level(350

표 2. 다양한 우유에서의 멜라민 정량을 위한 정량선의 Dynamic range(3).

Milk	Dynamic range (ppb)	Equation	R <sup>2</sup>
Fat free	62.5-2000	y=-6169ln(x)+60619	0.996
2.0%	125-1500	y=-9339ln(x)+88803	0.996
Whole	250-1000	y=-13878ln(x)+127439	0.998

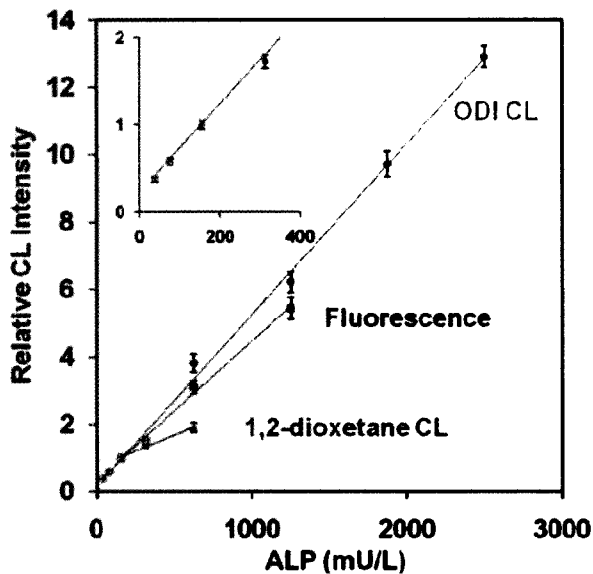


그림 5. ODI-CL법을 사용한 우유내 ALP의 Linear정량선(4).

mU/L) 가능함이 본연구팀에 의해서 밝혀졌다. 이는 다른 형광법이나 화학발광법(1, 2-dioxetane CL)과도 비교했을 때 높은 dynamic detection range를 보여주었다(4). 주요 반응 물질로서 fluorescein diphosphate tetraammonium salt (FDP)는 ALP와 쉽게 반응하고, 반응물질은 높은 ODI-CL 반응을 위한 quantum yield를 나타낸다. 따라서, 이러한 반응을 통하여 그림 6과 같이 ALP의 우유내 함량을 모니터링할 수 있는 진화된 센서의 개발이 가능한

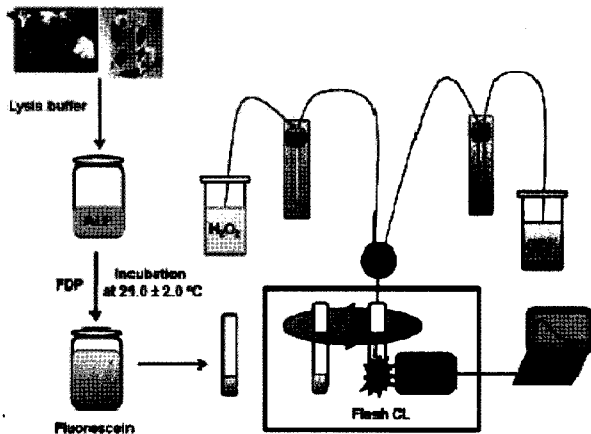


그림 6. ODI-CL법을 이용한 우유내 ALP의 검출 방법(4)

것이다. 이러한 검출 방법은, 고감도의 enzyme immunoassay(EIA)와의 응용과도 예상 되어질수 있다.

### C. Lab on a chip 과 같은 Biosensor의 개발

형광검출을 이용한 첫번째 capillary electrophoresis chip이 소개되어진 이후, 다양한 optical 방법들(UV, fluorescence, chemiluminescence, 등등)을 이용한 수많은 microfluidic chip들이 개발되어져왔다. Microfluidic chip개발의 중요 목적중에 하나는 다양한 질병 혹은 생물학적 환경적 독성 물질들의 검출 및 모니터링 할수 있는 소형 기자의 개발이라 할 수 있다. 일반적으로, UV혹은 가시광선 흡광법은 상대적으로 낮은 감도에 의해서 많은 제약들이 있어왔다. 또한, Laser induced fluorescence (LIF)를 이용한 방법은 높은 감도를 가지고 있으나 light source의 문제점으로 인하여 소형화 될수 없는 단점이 있다. Light emitted diode(LED)의 microfluidic 장치에 대한 적용은 측정 감도에 있을 수 있다. 이러한 다양한 물리적 혹은 화학적 문제점을 해결할 수 있는 것이 화학발광법이다(1, 6). 화학발광법은 상대적으로 큰 부피의 light source를 요구하지도 않고, 또한 최근 본 연구팀에서 개발된 ODI-CL법은 빠른 시간내에 높은 감도를 보여줌으로써(6), 그림 8에서 보여진 것처럼, 소형기기의 개발에 있어서 최적의 센서역할을 수행할 수 있음을 보여준다. 이러한 마이크로칩은 식품에서뿐만 아니라 의학, 환경학, 생물학과 같은 다양한 과학분야에서 목적에 맞게 쉽게 응용 되어질 수 있고, 위에서 언급한 다른 적용 사례들과도 쉽게 접목이 될 수 있는 장점이 있다(6).

## IV. 결론

여러 장점에도 불구하고 bioluminescence를 포함한 일반적인 화학발광법(chemiluminescence)의 분석화학적 적용은 대체로 많은 시간과 낮은 인텐시티의 문제가 발생하는 경우가 많이 있다. 이러한 문제점을 해결하고 선택적 분석 능력을 증가하기 위하여, 다양한 기술과의 접목이 이루어지고 있다. 대표적인 예로서는, PO-CL reaction은 antigen-antibody 검출과 같은 solid phase chemiluminescence immunoassay(CIA)의 핵심기술로서 이용되어지고 있고, 이러한 기술들은 다양한 곰팡이독, 혹은 병원생미생

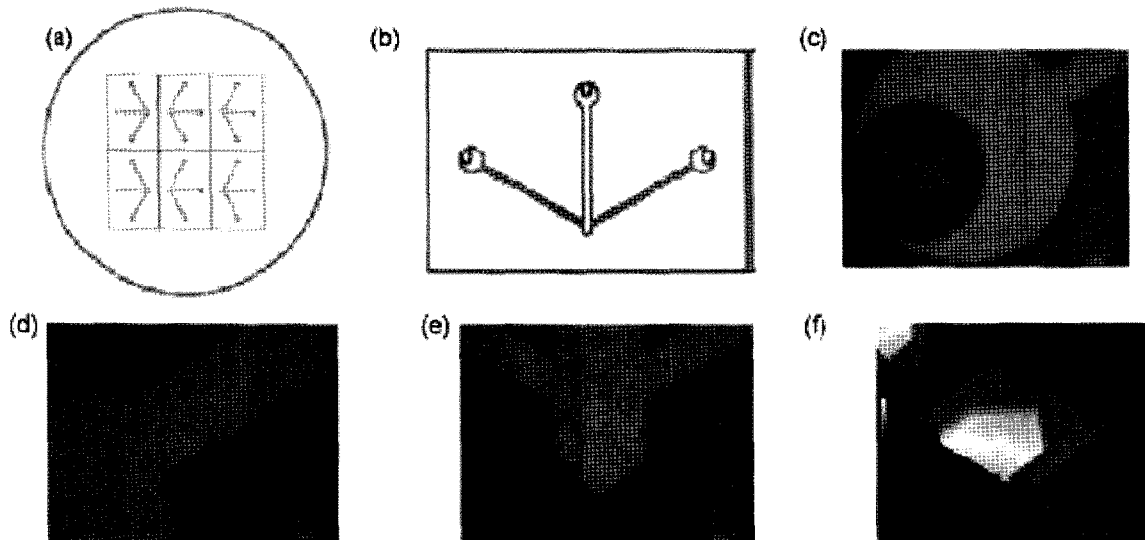


그림 7. ODI-CL법을 이용한 Lab on a chip의 개발: (a) 직경 15.2cm 두께 0.5mm의 디스크에서 6 microchips 디자인, (b) 마이크로칩의 디자인, (c)~ (e) channels of microchips, (f) pentagonal CL detection area(2)

물들과 같은 식품내 독성 물질 및 안전성에 관련된 물질의 미량 분석에 응용되어질 수 있다. 또한, 특성화된 경우에 발생할 수 있는 CL 반응의 문제점을 보완하고 해결하기 위해서, 다양한 “enhancer”의 첨가 내지 촉매제를 이용한 분

석 감도 및 분석시간, 그리고 반응시간 등의 조절등을 통하여 다양한 식품분야에서의 응용이 가능할 수 있다. 식품 포장분야에서는 높은 감도와 빠른 반응 시간에 따라, 포장 물질내 다양한 물질의 migration 혹은 바람직하지 않은 diffusion과 같은 dynamic behavior 연구에 응용되어질 수 있을 것이라고 판단된다. 또한, 이러한 기술들은 가까운 미래에 다양한 상업적 응용이 가능한 소형기자재들, 예들 들어 lab on a chip과 같은 마이크로칩의 센서 부분을 담당할 수 있을 것이라고 예상되어진다.

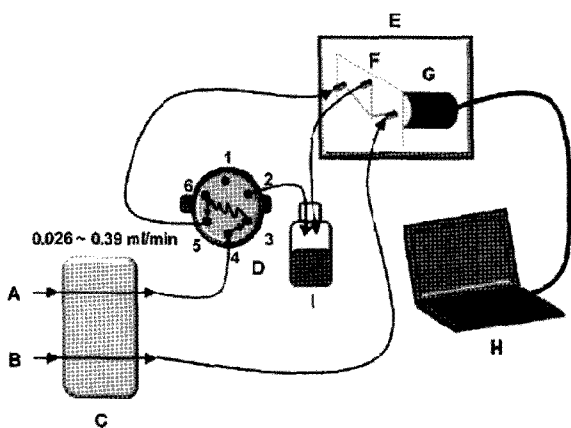


그림 8. 마이크로칩을 장착한 flow injection analysis (FIA)의 모델: (A), (B) ODI reagents, (C) syringe pump, (D) injection valve, (E) chamber, (F) 마이크로칩, (G) photomultiplier tube (PMT), (H) data collection and analysis(2)

## V. 참고문헌

1. Lee, J.H., Rock, J.C., Park S.B., Schlautman M.A., Carraway E.R., Study of the characteristics of three high-energy intermediates generated in peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL) reactions, *Journal of Chemical Society, Perkin Trans*, 2002, 2, 802-809
2. Kim Y.T., Ko S.O., Lee J.H., Microfluidic device capable of sensing ultrafast chemiluminescence, *TALANTA*, 2009, 78 (3), 998-1003
3. Choi J, Kim Y.T., Lee J.H., Rapid quantification of melamine in milk using competitive 1,1'-oxalyldiimidazole chemiluminescent enzyme immunoassay, *Analyst*, 2010, 135, 2445-2450
4. Park L., Bae H., Kim Y.T., Lee J.H., Rapid monitoring of alkaline phosphatase in raw milk using 1,1'-oxalyldiimidazole chemiluminescence detection, *ANALYTICAL METHODS*, 2011, 3, (1), 156-160

5. Rho P.P, Seo H.T.,Ko S., Kim Y.T., Schlautman M., Carraway E., Evidence of multiple pathways capable of emitting peroxyoxalate chemiluminescence using a charge coupled device spectrometer. *Chemical Communications*, 2011, 47 (19), 5542-5544.
6. DeVasto J. K. and Grayeski M. L., Investigation of the quenching of peroxyoxalate chemiluminescence by amine substituted compounds, *Analyst*, 1991, 116, 443
7. Catherall C. L. R., Palmer T. F. and Cundall R. B., Chemiluminescence from reactions of bis(pentachlorophenyl)oxalate, hydrogen peroxide and fluorescent compounds. Kinetics and mechanism, *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.* 1984, 2, 80, 823
8. Rauhut M. M., Bollyky L. J., Roberts B. G. and Loy M., Chemiluminescence from reactions of electronegatively substituted aryl oxalates with hydrogen peroxide and fluorescent compounds, *Journal of American Chemical Society*, 1967, 89, 6515
9. Alvarez F., Parekh N. J., Matuszeski B., Givens R. S., Higuchi T. and Schowen R. L., Multiple intermediates generate fluorophore-derived light in the oxalate/peroxide chemiluminescence system *Journal of American Chemical Society*, 1986, 108, 6435
10. Tyan Y.-C., Yang M.-H., Jong S.-B., Wang C.-K. and Shiea J., Melamine contamination, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 395, 729
11. Zhai C., Qiang W., Sheng J., Lei J. and Ju H., Pretreatment-free fast ultraviolet detection of melamine in milk products with a disposable microfluidic device, *J. Chromatogr., A*, 2010, 1217, 785