韓國營養學會誌 : 第 17 卷 · 第 1 號 · 1984
Korean J. Nutr. Vol. 17, No. 1, 1984

무산소상태에서 $FeCl_3$로 촉진된 Thiobarbituric Acid 반응을 이용한 혈청중 TBA 반응물의 새로운 정량법

이정원 · 모수미* · 이태녕**

충남대학교 이과대학 가정교육과
* 서울대학교 가정대학 식품영양학과
** 서울대학교 사범대학 화학교육과

A New Microassay for the Determination of Serum TBA (Thiobarbituric Acid) Value Enhanced by $FeCl_3$ under Anaerobic Condition

Lee, Joungwon, Mo, Sumi, and Lee, Tae Young **

Dept. of Home Economics Education, Chungnam National Univ.
Dept. of Food and Nutrition, Seoul National Univ.
Dept. of Chemistry Education, Seoul National Univ.

=ABSTRACT=

A new microassay was proposed for the determination of serum thiobarbituric acid(TBA) value greatly enhanced by ferric ion under anaerobic condition. One μmole of $FeCl_3$ per 10 μl of serum was added to the TBA reaction mixture containing serum protein precipitate. The reaction mixture was heated on boiling water-bath for 50min. under N_2 flushing.

The sensitivity of this assay was greatly enhanced by 40 times comparing with that of Yagi's method (1976). In favour of the enhancement, this test could be measured by colorimetry or spectrophotometry with the sample size of 10-20μl serum.

The sensitivity and reproducibility were also improved by means of partial dehydration of the butanol extract with $(NH_4)_2SO_4$ salting-out. Serum TBA values of healthy human at different age groups were determined by this proposed method.

서 론

근래 생체내 지질의 과산화 현상이 노화및 여러가지 퇴행성 질병과 밀접한 관련이 있다고 하여 큰 관심의 대상이 되고 있다. 즉, 생체막 중의 불포화 지방산이 과산화되면 세포막의 구조적 변화및 기능적 결손이 일어나고 결국 세포 내지 조직의 파괴가 야기된다고 한다[1)2)3)]. 이러한 관심은 생체조직내에서 진행되는 과산화 현상의 측정법의 확립을 시급한 연구과제로 대두시켰다. 그리하여 생체내 지질 과산화의 최종생성물로 간

접수일자 : 1983. 12. 2.

주되는 lipofuscin 또는 ceroids의 형광측정법[4]과 동물 호기(呼氣)중의 hydrocarbon gases의 배출량의 정량[5] 등이 최근에 제안되고 있다.

그러나 이들보다도 유지식품의 과산화물 정량법으로 널리 쓰이던 2-thiobarbituric acid (TBA) 반응을 생체조직 중의 과산화물 측정수단으로 이용하려는 시도가 매우 활발하다[1)6)9)]. 요드적정법등 기타 기존의 과산화물 정량법들[10)14)]과는 달리 TBA법은 지질추출의 번잡한 과정이 요구되지 않으며 감도(sensitivity)가 높고, 또한 다른 방법들의 정량치와도 비례관계를 나타내기 때문이다[15]. 현재 비색법과 형광법이 쓰이는데, 특히 형광법은 미량분석법[7]으로 주목받고 있다.

TBA방법은 과산화지질에서 분해되어 나오는 소위 이차산물인 aldehydes (주로 malondialdehydes, MDA)와 TBA 사이의 발색반응을 이용한 간접적인 정량법이다. 생성된 적색 색소는 한 분자의 MDA가 두분자의 TBA 사이에 축합된 물질로 추정되고 있다[16]. 따라서 가수분해되어 MDA를 내는 tetraethoxypropane 또는 tetramethoxypropane이 표준물질로 사용되고 있으며, TBA 정량값을 통상 MDA nmole로 표기하고 있다[17].

그러나 지질 과산화물의 TBA발색반응에 대한 기전은 아직 명백히 밝혀지지 못한 실정으로 TBA 방법의 적용이나 결과해석에 많은 제한을 주고 있다. 또한 TBA는 MDA 이외의 수 많은 화합물과도 반응하여 적색[5)16)18)19)] 또는 황색[18)] 을 띰으로서 반응특이성이 매우 결여된다. 생체조직 중에는 이러한 방해물질들이 많이 함유되었으며, 특히 혈액중의 sialic acid, bilirubin, 포도당들이 그 대표적인 예이다. 시료나 용기중에 존재하는 철이온도 TBA반응에 매우 예민한 영향을 미치고 있다[20)23)]. 이러한 문제점들은 TBA정량법의 재현성을 결여시키고 있다. 그리하여 수 많은 수정법들이 고안되고 있으나 시료를 산성조건에서 가열한다는 점 이외에는 지질 과산화물의 TBA반응에 대한 최적조건은 아직 확립되지 못한 실정이다.

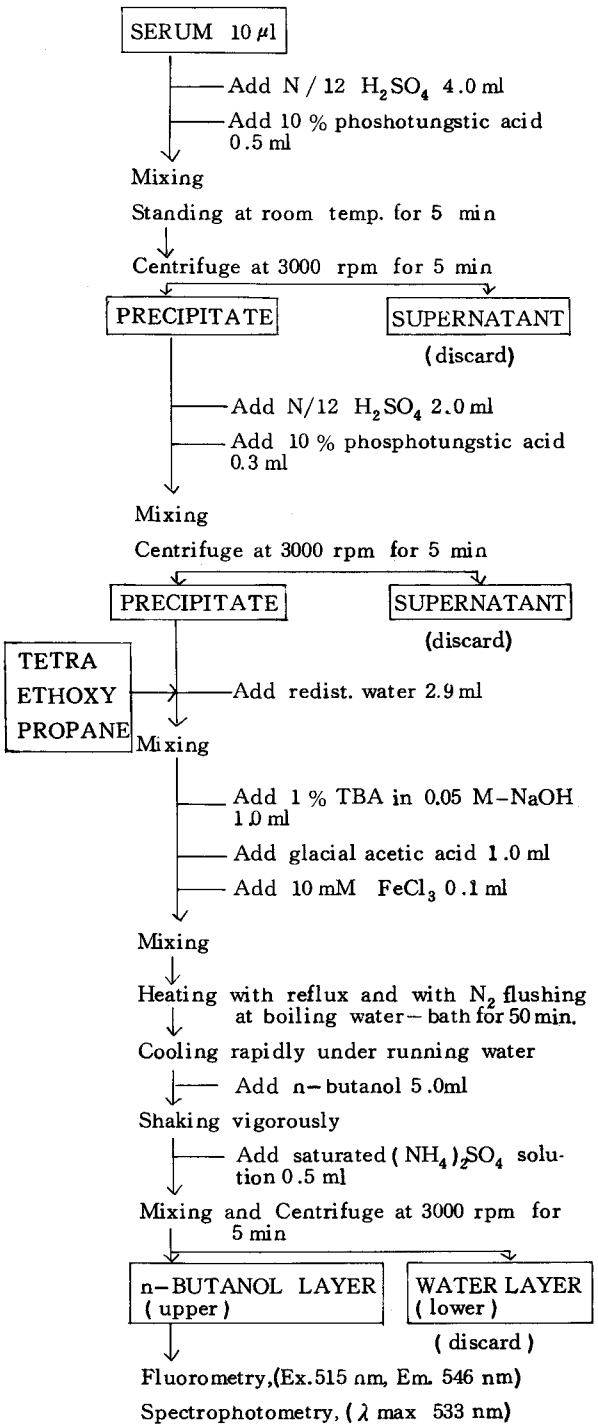
TBA반응의 기질이 되는 MDA가 과산화지질에서 분해되어 나오는 기전은 Dahle등[15]여러 연구자들[24)25)]에 의해 추정되고 있는데, 대부분의 MDA는 산성조건에서 TBA 반응이 진행되는 동안 분해되어 나오는 것으로 간주되고 있다. 그러므로 TBA반응의 속도는 MDA생성속도에 좌우된다고 할 수 있다. TBA와 지질hydroperoxides사이의 발색수율이 1nmol%미만[23]으로 매우 저조한 것은 MDA의 생성이 매우 지체되고 있음을 시사한다고 하겠다. 저자들은 무산소상태에서 $FeCl_3$가 혈청에 대한 TBA 반응의 발색정도를 현저히 증대시켰음을 보고한 바 있다[26]. 이러한 효과는 Fe^{3+}가 혈청중의 과산화물로 부터 MDA의 분해생성을 촉진하였기 때문인 것으로 추정되었다. 그리고 혈청같이 산화되지 않은 불포화지질이 공존하는 시료인 경우에는 무산소상태가 형성되어야만 TBA반응이 안정된 최고치에 도달하여 plateau를 유지할 수 있음을 보고하였다. 저자들은 이 결과를 이용하여 감도및 재현성이 개량된 혈청의 미량TBA정량법을 설정하게 되어 이에 보고하고저 한다.

실험 방법 및 재료

1) 재료

1, 1, 3, 3-Tetraethoxypropane (TEP, Tokyo Kasei)은 5mM 의 methanol 용액을 원액으로 하여 갈색병에 냉장하고, 이 원액을 5nmol/ml수용액으로 희석하여 사용하였다. 2-Thiobarbituric acid (TBA)는 Tokyo Kasei 제품을 재결정으로 정제 하였다. 즉 과량의 TBA를 끓는 증류수에 녹여 재빠르게 여과한후 냉장하여 결정을 만들었다. 흡인여과로 결정 TBA만을 얻은 다음 냉수 및 50% methanol로 세척하고 데시케이터안에서 건조시켰으며, 가능한 단시간내에 빛을 차단한 상태에서 행하였다. 정제된 TBA는 0.05M-NaOH를 용매로 한 0.1% 용액으로 만들어서 사용하였다. 빙초산은 한국동양화학제품을 MacInnes and Shedlovsky[42)]의 방법으로 처음엔 $KMnO_4$ (2g/100ml 빙초산), 두번째는 소량의 chromic oxid를 넣고, 세번째는 그대로 하여 3회 증류정제했으며, EP grade의 MERCK제품은 그대로 사용하였다. $FeCl_3$ (MERCK)는 10μmole/ml 수용액으로 갈색병에 매일 신제하였으며, $(NH_4)_2SO_4$ (Junsei)는 증류수에 포화시킨 후 여과하여 사용하였다. Phosphotungstic acid와 황산도 Junsei 제품을 사용하였다. 질소가스는 40%-NaOH에 녹인 약10%의 pyrogallol 용액과 $CaCl_2$관을 통과시켜 산소 및 수분을 제거한 후 유입시켰으며, 증류수는 이온교환 수지로 탈염한것에 $KMnO_4$를 소량 넣고 재증류한것을 사용하였다. 사용된 시험관은 ground joint가 달린 원심분리관 (18×130mm)이었으며 혈청침전 및 TBA 반응과정에서 내내 동일한 것을 사용하였다. TBA 반응시에는 반응액을 넣는 원심분리관과 냉각기(냉각관의 길이, 15~18cm)를 ground joint로 밀접시킨것 12셑을 동시에 rack으로 고정시킬수 있는 장치를 이용하였다. 흡광도는 Varian Techtron spectrophotometer로, 형광도는 Aminco-Bowman spec-

Diagram 1. Procedures of TBA test for the determination of serum TBA value.



trophotofluorometer로 측정하였다.

2) 방 법

TBA정량과정 중에서 혈청의 단백침전 전(前)처리 과정은 Yagi법[7]을 그대로 이용하고, TBA 반응및 반응생성물의 추출은 변형시킨 방법 (Diagram 1)으로 실시하였다. 이때 reagent blank측정도 병행하였다. 혈청 일정량을 N/12 $-H_2SO_4$ 4 ml를 미리 담은 원심분리관에 넣고 혼합한 다음, 0.5ml의 10%- phosphotungstic acid를 넣고 진탕하여 5분간 실온에 방치한다. 이것을 3000rpm에서 5분간 원심분리하였는데 과산화지질이 포함된 지질분획은 단백질과의 복합체로써 침전된다. 상등액을 살그머니 따라 버리고 침전물이 잔재하는 시험관에 다시 2ml의 N/12 H_2SO_4와 0.3ml의 10%- phosphotungstic acid를 넣고 혼합, 원심분리하여 상등액을 버림으로써 상등액중에 포함된 포도당, sialic acid등의 TBA 반응 방해물질을 제거한다. 원심분리관에 남은 침전물에 3ml의 증류수를 넣고 stopper를 한후 Vortex mixer에서 강하게 진탕하여 현탁시키고, 여기에 1ml TBA시약, 1ml 빙초산, 0.1ml의 $FeCl_3$용액을 가하여 TBA 반응을 시켰다. TBA반응시엔 반응혼합액이 담긴 원심관을 냉각기에 연결시킨다. 기다란 모세유리관을 냉각기 위로 부터 삽입시켜 반응액면상 1 cm위에 모세관 끝이 이르게 한다. 모세유리관에 연결된 고무관을 통해 정제된 질소가스를 시험관내로 약 3분간 미리 유입시킨다. 다음 이 시험관셑트를 끓는 수조(水槽)에 넣어 계속 질소를 유입시키면서 50분간 중탕한다. TEP는 사용액 일정량을 증류수에 넣고 곧 TBA반응을 혈청과 동일한 방법으로 시행하였다.

가열이 끝나면 모든 원심분리관을 동시에 유수중에서 실온으로 냉각 시켰다. 여기에 5.0ml씩의 butanol을 가하고 stopper를 한다음, 강하게 진탕하여 TBA 반응색소를 butanol층으로 추출하였다. 다음, 포화 $(NH_4)_2SO_4$수용액0.5ml를 넣고 stopper를 하여 혼합하고 3000rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 cuvette로 옮겨 형광도 및 흡광도를 측정하였다.

Yagi법[7]으로 TBA정량을 할 때에는 나사뚜껑이 달린 원심관 (18×130mm)에 혈청을 침전시켰다. TBA 반응시엔 혈청 단백침전물을 3ml의 증류수에 현탁시킨 다음 1% TBA (in 0.05 M-NaOH) 1ml, 빙초산 1ml만을 가하고 뚜껑을 닫은 상태에서 질소유입없이 끓은 물에서 60분간 중탕하였다. 이 외의 실험조작은 Diagram 1과 동일하였고 사용된 혈청량은 20μl이었

다. 따라서 Yagi 법을 일부 바꾸어서 실시한 셈이다.

결과 및 고찰

1) 가열 시간

혈청을 질소기류 밑에서 $FeCl_3$를 첨가하여 TBA반응시켰을 때 반응시간에 따라 생성된 적색물질의 농도의 변화는 Fig. 1과 같다. 끓는 물에서 중탕할때 가열시간 40~50분에 최고치에 도달하므로 가열시간을 50분으로 정하였다. 전보[26]에서 반응액을 120°C 의 유조(油槽)에서 비등시켰을 때는 최고치에 도달하는 반응시간이 30~50분으로 약간 단축되는 경향이고 모든 시험관 내부의 반응온도들이 완전 동일하다는 보장이 있다. 그러나 비등시 bumbing을 막기 위해 산소가 제거된 깨끗한 비등석이 요구되고 유조를 사용함에 따라 용기세척등 실험조작이 번잡해진다. 그리하여 가열방법으로서 끓는물 중탕을 택하였다.

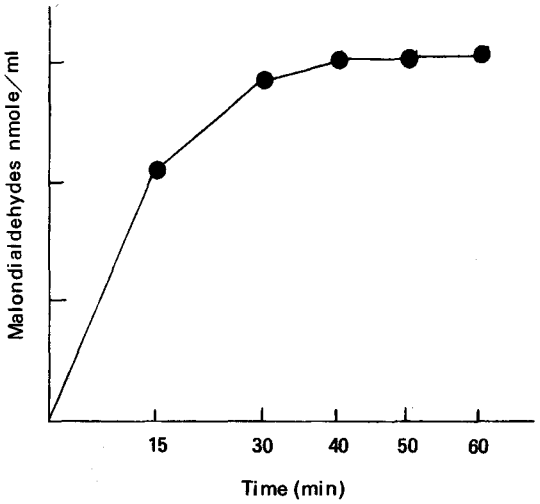


Fig. 1. Time course of TBA reaction with serum heated on boiling water-bath under N_2 atmosphere. One μmole of $FeCl_3$ was added to 10 μl of serum.

2) TEP의 검량곡선및 혈청에 대한 회수율

질소기류 밑에서 $FeCl_3$ 1 μmole을 첨가하여 TBA 반응을 시켰을 때 TEP의 농도에 따른 TBA 반응생성물의 형광도는 Fig. 2 와 같다. TEP 만을 반응시키거나 일정량의 혈청단백침전물에 TEP 를 첨가하여반응시킨 경우 모두에서 좋은 직선관계를 나타내었다. TEP 만을 반응시킨 경우 0~4.0nmole사이에서 매우 좋은 검량곡선을 얻었다. 혈청 10 μl를 사용하는 본 측정법에서 시

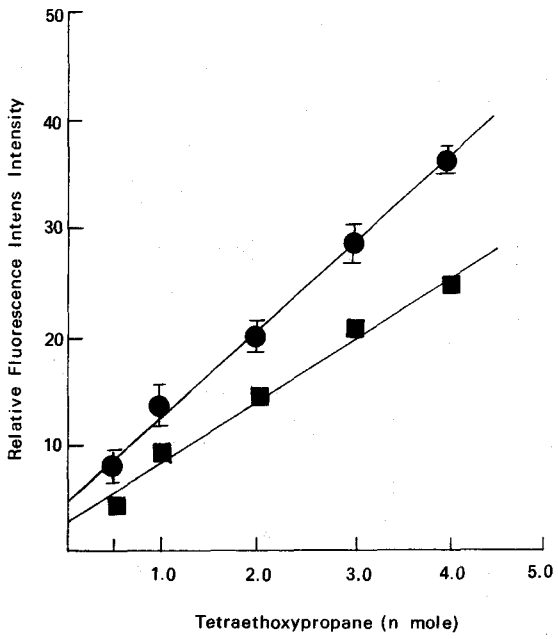


Fig. 2. Calibration curves of tetraethoxypropane (TEP) with and without serum precipitate.
TEP only, ●–●;
TEP with serum precipitate, ■ – ■.

료의 형광도는 대부분 TEP 2~3 nmole에 해당하는 형광도 사이에 속하였다.

TEP를 일정량의 혈청단백침전물에 첨가하여 반응시켰을 때도 역시 양호한 직선관계를 나타내었다. 그러나 TEP만을 반응시킨 경우보다는 전반적으로 낮은 형광도를 보였다. 이 들 형광도는 TEP와 혈청단백침전물이 합해진 전체 형광도에서 혈청단백침전물만의 형광도를 공제한 값이다. 이 때 TEP의 0.5~4.0nmole 범위에서의 회수율은 평균 73.1%로서 Table 1과 같다. 혈청지질단백질이 첨가된 경우도 TEP농도와 형광도사이엔 좋은 비례관계가 성립하지만, TEP의 회수율이 이렇게 저조한 결과는 Asakawa and Matsushita[27]의 보고와 일치한다. 그들은 순수한 불포화 지방산의 hydroperoxides에 산화되지 않은 불포화지방산이나 중성지방, 또는 단백질이 첨가되면 회수율이 50~70%로 감소한다고 하였다. 이것은 TEP나 TEP에서 유리된 MDA가 혈청단백질 중의 유리 아미노기와 Schiff's 염기를 만들어 결합함으로써[28][29], 또는 침전물중의 단백질이나 지질등에 용해되거나 둘러싸임으로써 TBA반응에 참여하지 못하기 때문인 것으로 추정할 수 있다.

혈청량에 따른 TBA반응 생성물의 비례적인 변화는

Table 1. Recovery of tetraethoxypropane (TEP) added to serum precipitate.

TEP (n mole)	Relative Fluorescence intensity		Recovery (%)
	TEP only	TEP with serum precipitate	
0	0	21.8	–
0.5	9.1	26.6	69.6
1.0	15.2	31.0	74.2
2.0	19.0	36.4	76.8
3.0	28.9	43.0	73.4
4.0	34.8	46.7	71.6
			73.1 ±2.4*

*Mean± SD

이미 전보[26]에서 보고하였다. 즉, 1 μmole의 $FeCl_3$를 넣는 경우엔 혈청량 0～15μl사이에서 비례관계가 성립된다. 따라서 본 TBA측정법의 적정시료량은 10μl 정도가 된다.

3) n-Butanol 추출액의 부분탈수가 형광측정에 미치는 효과

TBA반응생성물은 n-butanol로 추출되어 형광측정이 된다. 그러나 이 추출액은 수분이 포화된 상태여서 형광측정을 위한 cuvette로 옮기는 등의 조작에 의해 어느 추출액은 쉽게 혼탁되어진다. 이것은 butanol 층을 옮길 때 미량의 butanol이 기화하고 기화열이 소모됨에 따라 용액온도는 미미하나마 저하되며, 결국 butanol에의 물의 용해도가 감소되어 butonol층에 녹아 있던 수분의 일부가 석출되어 나오는데 기인한다. 이러한 혼탁은 비색이나 형광측정시 빛을 산란시켜 흡광도나 형광도를 감소시킨다. 그리고 혼탁의 정도에 따라서 빛 산란의 정도도 달라짐으로 결국 측정결과의 재현성을 방해하는 중요한 인자가 될 것이다. 본정량법에서는 butanol 추출층의 투명상태를 안전하게 유지하기 위해 $(NH_4)_2SO_4$ 포화수용액 0.5ml를 가하여 butanol 층의 수분을 일부 물층으로 끌어내림으로써 (염석효과) butanol층의 수분함량을 불포화상태로 만들었다. 이를 원심분리시킨 다음 형광측정을 하면 butanol층의 온도가 비록 저하하여도 Table 2에서와 같이 혼탁현상이 일어나지 않음을 볼 수 있다. 즉 TBA발색반응을 끝낸 동일한 반응액을 시험관에 5ml씩 나누어 넣고 5 ml 의 butanol로 추출한 다음, $(NH_4)_2SO_4$ 처리 없이 형광측정을 한 경우 3개의 시료중 2개가 혼탁되어 형광도

Table 2. Effect of partial dehydration of the butanol layer, containing TBA – MDA product, on the relative fluorescence intensity and on the volume of butanol extract.

Water content of butanol layer	Volume of butanol layer (ml)		Relative fluorescence intensity
	before extraction	after extraction	
Saturated	5.0	7.2	41.8[a]
	5.0	7.3	43.5[a]
	5.0	7.2	48.0
		7.2 ±0.05*	44.4 ±2.62*
Unsaturated by $(NH_4)_2SO_4$ salting-out	5.0	6.0	65.5
	5.0	6.0	64.6
	5.0	6.0	64.5
		6.0 ±0.0	64.9 ±0.45
			(53.8)[b]

*Mean ± SD

[a] Became turbid during transfusion into the cuvette for fluorometry.

[b] Relative fluorescence intensity if the volume is corrected to 7.2 ml.

가 혼탁되지 않은 나머지 1개의 시료보다 9.6～12.9%나 감소하였다 (48.0에서 43.5와 41.8로 저하됨). 그러나 $(NH_4)_2SO_4$로 처리한 경우에는 하나도 혼탁됨이 없어 형광도의 저하가 없다. 이때 CV (coefficients of variation)가 5.9%에서 0.7%로 낮아져 형광측정의 재현성이 매우 높아졌음을 알 수 있다.

형광도도 평균 46% (44.4에서 64.9로 증대)나 증대되었는데 이는 혼탁에 따른 빛산란에 의해 소실된 형광이 회복되었으며 동시에 수분함량의 감소에 따른 butanol층의 전체 부피의 감소로 TBA반응생성물이 농축되었기 때문이다. 또한, 수분함량의 감소로 인한 butanol용매의 투전상수, 즉 극성의 저하로 형광의 양자수율이 증가된 것도 형광도 증강에 관여한 것으로 보인다. Table 2에서 보면 추출후의 부피를 모두 7.2ml로 보정하여도 형광도는 44.4에서 53.8로 20%나 증가했음을 알수 있다. 그러므로 butanol층의 부분탈수조작은 형광측정의 재현성을 높이고 감도를 높혀주는 좋은 효과를 나타내고 있다. Yoshida등[30]도 형광측정중 butanol층의 혼탁을 방지하기 위해 추출액을 빙수속에서 10분간 냉각시킨 다음 원심분리하여 실온에서 butanol층의 물의 불포화상태를 꾀한 바 있다.

Butanol추출액은 실온에 방치되면 점차로 황색으로 변한다. Sinnhuber등[16]도 TBA반응색소가 비극성용매에서 소실됨을 관찰한 바 있다. 그러므로 butanol로 추출한 다음에는 즉시 형광측정을 해야한다. Butanol로 추출하기 전의 수용액상태에서는 TBA반응색소는 비교적 안정하였으며 특히 냉장상태에서는 장시간 안정하게 보존되었다.

Table 3. Efect of the purification of TBA and acetic acid on the relative fluorescence intensity of the reagent blank for TBA test.

Reagent	Sources		Relative fluorescence intensity of reagent blank
TBA	Tokyo Kasei Chem. Ind., Japan	—	4.5
		Purified	1.9
Glacial acetic acid	Dongyang chem. co., Korea	—	7.3
		Purified	1.9
	MERCK, W. Germany (E.P. grade)	—	1.6

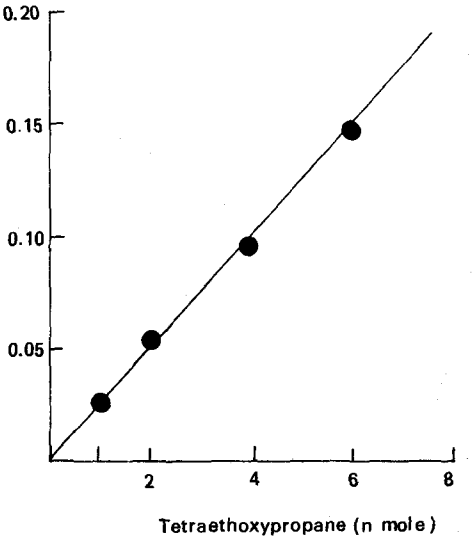


Fig. 3. Calibration curve of tetraethoxypropane by spectrophotometry.

4) 시약의 순도가 TBA정량에 미치는 영향

TBA시약에 섞여 있는 TBA의 산화물이 적색을 띠기도 하고[31], TBA가 산화적 분해를 일으키어 H_2S가 유리된 barbituric acid는 MDA와 반응하여 λmax 485 nm인 물질을 냄으로[5] MDA 또는 TEP의 회수율을 저하시킨다. 시판의 TBA시약을 재결정으로 정제한 것은 정제하지 않은 것에 비해 Table 3에서와 같이 reagent blank의 형광도가 4.5에서 1.9로 현저히 감소하였다 (1.0nmole TEP의 TBA 반응생성물의형광도가 33.1이었다). Takano등[32]도 사용한 TBA의 제품에 따라 reagent blank의 형광도가 매우 다를 뿐 아니라 사용이 불가능할 정도로 매우 높게 나타나는 것도 있었다고 보고하였다. 그러므로 TBA시약은 반드시 재결정을 통한 정제를 하여 순수한 것을 사용함이 필수적이라고 할 수 있다.

혈청의 TBA반응에서 사용되는 빙초산은 다른 산들보다 반응진행의 우월 및 sialic acid의 방해를 억제하는 등의 이점이[33] 있다. 그러나 미량의 어떤 불순물이 TBA와 반응하여 적색을 나타낼 수도 있다. 그리하여 국산의 화학분석용 빙초산을 3회 증류로써 정제하였던 바, Table 3에서와 같이 reagent blank의 형광도가 7.3에서 1.9로 현저히 감소되었다. 독일제 EP급 MERCK 제품은 그대로 사용하여도 reagent blank값이 1.6을

Table 4. Spectrophotometric determination of plasma TBA value in the proposed assay.

Plasma tested (μl)		$FeCl_3$ added (μmole)	Spectrophotometry		Fluorometry	
			Absorbance	MDA (nmole/ml)	Relative fluorescence intensity	MDA (nmole/ml)
Plasma a	10	1.0	0.072	283.6	23.5	257.8
	15	1.5	0.110	288.9	36.0	263.3
	20	2.0	0.143	281.7	47.9	262.8
Plasma b	10	1.0	0.061	240.3	20.2	221.6
	15	1.5	0.094	246.9	31.1	227.5
	20	2.0	0.125	246.2	43.0	235.6

나타냈다. 그러므로 빙초산도 순도가 좋은 분석급의 것을 선택하거나 특별히 정제하여 사용하여야 하겠다.

5) 비색에 의한 혈청의 TBA정량

미량의 혈청을 사용하는 Yagi 법등에서는 TBA 반응의 발색을 육안으로는 거의 감지할 수 없다. 그러나 $FeCl_3$의 첨가로 발색도가 40여배 증가된 본 정량법에서는 10μl의 혈청시료에서도 발색여부및 색의 농담도 쉽게 식별할 수 있다. 이는 TBA 반응생성물의 정량을 형광측정뿐 아니라 비색으로도 가능하게 한다. Table 5는 혈장 10μl당 $FeCl_3$ 1μmole을 가하여 TBA반응을 시킨 후 비색 및 형광법으로 정량한 결과이다. 이 때 사용된 TEP농도와 흡광도사이의 검량곡선은 Fig. 3과 같이 6nmoles까지에서 매우 좋은 직선관계를 보였다. 두 종류의 혈장에서 모두 측정된 혈장량과 흡광도의 관계가 매우 비례적이었으며 MDA nmole/ml로 나타낸 TBA값은 거의 같게 나왔다. 그리고 형광법에 의한 TBA값과 비교하면 두 혈장에서 모두 약 10%정도 높게 나왔는데 이는 비색정량이 형광측정보다 특이성(specificity)이 결여되기 때문인 것으로 사료된다. 비색정량시 사용될 혈청량은 10μl로도 가능하지만 15~20μl를 사용하되 $FeCl_3$ 량을 비례적으로 더 넣어 주면 흡광도가 증가되어(0.1~0.15) 비색측정의 타당성이 커질 것이다. 이러한 Table 4의 결과는 또한 $FeCl_3$ 요구량은 혈청량에 비례적일 것이라는 전보[26]의 추정을 확인시킨 셈이다. 즉, $FeCl_3$ 첨가량을 1μmole 로 고정시켰을 때 혈청량과 TBA 반응생성물의 농도사이엔 혈청량 0~15μl까지에서만 직선관계를 보이고 20μl이상에서는 직선상보다 낮은 농도를 보였었다. 그러나 $FeCl_3$ 를 혈청 10μl당 1μmole씩 넣어 TBA반응을 시킨 Table 4에서는 혈청 20μl에 2μmole의 $FeCl_3$

Table 5. Comparison of serum TBA values determined by the proposed and Yagi's methods in parallel.

Serum	TBA value (MDA nmole/ml)**	
	Proposed method	Yagi's method
a	266.6 ±14.7*	6.40 ±1.67*
b	254.9 ±33.3	6.63 ±1.16
c	219.6 ± 6.7	5.79 ±0.83
d	321.0 ±11.7	6.98 ±3.61
e	248.1 ±16.7	4.70 ±0.22
f	201.8 ±20.8	3.56 ±0.83
g	191.8 ± 9.2	2.60 ±0.60
h	175.0 ± 0.50	4.10 ±0.37
i	204.1 ± 8.2	2.82 ±0.35
j	218.4 ±16.4	3.87 ±1.45

*Mean± SD of triplicate determinations

**Correlation coefficient(r) between two methods was 0.8166($p < 0.01$).

를 넣으면 그 TBA 반응 생성물의 농도가 혈청 10μl의 TBA 반응생성물의 농도와 같은 비례직선상에 있음을 볼 수 있다.

6) Yagi 법에 의한 TBA 값과의 비교

Table 5는 10개 혈청의 TBA값을 본 법과 Yagi 법으로 동시에 3번 반복 측정하여 비교해 놓은 것이다. 두 정량값 사이엔 상관계수 $r = 0.8166$($P < 0.01$)로서 비교적 높은 상관관계를 나타내고 있다. 그런데 MDA nmole/ml로 표시된 TBA값이 본정량법에서 Yagi 법에서보다 평균 43.3배 (37.9~52.7배) 나 높게 나왔

Table 6. Serum TBA values of healthy subjects at four age groups

Age group	Average age	Number of case	TBA value (MDA nmole/ml)		
			Mean	SD	SE
20–27	22.4 ±2.6 *	14 (M 8, F 6)	279.3 [a]	54.6	14.6
35–45	39.4 ±3.7	10 (M 7, F 3)	324.0 [b]	54.9	17.4
50–65	59.6 ±6.3	9 (M 5, F 4)	394.1 [c]	68.2	22.7
70–	74.1 ±4.3	7 (M 2, F 5)	437.1 [d]	75.4	28.6

* Mean±SD

abcd Significances of the differences between a and b, b and c, and c and d were $p < 0.1$, $p < 0.05$, and $p < 0.1$, respectively.

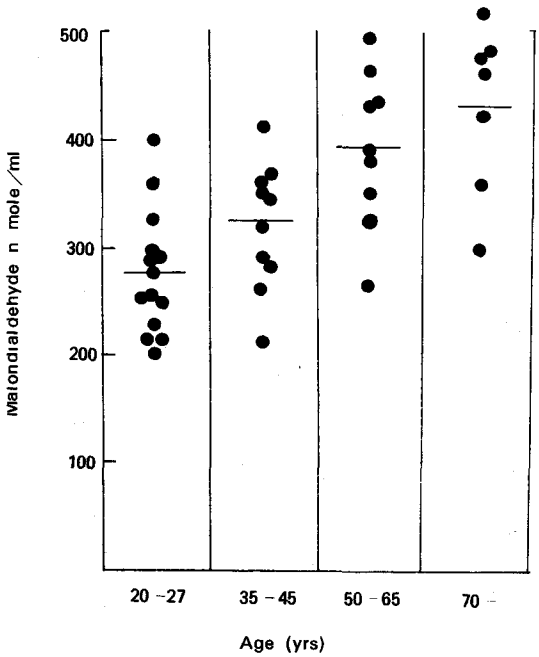


Fig. 4. Distribution of serum TBA values of healthy subjects at different age groups.

다. 이러한 증대현상은 혐기조건에서 첨가된 $FeCl_3$ 의 촉매작용에 기인하는 것으로 이미 전보[26]에서 자세히 토의된 바 있다. 즉 Yagi법에서는 MDA를 비롯한 TBA chromogen (발색유발물질) 을 생성할 기회를 놓친 전구물질들이 본정량법에서는 $FeCl_3$에 의해 쉽게 분해되어 TBA chromogen을 생성함으로써 TBA와 발색반응을 할 수 있었기 때문인 것으로 추정된다. 특히 혈청지질분획의 불포화지방산으로서는 linoleic acid가 주된 성분이 되는데[34], linoleic acid의 hydroperoxide 는 Yagi 법등 기존의 TBA 반응 조건에서는 거의 발색하지 않았다고 한다[15)35]. Kenaston등[43]은 과산화수준이 같은 linoleic acid와 linolenic acid를 TBA반응시켰더니 linoleic acid의 적색생성율은 linolenic acid의 1/60～1/100 정도에 불과하였다고 보고하였다. 여기에 철이온이 첨가되었을 때 linoleic acid의 과산화물이 다른 불포화지방산의 과산화물과 같은 수준으로[23)27)] TBA 발색율이 증가됨으로써 결국 혈청의 TBA값이 Table 5에서 처럼 증대된 것으로 생각할 수 있다. Linoleic acid hydroperoxide의 TBA발색도는 pH에 의해서도 좌우된다는 보고[36]가 있는데 본 정량법과 Yagi법의 TBA반응용액의 pH는 모두 2부근으로서 동일하다.

혈청단백침전물에 존재하는 산화되지 않은 지질이나 단백질, 아미노산등은 무산소상태에서는 $FeCl_3$가 첨가되어도 TBA chromogen의 생성에 중요한 기여는 하지 않는 것 같다[26]. 그러나 혈청단백에 존재하는 지질과산화물 이외의 다른 과산화물은 $FeCl_3$에 의해 TBA 발색반응이 증대되어 이 높은 혈청TBA값에 포함되었을 가능성이 있다. 과연 이 중 몇 퍼센트가 되는가하는 문제는 계속 추궁되어야 할 것이다. 최근 Shimizu[37]등은 prostaglandin의 전구물질인 endoperoxide가 MDA를 생성하여 Yagi 법에 의한 혈청TBA값의 50%를 차지한다고 보고 한 바 있다.

두 방법에 의한 혈청 TBA값은 모두 3번 반복한것의 평균으로서 이 때의 CV는 본정량법에서 평균 4.40%, Yagi 법에서 평균 22.8%이었다. Yagi 법보다 본정량법의 재현성이 월등 양호하다고 하겠다.

7) 혈청TBA 값의 연령증가에 따른 변화

본정량법으로 건강인의 혈청TBA 값을 2회 반복 측정하여 그 평균치를 4개의 연령군으로 구분한 결과는 Fig. 4 및 Table 6과 같다. 같은 연령군에서도 TBA 값은 다양하게 나타나고 있으나 대체로 높은 연령군일수록 혈청 TBA 값이 상승하는 경향을 보이고 있다. Yagi법등 기존의 방법으로 측정한 혈청TBA 값도 연령증가와 함께 증가하는 것으로 보고되고 있는데, 70세를 전후한 연령이상에서는 다시 감소한다는 보고가 많다[32)38)39)] 그러나 본 측정법에 의해서는 시료의 수가 충분하지는 못하지만 70세 이상의 고령군에서 혈청 TBA 값이 다른 연령군들 보다 가장 높아 계속 증가현상을 보였다. 흰쥐를 대상으로 실시한 호기(呼氣) 중의 hydrocarbon gases 측정에 의해서는 생체내 지질 과산화 현상이 고령(32개월된 흰쥐)에서도 계속 증가현상을 보였다고 한다[41)]. 같은 시료를 Yagi 법으로 동시에 측정한 TBA 값은 가령과 함께 증가하다가 32개월에서는 감소된 수치를 보였다고 한다.

Yagi법등 기존방법으로 측정된 낮은 수치의 혈청 TBA 값의 연령증가에 따른 변화경향, 특히 고령에서 다시 감소한다는 경향은 혈청 철(Fe) 농도나 혈중 헤모글로빈농도가 노령에서 저하한다[44)]는 점과 일치하고 있다. 이 것은 철을 첨가하는 않는 기존방법에서 혈청에 존재하는 60~150 μg/100ml의 철이온이 혈청의 TBA발색에 중요한 영향을 미치고 있음을 암시한다고 할 수 있다. 철이 미량으로도 TBA반응에 예민한 영향을 주어 혈청 1ml당 50~100ng의 철이온을 첨가함으로써 TBA값이 2배로 증가된 예를 전보에서 이미 논의한바 있다. 그러므로 고령층에서 나타나는 기존방법에 의한 혈청 TBA값의 저하는 혈청중의 철농도의 감소에 기인한다고 추측할 수 있겠다. 이러한 점들로 미루어 $FeCl_3$를 따로 첨가하는 본 측정법은 혈청의 과산화물로 부터 쉽게 TBA chromogen을 발생시킴으로써 충분히 큰 TBA값을 주며 고령층에서도 혈청 TBA 값이 계속 증가한 것으로 사료된다.

요 약

혐기적 조건밑에서 $FeCl_3$에 의해 촉진된 TBA 반응을 이용하여 혈청중 과산화물 측정을 위한 새로운미량분석법을 설정하였다. 즉, 혈청단백침전물이 현탁된 TBA반응혼합액에 혈청 10 μl당 1.0 μmole의 $FeCl_3$를 첨가한 다음 질소기류밑에서 50분간 끓는 물에 중탕한다.

이 분석법의 반응 예민도는 현행 일반 TBA법보다 40여배나 증대되었으며 따라서 미량의 시료(10~20 μl)로도 TBA반응생성물의 농도 측정이 비색법으로도 가능하였다. 그리고 TBA반응생성물의 butanol 추출액을 $(NH_4)_2SO_4$염석으로 부분탈수시킴으로써 예민성 및 재현성이 개선될 수 있었다. 이 분석법을 이용하여 측정한 건강인들의 혈청 TBA값은 높은 연령군일수록 증가하는 경향을 보였다.

REFERENCES

1) Barber, A.A. and Bernheim, F.: *Adv. Gerontol. Res. 2 : 355, 1967.*
2) Tappel, A. L.:*Fed. proc. 32 :1870, 1973.*
3) Yagi, K., editor :*Saishin Igaku, 33(3) : 653, 1978.*
4) Tappel, A.L., Fletcher, B. and Deamer, D. :*Jr. Gerontology 28(4) : 415, 1973.*
5) Tappel, A.L.: *Annals New York Academy Sci. 355 : 18, 1980.*
6) Stocks, J., Offerman, E.L., Modell, C.B. and Dormandy, T.C.: *Brit. Jr. Haematol. 23 : 713, 1972.*
7) Yagi, K.: *Biochem. Med. 15 : 212, 1976.*
8) Uchiyama, M. and Mihara, M.: *Analyt. Biochem. 86 : 271, 1978.*
9) Nishigaki, I., Hagihara, M., Tsunekawa, H., Maseki, M. and Yagi, K.:*Biochem. Med. 25 : 373, 1981.*
10) Wheeler, D.H.: *Oil and Soap 9 : 89, 1932.*
11) O'Connor, R.T.: *Jr. Am. Oil Chem. Soc. 32 : 628, 1955.*
12) Diluzio, N.R.: *Fed. Proc. 32 : 1875, 1973.*
13) Glavind, J. and Hartmann, S.: *Acta Chem. Scand. 9 : 497, 1955.*
14) Stein, R.A. and Slawson, V.: *Analyt. Chem. 35 (8) : 1008, 1963.*
15) Dahle, L.K., Hill, E.G. and Holman, R.T.: *Arch. Biochem. Biophys. 98 : 253, 1962.*
16) Sinnhuber, R.O., Yu, T.C. and Chang, T.C.:*Food Res. 23 : 626, 1958.*
17) Sinnhuber, R.O. and Yu, T.C.: *Food Technol. 12 : 9, 1958.*
18) Matsushita, S.: *Aiyo and Shockuyro 34: 523 1981.*
19) Gutteridge, J.M.C.: *FEBS Lett 105 : 278, 1979.*
20) Kellogg, E.W. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem. 250 : 8812, 1975.*

21) Wills, E.W.: *Biochim. Biophys. Acta, 84:475,1964.*

22) Castell, C.H. and Boyce, G.A.: *J. Fishery Res. Bull. Canada, 23: 1587, 1966.*

23) Asakawa, T. and Matsushita, S.: *Lipids, 14: 401, 1979.*

24) Porter, N.A., Nixon, J. and Isaac, R.: *Biochem. Biophys. Acta, 441(1): 506, 1976.*

25) Pryor, W.A., Stanley, J.P. and Blair, E.: *Lipids 11: 370, 1976.*

26) Lee, J.W., Mo S. and Lee, T.Y.: *Korean Biochem. J., 16(4): 348, 1983.*

27) Asakawa, T. and Matsushita, S.: *Agric.Biol. chem. 45(2): 453, 1981.*

28) Ambe, K.S. and Tappel, A.L.: *Jr. Food Sci. 26 : 448, 1961.*

29) Chio, K.S. and Tappel, A.L.: *Biochemistry 8 (7): 2821, 1969.*

30) Yoshida, K., Kaku, H. and Wago, K.: *Rinsho Gagaku 7(1): 86, 1978.*

31) Gutteridge, J.M.C. and Tickner, T.R.: *Analyt. Biochem. 91: 250, 1978.*

32) Takano. E., Hishimoto, T., Idei, K., Yoshimura. S., Koide, M. and Akazawa, Y.: *Iryo 32: 989, 1978.*

33) Ohishi, N.: *Saishin Igaku 33: 660, 1978.*

34) Nishigaki, I., Ozawa, T. and Yagi, K.: *Vitamins (japan) 38(5): 359, 1968.*

35) Sinnhuber, R.O. and Yu, T.C.: *Yukagaku 26 (5): 1, 1977.*

36) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: *J. Lipid Res. 19: 1053, 1978.*

37) Shimizu, T., Kondo, K., and Hayaishi, O.: *Arch. Biochem. Biophys. 206(2): 271, 1981.*

38) Akazawa, Y., Koide, M., Hayakawa, M., Azuma, Y., Oishi, M., Hishimoto, T., Takano, E. and Takayasu, M.: *Iryo 33(3): 253, 1979.*

39) Funasako, M., Uezu, A., Okamoto, Y., Sakagami, Y., Tanimoto, Y., Ohta, K., Ohata, M. and Fujita, T.: *J. Jpn. Geriatric. Med. 15: 347, 1978.*

40) Matsuoka, Y., Tsujii, T., Kubota, C. and Okuno, Y.: *Rinsho Byori, 25: 935, 1977.*

41) Sagai, M. and Ichinose, T.: *Life Sci. 27(9): 731, 1980.*

42) MacInnes, D.A. and Shedlovsky, T.: *J. Am. Chem. Soc. 54: 1429, 1932.*

43) Kenaston, C.B., Wilbur, K.M., Ottolenghi, A. and Bernheim, F.: *J. Am. Oil Chem. Soc. 32:33, 1955.*

44) Lynch, S.R., Finch, C.A., Monsen, E.R. and Cook, J.D.: *Am. J. Clin. Nutr. 36: 1032, 1982.*