

## Pyruvic Acid의 분광학적 정량법에 관한 연구

최윤수 · 조경열 · 석경순

효성여자대학교 약학대학

(Received March 5, 1985)

### A Study on the Spectrophotometric Analysis of Pyruvic Acid

Yoon Su Choi, Kyung Yul Jo and Kyung Soon Seok

Department of Pharmacy, Hyosung Women's University, Daegu 634, Korea

**Abstract**—A colorimetric determination method of pyruvic acid using hydroxylamine was studied. Hydroxylamine was reacted with pyruvic acid to form complex compound in the presence of Cu(II) ion. Optimal conditions for the quantitative analysis were investigated and the structure of complex was examined spectrometrically. The molar ratio (2:1) and the stability constant ( $1.88 \times 10^4$ ) of the complex were measured. It was the characteristic feature of this method that the commonly encountered interfering substances such as fructose, glucose and lactic acid do not influence the measurement of pyruvic acid.

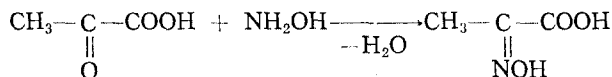
$\alpha$ -keto산의 일종인 pyruvic acid는 생체내 당의 중간대사 산물이며 간이나 근육 transaminase의 활성의 지표로서 그 임상학적인 가치가 대단히 큰 물질이다.

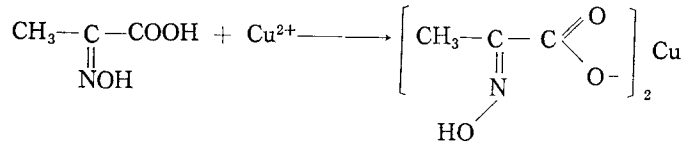
현재까지 보고된 pyruvic acid의 정량법으로는 1899년 Bamberger<sup>1)</sup>와 Hyde<sup>2)</sup>가 pyruvic acid의 4-nitrophenylhydrazine 유도체를 처음 보고한 이래 이를 이용하여 1913년 Dakin<sup>3)</sup>과 Dudley<sup>4)</sup>가 pyruvic acid의 정량법을 고안했고 1939년 이후에는 2,4-dinitrophenylhydrazine을 사용한 정량법들이<sup>5-11)</sup> 보고되었으며 동 시약을 사용하여 간접적으로 생체내 transaminase 활성을 측정한 Reitman-Frankel 법<sup>12)</sup>이 1957년 보고되었다.

phenylhydrazine유도체를 이용한 분광학적인 정량법들은 현재까지도 널리 이용<sup>13-15)</sup>되고 있으며 특히 1970년대 후반부터는 chromatography를 이용한 방법들<sup>16-19)</sup>이 보고되면서 pyruvic acid의 2,4-dinitrophenylhydrazine 유도체를 GC<sup>20-21)</sup>, HPLC<sup>22-23)</sup> 등으로 분리정량하는 보고들이 다수 보고되었다. 그외에도 N-methylnicotinamide 유도체<sup>24)</sup>, *o*-phenylenediamine 유도체<sup>25-27)</sup>, *o*-phenylfluorophenylhyazine 유도체<sup>28-29)</sup>들의 GC, HPLC 및 NAD나 NADPH 효소를 이용한 fluorometry<sup>30-31)</sup>도 보고되었다.

저자들은 phenylhydrazone 유도체를 이용한 분광학적 정량법에서 나타나는 공시험액 자체의 정색 및 반응시간의 영향, 생성된 phenylhydrazone 유도체의 경시변화, 일반 keto화합물에 의한 방해작용등의 결점을 보완하고 신속하게 정량할 수 있는 조건들을 검토하기 위하여 착화합물의 형성에 의한 pyruvic acid의 정량을 시도하였다.

본 실험에서는 먼저 pyruvic acid를 hydroxylamine과 반응시켜 ketoxime을 만들고 다시 금속 ion과 작용시켜서 각종 금속착화합물을 합성하였다. 그 반응과정은 다음과 같다.





여기서 Cr(Ⅲ)화합물(赤褐), Ni(Ⅱ)화합물(帶褐), Cu(Ⅱ)화합물(靑), Fe(Ⅱ, Ⅲ)화합물(黃), Co(Ⅱ)화합물(赤褐)등이 각각 생성되었으나 그 중에서 Cu(Ⅱ)화합물이 그 정색도가 가장 현저하였으므로 이를 이용하여 pyruvic acid의 정량법을 고안하고 피정량물질인 Cu(Ⅱ)화합물의 구조를 추정하였다.

### 실 험 방 법

시약—본 실험에 사용된 시약은 pyruvic acid,  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KOH}$  등으로 모두 Wako 제 특급품을 사용하였고 물은 정제수를 사용하였다.

기기—본 실험에 사용한 기기는 다음과 같다. pH meter: TOA HM-18E type, Thermomicroscope: Reichert thermovar Kofler type, UV-vis spectrophotometer: Pye unicam sp 8-100 type, IR spectrophotometer: Beckman AccuLab<sup>T.M</sup> 4 type, NMR spectrometer: Varian EM 360L type, A.A spectrophotometer: Pye unicam sp 1900 type, Elemental analysis: 한국과학기술연구소에 의뢰.

반응조작 및 검량선 작성—0.05M pyruvic acid 시료액 일정량을 정확히 취하여 시험관에 넣고 14%  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 액 1.5ml와 1.6%  $\text{CuSO}_4$  용액 1ml를 가한 후 2N-KOH 1ml 및 정제수를 가하여 전량이 10ml가 되게 하여 (pH 5.7) 약 2분간 실온에서 진탕 후 공시험액을 대조액으로 하여 흡광도를 측정하였다.

착화합물의 분리—미리  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  10g의 포화 수용액에 pyruvic acid 약 8.8g을 넣어 생성된 백색의 ketoxime 침전을 정제수로 수회 세척하고 EtOH 용매 중에서 재결정하였다. 이 결정 1g을 정제수 50ml에 용해시켜 0.2M- $\text{CuSO}_4$ 액 20ml를 가하면 이반응액의 pH에서는 청색의 침전이 생성한다. 이 침전을 정제수로 수회세척하고 80°C 항온에서 5hr 건조하여 얻은 청색화합물과 그 일부를 다시 150°C에서 3hr 더 건조하여 형성된 녹색화합물에 대해 UV-Vis, IR, NMR, AA의 spectrum을 측정하였다.

착화합물의 안정도 정수—Job의 변법<sup>32)</sup>으로 착화합물의 안정도 정수를 구하였다. 계산에 이용한 식은 다음과 같다.

$$K = \frac{\text{MKe}}{[\text{C}_{m1} - \text{MKe}] \cdot [\text{C}_{ke1} - \text{MKe}]} = \frac{\text{MKe}}{[\text{C}_{m2} - \text{MKe}] \cdot [\text{C}_{ke2} - \text{MKe}]}$$

MKe ; complex concentration

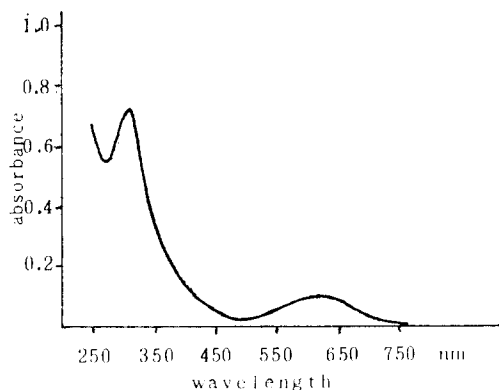
$\text{C}_{m1}, \text{C}_{m2}$  ; metal ion concentration

$\text{C}_{ke1}, \text{C}_{ke2}$  ; reagent concentration

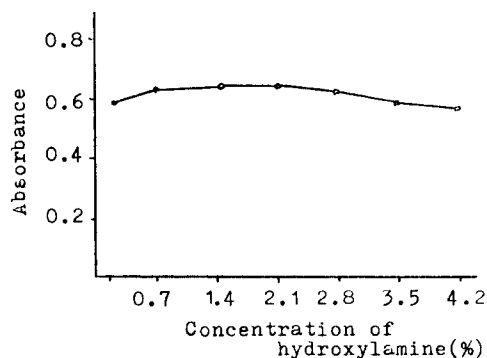
### 실 험 결 과 및 고 찰

UV-Vis 흡수극대—반응조작에 따른 반응액의 UV흡수극대 파장을 Fig.1에 나타내었다. 반응액의  $\lambda_{\text{max}}$ 는 600nm 및 327nm 였으며 대조액의 흡수로 인한 영향은 없었다.

Hydroxylamine 농도의 영향—pyruvic acid  $5.0 \times 10^{-3}\text{M}$  용액에 대해 hydroxylamine의 농도를 변화시켜 그 흡광도를 측정한 결과를 Fig.2에 나타내었다.



**Fig. 1**—Absorption spectrum of complex compound.  
 $\text{pH}=5.7$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]=0.06\%$ ,  $[\text{Hy}]=2.1\%$ ,  
 $[\text{Py}]=5.0 \times 10^{-4}\text{M}$



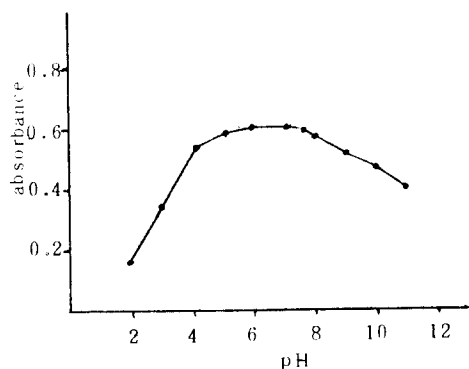
**Fig. 2**—Effect of hydroxylamine concentration on the absorbance of complex compound.  
 $\lambda_{\text{max}}=600\text{nm}$ ,  $[\text{Py}]=5.0 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]=0.06\%$ ,  $[\text{Hy}]=2.1\%$

hydroxylamine의 농도가 1.4~2.1%일 때가 가장 예민하게 반응하며 이보다 높거나 낮은 농도에서는 흡광도가 감소하였다.

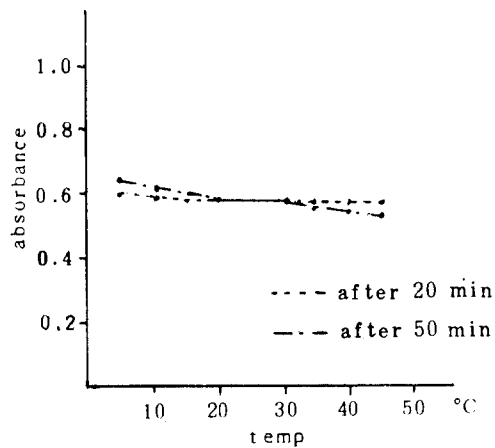
**Cu(II)농도의 영향**—pyruvic acid  $5.0 \times 10^{-3}\text{M}$  용액에 대해 Cu(II)의 농도를 변화시켜 본 결과 Cu(II)의 농도가 0.06%까지는 흡광도가 다소 증가하나 그 이상의 농도에서는 흡광도에 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

**pH의 영향**—반응액의 pH를 각각 2~9가 되도록 조절하여 본 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

pH 5~7 범위 내에서는 흡광도의 변화가 거의 없으며 pH 3 이하에서는 청색의 착화합물이 침



**Fig. 3**—Effect of pH on the absorbance of complex compound.  
 $\lambda_{\text{max}}=600\text{nm}$ ,  $[\text{Py}]=5.0 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]=0.06\%$ ,  $[\text{Hy}]=1.05\%$



**Fig. 4**—Effect of reaction temperature on the absorbance of complex compound.  
 $\lambda_{\text{max}}=600\text{nm}$ ,  $[\text{Py}]=5.0 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]=0.06\%$ ,  $[\text{Hy}]=2.1\%$

전하였고 pH 8 이상에서는 흡수극대의 이동 및 hydroxylamine과 Cu(II)와의 화합물로 인정된 황색물질이 생성되어 정색에 영향을 미쳤다.

**반응온도의 영향**—반응액의 온도를 변화시켜 본 결과 15°C~30°C내에서는 정색에 아무런 영향이 없었으며 15°C 이하와 30°C 이상에서는 흡광도가 다소 변화하나 반응액이 상온으로 되면서 15°C~30°C에서 측정된 흡광도로 복귀됨을 보아 이는 착화합물의 안정성이 온도의 영향을 받는 것으로 사료된다(Fig. 4).

**반응시간의 영향 및 경시변화**—착화합물의 형성에 소요되는 시간을 측정해 본 결과 본 반응은 각 시약을 첨가 후 약 1분간의 진탕으로 반응이 거의 완결되었다. 이는 pyruvic acid의 keto기 활성이 인접 carboxyl group으로 인해 상당히 증가되어서 NH<sub>2</sub>OH의 친핵공격이 신속해진 까닭으로 사료된다. 또한 반응 종료 후 흡광도의 경시변화를 120min까지 측정하였던 바 본 물질은 반응 후 비교적 안정한 화합물인 것으로 생각된다.

**착화합물의 조성비**—Pyruvic acid와 Cu(II)의 결합비율을 slope method와 연속변화법으로 측정하여 Fig. 5, Fig. 6에 각각 나타내었다.

이 결과로 미루어 pyruvic acid와 hydroxylamine이 반응한 ketoxime과 Cu(II)의 결합비율은 2:1임을 알 수 있었다.

**착화합물의 안정도 정수**—흡광도가 같고 Cu(II)와 pyruvic acid의 농도가 다른 두 반응액에서 생성된 착화합물의 농도로 부터 안정도 정수를 산출한 결과  $1.88 \times 10^4$ 이었다.

**착화합물의 구조**—결합비율 및 UV-Vis, IR, NMR spectrum과 A.A, N-원소분석 자료들을 종합하여 착화합물의 구조를 추정하였다.

1) ketoxime—UV  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  nm (log $\epsilon$ ): 208 (3.93), IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3250~3050(OH  $\nu$ ), 2900(CH<sub>3</sub>  $\nu$ ), 1700(COOH의 C=O  $\nu$ ), 1690(C=N  $\nu$ ), 1460(CH<sub>3</sub>  $\delta$ ), 1415, 910(COOH의 OH $\delta$ ), NMR (20%

soln. in DMSO-do) $\tau$ : 8.11(-CH<sub>3</sub>), -0.3(=N-OH,  $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \end{matrix}$ ), m.p.; 178°C 부근.

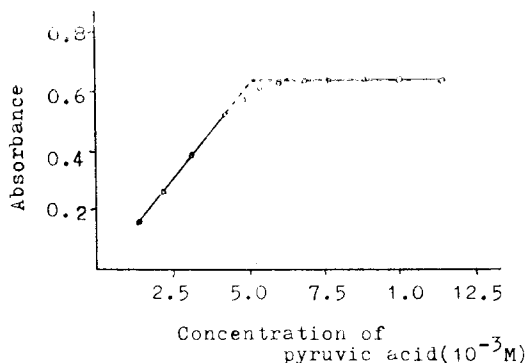


Fig. 5—Molar ratio of complex compound by slope method.

$\lambda_{\max}=600\text{nm}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]=2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $[\text{Hy}]=2.1\%$

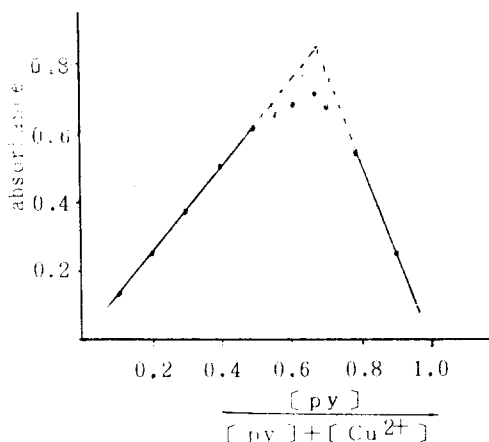


Fig. 6—Molar ratio of complex compound by continuous variation method.

$\lambda_{\max}=600\text{nm}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}]+[\text{Py}]=9.0 \times 10^{-6}\text{M}$

2) 청색의 착화합물—UV  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  nm (log $\epsilon$ ); 600(2.06), 327(3.29), 218(4.26), IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; 3350~3100(OH  $\nu$ ), 2800( $\text{CH}_3$   $\nu$ ), 1690 (COOH의 C=O  $\nu$ ), 1675(C=N  $\nu$ ), 1460( $\text{CH}_3$   $\delta$ ), 1360( $\text{COO}^-$   $\nu$ ), 635(Cu—O  $\nu$ ), total N wt%; 9.01 (calc. 9.23), total Cu wt%; 20.24 (cac. 20.93)

3) 녹색의 착화합물—UV  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  nm(log $\epsilon$ ); 650(2.12), UV  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  nm(log $\epsilon$ ); 600(2.06), IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; 3200~3000(OH  $\nu$ ), 2800( $\text{CH}_3$   $\nu$ ), 1670(COOH의 C=O  $\nu$ ), 1620(C=N  $\nu$ ), 1435 ( $\text{CH}_3$   $\delta$ ), 1360( $\text{COO}^-$   $\nu$ ), total Cu wt%; 23.32 (calc. 23.75)

3)의 녹색 착화합물은 EtOH,  $\text{CCl}_4$ , cyclohexane 등 용매 분자의 배위성이 약한 용매에서는 650nm부근의 흡수극대를 나타내나  $\text{H}_2\text{O}$ 나 DMSO, formamide 등 N 포함 용매에서는 600nm 부근의 흡수극대를 나타냈다. 또한 EtOH,  $\text{CCl}_4$  등의 용매에  $\text{H}_2\text{O}$ 나 DMSO 등을 첨가하여도 흡수극대가 600nm 부근으로 이동하였다. 이의 같은 현상과 N의 원소분석 결과 및 Cu 분석치로 미루어 본착화합물은  $\text{H}_2\text{O}$  2분자가 배위수로 관여하고 있을 것으로 추정되는 바 IR spectrum에서 몇가지 유의성을 찾을 수 있었다.

우선 O—H 신축진동의 경우 녹색 화합물은 3200~3000 $\text{cm}^{-1}$ , 청색 화합물은 3350~3100  $\text{cm}^{-1}$ 로 청색 화합물이  $\text{H}_2\text{O}$ 의 영향을 받아 다소 high shift하였으며  $\text{CH}_3$ 의 변각진동, C=O, C=N의 신축진동등이 배위수 6이 넘는 청색 화합물이 배위수 4인 녹색 화합물보다 20~50 $\text{cm}^{-1}$  정도 high shift하였다. 이는 금속 착화합물에서 배위수가 4일 때보다 6일 경우가 결합력이 더 강해지기 때문이라 사료되며  $\text{H}_2\text{O}$  분자가 결정수로서가 아니라 배위수로서 작용하고 있음은 1600~1630 $\text{cm}^{-1}$  부근의 단독  $\text{H}_2\text{O}$  분자의 —OH 변각 진동이 보이지 않고 금속에 배위되었을 경우의 Cu—O 신축진동이 635

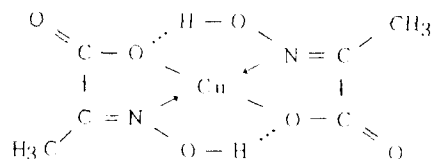


Fig. 7—Suggested structure of the complex compound.

Table I—Recoveries of 550 $\mu\text{g}/\text{ml}$  pyruvic acid in the presence of various compounds. (wave length 600nm)

compound	amount of added compound ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	recovery (%)
citric acid	790	116
	260	102
maleic acid	730	97
oxalic acid	580	107.5
	350	102
tartaric acid	940	100.2
sulfamic acid	610	99.5
sulfanilic acid	910	97.4
butyric acid	550	103
glycolic acid	480	100.4
lactic acid	560	101
fructose	1,130	104.8
galactose	1,130	104.8
glucose	1,130	103
alanine	550	103
glycine	330	100.1
	470	107.7
glutamic acid	280	100
	920	93.2
aspartic acid	550	101
	830	104.7
methionine	500	103.3
	930	92.2
acetone	560	98
ascorbic acid	580	98.1
	340	96.7

$\text{cm}^{-1}$  부근의 청색화합물 spectrum 상에서 관측됨을 보아 알 수 있다. 또한 ketoxime에 서는 나타났던  $1415, 910\text{cm}^{-1}$  부근의 COOH의 OH 변각진동이 착화합물을 형성하면서 사라진 것은 ketoxime이  $\text{Cu}^{2+}$ 에 배위되면서 COOH의 H가 이탈하고  $\text{Cu}^{2+}$ 와 ion결합을 한 사실을 뒷받침하고 있다. 이상의 자료들을 종합한 결과 착화합물의 구조는 Fig. 7과 같이 추정된다.

본 착체는 ketoxime의 cayboxyl group의 산소가  $\text{Cu}^{2+}$ 와 ion결합을 1차로 형성하고 질소의 lone pair electron이 Cu 금속에 배위한 구조로서 ketoxime이 2차 배위자로 작용하여 tetragonal 형태를 이루면서 착화합물 평면의 Z축상하로  $\text{H}_2\text{O}$ 가 1분자씩 각각 배위하여 흡수극대를 단파장 쪽으로 다소 이동시키는 것으로 사료된다.

**정량조건 및 검량선의 작성**—pyruvic acid 일정량을 취하여 반응조작에 따라 조작한 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한 결과  $150\sim 750\mu\text{g/ml}$ 에 대해서, 또 327nm에서도 검량선을 작성해 본 결과  $9\sim 45\mu\text{g/ml}$ 에 대해서 Lambert-Beer의 법칙이 성립하였다.

**방해물질의 영향**—방해가 예상되는 물질 중 각종 유기산 및 당과 amino산의 영향을 Table I에 나타내었다.

maleic acid, tartaric acid 및 lactic acid 등 3종의 유기산과 alanine, glutamic acid, aspartic acid, methionine 등 4종의 amino acid는 pyruvic acid와 동량으로 혼입되어 있어도 오차범위 내에서는 별 영향이 없었으며 citric acid와 oxalic acid 및 glycine은 동량 혼입시에는 다소 영향이 있으나 1/2정도의 혼입에는 아무런 영향이 없었다. 또한 2,4-dinitrophenylhydrazine법에서 심하게 방해작용을 하는 fructose, galactose 및 glucose 등은 2배 이상의 혼입시에도 오차범위내에서 아무런 영향이 나타나지 않고 있다.

## 결 론

1. pyruvic acid를 hydroxylamine과 반응시키고 다시  $\text{Cu}(\text{II})$ 와 complex를 형성시킴으로써 complex compound의 정색을 정량에 이용하였다.

2. complex compound의 조성비를 slope method와 연속변화법으로 측정하여 2:1의 화합물임을 알았다.

3. UV-Vis, IR, NMR spectrum과 A.A 및 원소분석으로 부터 complex compound의 구조를 예상하였다.

4. 안정도정수는  $1.88 \times 10^4$ 이었다.

5.  $\lambda_{\text{max}}$  600nm 에서는 pyruvic acid  $150\sim 750\mu\text{g/ml}$ 에 대해서, 327nm에서는  $9\sim 45\mu\text{g/ml}$ 의 pyruvic acid에 대해서 정량이 가능하였다.

6. lactic acid, fructose, glucose 등의 영향을 제거할 수 있었다.

## 문 헌

1. E. Bamberger, *Ber. Chem. Ges.* 26, 1306(1893); *ibid* 32, 1803(1899).
2. E. Hyde, *Ber. Chem. Ges.*, 32, 1810(1899).
3. H.D. Dakin and H.W. Dudley, *J. Biol. Chem.* 15, 127(1913).
4. H.D. Dakin, *J. Biol. Chem.* 4, 235(1908).
5. G.D. Lu, *Biochem. J.* 33, 249(1939).
6. E. Bueding and H. Wortis, *J. Biol., Chem.* 133, 585(1940).
7. K. Kato and P.K. Li, *Am. J. Dis. Child.* 61, 1222(1941).
8. T.E. Friedeman and G.E. Haugen, *J. Biol. Chem.* 144, 67 (1942); *ibid* 147, 415(1943).

9. 清水, 生化學, **22**, 108(1950).
10. 清水, *J. Biochem.* **37**, 421(1950).
11. 吉川, 當山, 醫學と生物學, **17**, 102(1950).
12. S. Reitman and S. Frankel, *Am. J. Clin. Path.* **28**, 56(1957).
13. P.M. Babaskin, *Lab. Delo.* **8**, 497 (1976). [C.A. **85**, 155973y (1976)]
14. V.S. Alekseev, *Ukr. Biokhim. Zh.* **50**, 517 (1978). C.A. **89**, 142774s (1978).
15. V.N. Novikova and N.A. Kudryashova, *Vinodel. Vиноград.* **3**, 22 (1981). [C.A. **95**, 40759x (1981)]
16. A. Bronze and J. Nascimento, *Rev. Port. Farm.* **39**, 43 (1980). [C.A. **94**, 79501m (1981)]
17. I.A. Lisnykak, *Ukr. Biokhim. Zh.* **53**, 111 (1981). [C.A. **94**, 117016s (1981)]
18. D.V. McCalley, M. Cooke and C.A. Pennock, *J. Chromatogr.* **163**, 201 (1979).
19. R.T. Marsili, H. Ostapenko, R.E. Simmons and D.E. Green, *J. Food. Sci.* **46**, 52 (1981). [C.A. **94**, 82292z (1981)]
20. U. Langenbeck, H.U. Moehring and K.P. Dieckmann, *J. Chromatogr.* **115**, 64 (1975).
21. H. Kallio, R.R. Linko, T. Pyysalo and I. Puntari, *Anal. Biochem.* **90**, 359 (1978).
22. N. Kozukue, *J. Food. Sci.* **46**, 156 (1981). [C.A. **94**, 92294b (1981)]
23. S.P. Katrukha, N.N. Shitov and V.G. Kukes, *Lab. Delo.* **7**, 33 (1983). [C.A. **99**, 101759d (1983)]
24. H. Nakamura and Z. Tamura, *Anal. Chem.* **51**, 1679 (1979).
25. F. Rocchiccioli, J.P. Leroux and P. Lartier, *Biomed. Mass Spectrom.* **8**, 160 (1981). [C.A. **95**, 76326t (1981)]
26. T. Hayashi, H. Todoriki and H. Naruse, *J. Chromatogr.* **224**, 197 (1981).
27. L.I. Woolf, C. Hasinoff and A. Perry, *J. Chromatogr.* **231**, 237 (1982).
28. K. Kobayashi, E. Fukui, M. Tanaka and S. Kawai, *J. Chromatogr.* **202**, 93 (1980).
29. S. Ohmori, Y. Tanaka, M. Ikeda and K. Hirota, *Anal. Biochem.* **112**, 204 (1981).
30. P.T. Ozand, R.L. Hawkins, R.M. Collins, J.T. Tildon and N. Cornblath, *Biochem. Med.* **14**, 170 (1975). [C.A. **84**, 132233x (1976)]
31. R.J. Maughan *Clin. Chim. Acta.* **122**, 231 (1982). [C.A. **97**, 106416h (1982)]
32. S.E. Turner and R.C. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 912 (1949).