

## 분광광도계를 이용한 L-tyrosine과 L-DOPA 혼합물의 분석방법

김 지 현 · 유 영 제\*  
서울대학교 공과대학 화학공학과

## Assay Method of L-tyrosine and L-DOPA Mixture Using Spectrophotometer

Ji Hyeon Kim and Young Je Yoo\*

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

### ABSTRACT

Tyrosine is a monohydric aromatic amino acid and DOPA is a tyrosine derivative containing dihydroxy group. DOPA can be synthesized from tyrosine by enzymatic reaction. The separation and quantitative determination of each component are very difficult in the reaction mixture. In the present study, two wavelengths giving maximum absorbance difference of each amino acid were determined using UV/VIS spectrophotometer by wavelength scanning and simple assay method was developed for the analysis of the reaction mixture of tyrosine and DOPA by measuring absorbances of reaction mixture. This method can be simply used for the analysis of the tyrosine and DOPA mixture because it does not require and procedure for the pretreatment of the reaction mixture.

### 서 론

Tyrosine은 amino기와 carboxyl기를 하나씩 가지는 중성 아미노산으로  $\beta$ -탄소에 페놀기를 가지는 방향족 화합물이고 L-DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine)는 페놀의 ortho 위치에 수산화기가 하나 더 첨가된 tyrosine 유도체이다. L-DOPA는 중추 신경계에 침투되어 뇌저 신경절 내에서 dopamine으로 전환되는데 dopamine의 결핍은 파킨슨씨 병의 증상 발현과 관계되어 있어 파킨슨씨 병의 중요한 의학적 치료제로 사용된다. L-DOPA는 미생물이나 동·식물 조직속에 분포하고 있는 tyrosinase에 의해 L-tyrosine의 o-hydroxylation에 의하여 전환되거나 (1-2), yeast 등에 분포되어 있는 tyrosine phenol-lyase에 의해 DL-serine과 pyrocathchol로부터 합성된다(3). 최근에는 사람의 혈액속에 고정화된 tyrosinase를 직접

투여함으로써 in situ 상태에서 L-DOPA를 생성시켜 병을 치료하려는 연구(4)가 진행중이다. Tyrosinase는 cresolase와 catecholase의 두가지 촉매 활성을 지닌 효소로서 L-tyrosine으로부터 L-DOPA로 in vitro 상태에서 생물 전환하는 것은 cresolase에 의한 one-step 반응이나 L-DOPA는 다시 catecholase에 의해 dopaquinone으로 전환되어 최종적으로 melanine이 된다(5). 그러므로 L-DOPA의 생성을 위해서는 catecholase에 의한 전환반응을 억제해야 한다. L-DOPA는 catecholase에 의하여 산소와 결합하여 dopaquinone으로 산화되는데 dopaquinone은 수용액에서 매우 불안정하여 dopachrome이라는 주황색 물질로 전환된다. 그러나 반응액의 적당한 환원제(e.g. ascorbic acid)가 첨가되면 생성된 dopaquinone이 L-DOPA로 환원되는 역반응이 동시에 진행되므로 L-DOPA가 축적되며 반응액의 색 변화도 관측되지 않는다

(6-10). 따라서 반응액에는 L-tyrosine과 L-DOPA의 두가지 아미노산이 존재하게 된다.

아미노산이 혼합되어 있는 경우 그 각각의 분석 방법에는 1) 분별 증류에 의한 ethyl esters의 분리 방법, 2) 이온 교환 크로마토그래피법, 3) 아미노산 R-group과 특정 반응 후 그 결과를 비중 또는 비색 측정하는 것으로 예를 들면 tryptophane의 indole기, tyrosine의 phenol 기와 반응하여 그때의 색 변화를 측정할 수 있으며, 4) 회석된 반응액에 특정 아미노산과 결합하는 동위원소를 첨가하고 일정시간 후 동위 원소를 분리하여 그 양의 차이로 부터 분석하는 동위 원소 회석 방법, 5) 성장에 특정한 아미노산을 필요로 하는 acid 생성 미생물을 배양하여 생성된 acid 양을 측정하는 미생물학적 방법 등(11)이 있다. 일반적으로 많이 사용되는 것은 효소나 시약을 이용하는 세번째 방법으로 tyrosine과 L-DOPA의 혼합물은 Millon 반응을 약간 수정하여 분석할 수 있는데(12) 반응 시간이 길며, 분석 방법이 복잡하다는 단점이 있다. 미생물학적 방법은 적은 양의 시료로 정확하게 분석할 수 있으나 배양시간이 길고 다른 미생물에 의해 오염될 우려가 있다(13).

HPLC나 자동 아미노산 분석기를 사용하는 경우 여과, 치환 또는 특정 반응등의 전처리 작업이 필요하며 장치비와 운영비가 많이 든다.

Spectrophotometry는 생화학적 분석의 주요 방법으로서 방향족 화합물의 경우 분석이 가능하고 장치가 간단하여 널리 이용되는데 본 논문에서는 tyrosine, L-DOPA의 아미노산 혼합물을 spectrophotometer를 이용하여 손쉽고 빠르게 분석할 수 있는 방법을 제시하였다.

**재료 및 방법**

**시 약**

L-tyrosine, L-DOPA (Sigma사)는, 0.05M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 용해시켜 4℃에 보관하여 사용하였다.

**분석방법**

일정 농도의 시약 3ml를 시험관에 넣어 UV / VIS spectrophotometer (KONTRON, UVIKON 930)를 이용하여 흡광도를 관측하였다. L-tyrosine은 물에 대한 용해도가 낮으므로 (3 mM at 30℃) 시약의 농도를 3 mM 이하로 하였다.

**결과 및 토의**

특정 파장에서 빛을 흡수하는 물질의 농도가 높을수록 그리고 더욱 효과적으로 빛을 흡수하는 물질일수록 흡광도는 커지게 되는데 이 둘간의 관계는 Beer-Lambert 법칙에 의해 결정된다(14). 여러 물질이 섞여있는 혼합물의 흡광도는 특정 파장에서 각각의 농도에 비례하여 나타난다. 만약 두 가지 물질만 존재하거나 아니면 다른 물질이 그 파장에서 전혀 간섭을 일으키지 않는다면 흡광도는 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$A_1 = \epsilon_{11}bC_1 + \epsilon_{21}bC_1 \tag{1}$$

$$A_2 = \epsilon_{21}bC_2 + \epsilon_{22}bC_2 \tag{2}$$

, where A : absorbance,

$\epsilon$  : extinction coefficient ( $M^{-1} cm^{-1}$ ),

b : light path length (usually 1 cm),

C : concentration of solution (M)

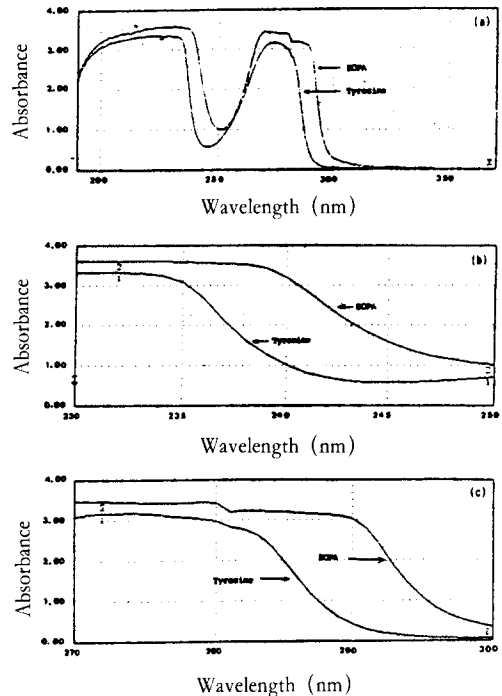


Fig. 1. Wavelength scanning of tyrosine and DOPA solution  
 (a) from 190 nm to 370 nm, (b) from 230 nm to 250 nm,  
 (c) from 270 nm to 300 nm

즉 두 물질을 뚜렷이 구별할 수 있는 두개의 특정 파장을 찾아 그 파장에서 각 물질의 흡광계수  $\epsilon$ 를 결정하여 식을 만든 후 위의 두 연립 방정식을 풀어서 각 물질의 농도를 계산할 수 있다.

먼저 L-tyrosine과 L-DOPA 두 물질을 spectrophotometer 로 UV 영역에서 파장에 따라 wavelength scanning 하였다. 파장의 모양은 Fig. 1에서와 같이 페놀의 ortho 위치에 치환된 수산화기의 영향으로 L-DOPA가 L-tyrosine 에 비해 5-7nm정도 긴 파장으로 이동된 것을 제외하고는 전체적으로 비슷한 경향을 보였다. 그러므로 두 물질이 구분되는 230-250nm와 270-300nm에서 다시 흡광도를 측정하여 DOPA의 흡광도가 큰 290 nm와 tyrosine 도 어느 정도의 흡광도를 보이고 있는 237nm 를 두 파장으로 결정하였다. 290nm에서는 L-DOPA의 흡광계수가 L-tyrosine에 비해 크므로 흡광도는 대부분 L-DOPA의 양에 의해서, 237nm에서는 두 물질의 흡광계수가 큰 차이를 보이지 않으므로 흡광도는 두 물질의 양에 의해 결정된다. L-tyrosine과 L-DOPA의 표준물질을 가지고 농도에 따른 흡광도를 측정하여 Fig. 2의 표준곡선을 작성하고 흡광계수  $\epsilon$ 값을 결정하였다. 표준곡선에서 보면 L-tyrosine과 L-DOPA 모두 1.5mM까지는 두 파장에서 직선을 보였다. 그러므로 이 방법을 사용하려면 측정값이 이 농도 범위안에 들어오도록 희석하여야 한다. 이를 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$A_{237} = 1118.24 \times C_{\text{tyrosine}} + 1992.19 \times C_{\text{DOPA}} \quad (3)$$

$$A_{290} = 131.51 \times C_{\text{tyrosine}} + 1219.12 \times C_{\text{DOPA}} \quad (4)$$

각각의 농도를 알고 있는 tyrosine-DOPA 여러 혼합물을 237nm, 290nm 두파장에서 흡광도를 측정하고 위의 식으로 계산 확인한 결과를 Table 1.에 나타내었다. Tyrosine 의 농도가 1.5mM이상에서는 오차가 5-8%에 달하나 1.5mM이하의 농도에서는 두 물질 모두에서 오차가 2-6% 이내임을 알 수 있다.

Tyrosine-DOPA 시스템은 tyrosine-melanine 반응 경로상의 첫번째 반응 단계로 전체 반응 경로는 효소-화학 반응계다. 그러므로 일정 시간 이후에는 반응액 내에 둘 이상의 혼합물이 존재하는데 반응시 적당한 환원제를 첨가하면 효소 반응 결과 생기는 dopaquinone이 환원제에 의해 DOPA로 재환원됨으로써 반응 혼합물에는 tyrosine, DOPA, 환원제만 존재하게 된다. 이때 두 파장에서 빛을 흡수하지 않는 환원제를 사용하면 본 연구에서 개발한 방법은 좋은 분석 system이 된다.

## 요 약

Tyrosine은 방향족 아미노산이고 L-DOPA는 ortho위치

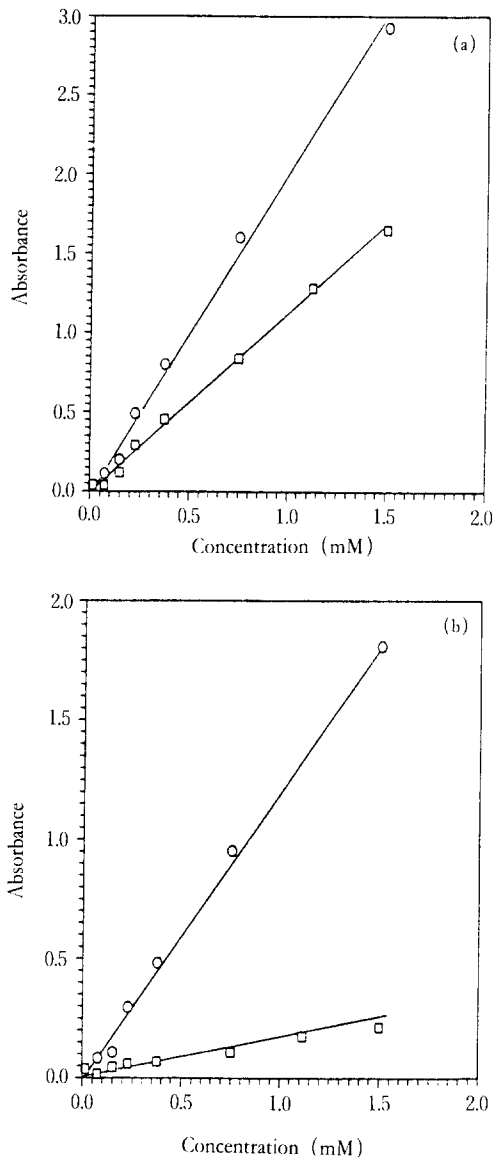


Fig. 2. Calibration curve of tyrosine and DOPA solutions

(a) at 237 nm, (b) at 290 nm. ○: DOPA, □: tyrosine

에 수산화기를 하나 더 가지는 tyrosine 유도체이다. L-DOPA는 효소에 의하여 tyrosine으로부터 전환되어

Table 1. Concentration determination of tyrosine and DOPA mixtures

Sample Concentration		Observed concentration		Error*(%)	
tyrosine(mM)	DOPA(mM)	tyrosine(mM)	DOPA(mM)	tyrosine	DOPA
1.92	1.38	2.07	1.44	7.81	4.35
1.59	1.12	1.68	1.18	5.66	5.36
1.29	0.87	1.32	0.91	2.33	4.60
0.88	0.68	0.92	0.71	4.54	4.41
0.73	0.33	0.76	0.35	4.11	6.06

\* error=(observed conc.-sample conc.) / (sample conc.)×100(%)

생성할 수 있는데 반응액에서 두 물질을 분리, 분석하는 것은 상당히 어렵다. 본 논문에서는 두 아미노산 혼합물을 UV / VIS spectrophotometer를 이용하여 동정함으로써 두 물질이 구분되는 두 파장을 결정하였고 두 파장에서 혼합물의 흡광도를 측정함으로써 농도를 정량하는 분석 system을 확립하였다. 이 방법은 시료에 아무런 전처리가 필요없으므로 손쉽고 간단하게 분석에 사용할 수 있다.

### 참 고 문 헌

1. K. Haneda, S. Watanabe, and I. Takeda(1971), *Appl. Microbial.*, **22**, 721.
2. H. J. Huizing, and H. J. Wichers(1984), *Innovations in Biotechnology*, (E. H. Houwink and R. R. van der Meer, eds), p. 217, Elsevier, Amsterdam.
3. H. Enei, and H. Yamada(1986), *Progress in Industrial Microbiology*, (K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada, eds), vol. **24**, 280, Kodansha, Tokyo.
4. J. R. Wykes, P. Dunnill, and M. D. Lilly(1971), *Nature New Biol.*, **230**, 187.
5. H. S. Mason(1959), *Pigment Cell Biology*, p. 563, Academic Press, N.Y.
6. R. C. Krueger(1950), *J. AM. Chem. Soc.*, **72**, 5582.
7. R. C. Krueger(1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**, 87.
8. S. H. Pomerantz(1966), *J. Biol. Chem.*, **241**(1), 161.
9. E. Vilanova, A. Manjon, and J. L. Iborra(1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1306.
10. S. Lissitzky, and M. Rolland(1962), *Nature*, **193**, 881.
11. B. L. Oser(1965), *Hawk's Physiological Chemistry*, p. 127, McGrawHill, N.Y.
12. L. E. Arnow(1937), *J. Biol. Chem.*, **118**, 531.
13. I. Karube, S. Suzuki(1986), *Progress in Industrial Microbiology*, (K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada, eds), vol. **24**, 81, Kodansha, Tokyo.
14. D. L. Pavia, G. M. Lampman, and G. S. Kriz, Jr. (1979), *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, p. 183, W. B. Saunders Company.

(Received July 13, 1990, Accepted: July 31, 1990)