

요중 델타아미노레블린산량의 측정법

요중 델타아미노레블린산 (δ -aminolevulinic acid, ALA)양 측정은 1956년 Mauzerall-Granick에 의해서 이온교환수지에 ALA를 흡착시켜 이것을 ALA-피롤로 변화시키고 에리히 시약으로 발색시키는 방법이 제시된 후 활발하게 측정되기 시작했다. 그러나 이 방법은 ALA와 유사한 아미노아세톤(AA)을 분리할 수 없기 때문에 이 AA가 ALA의 측정량을 많아지게 하는 결점이 있다. 그래서 이 AA를 분리할 수 있는 방법이 Urata와 Granick(1963)에 의해 제시되었다. 그러나 이 Urata-Granick법은 컬럼을 3개 사용하기 때문에 조작이 번잡해서 단시간에 많은 검체측정을 해야 할 때는 효과적인 방법이라고 할 수 없다. 그러나 AA를 분리하지 않아도 연구목적에서는 어떻든간에 스크리닝에는 충분히 사용할 수 있는 점도 있어서 Mauzerall-Granick법이, 그후 Davis-Andelman법(1967)이 개발되었지만 아직까지 많이 사용되고 있다.

이온교환수지를 사용하는 방법으로는 이상의 방법 외에 최근 木村외 (1978)에 의해서 한가지 방법이 제시되었다.

이 방법은 近藤 외 (1978)에 의해서 가장 신뢰할 수 있는 방법으로서 권장되고 있으나 PBG는 측정할 수 없다. 여기에서는 가장 많이 이용되고 있는 Mauzerall-Granick법을 중심으로 기술하고 여기에 Urata-Granick 방법을 소개한다.

한편 이온교환수지를 사용하는 번잡함을 피하기 위해서 컬럼을 사용하지 않는 간편한 방법이 개발되었는데 이것으로는 ALA를 피롤화합물로 만든 후 초산에틸로 추출하고 이것을 에리히 시약으로 발색시키는 방법(友國-緒方法和 和田 법을 중심으로 소개하려 하는데, 이 방법들은 요비중에 따라서 이 측정치가 낮아지는 수가 있으며, 그 외에 검량선의 직선범위에서 측정해야 하는 점에 주의해야 한다. 이상과 같은 점들을 개량하기 위해서 友國과 市場(1988)에 의해서 제시된 개량법이 있는데 이 방법도 함께 다루어 보도록 한다.

1. Mauzerall-Granick 법

가. 원리

ALA는 아세틸아세톤과 결합하여 ALA-피롤을 만든다. 이 피롤을 산성용액중에서 에리히 시약 p-디메틸아미노벤조알데히드로 적색으로 발색시켜서 비색정량하는 방법이다. 요중에 존재하는 것중 다른 에리히 시약과 반응하는 다른 물질은 미리 컬럼으로 분리시킨 후 측정하게 되는데 이 방법으로는 아미노아세톤(AA)은 분리할 수 없다. AA는 ALA 유사물질로 에리히 시약에 같은 발색을 하기 때문에 AA를 분리시키고자 할 때에는 Urata-Granick법으로 해야 한다. 그러나 스크리닝에서는 AA를 제거하지 않더라도 평가에는 거의 영향이 없기 때문에 Mauzerall-Granick법으로 충분하다고 생각된다.

나. 시약 및 기구

- 1) 이온교환수지 Dowex-2×8, 200-400 mesh (BIO-RAD AG-2×8, 200-400 mesh, chloride form) Dowex-50×8, 200-400 mesh(BIO-RAD AG-50W-×8, 200-400 mesh, hydrogen form)
- 2) 4N, 2N, 1N 염산용액
- 3) 3M, 0.5M 초산나트륨 용액
- 4) 1M초산용액
- 5) 아세틸아세톤
- 6) 초산완충액 (pH4.6)
초산나트륨 CH₃COONa. 3H₂O 136g에 빙초산 57ml을 가하고 증류수로 1ℓ를 만든다.
- 7) 에리히 시약
p-디메틸아미노벤조알데히드 1g을 약 30ml의 빙초산으로 녹이고 과염소산 HClO₄(70%) 8.0ml를 가한다.
- 8) 크로마토관 (내경 10mm과 8mm의 두종류)
- 9) waterbath
- 10) 분광광전광도계

다. 정량조작법

1) 전처리

Dowex-2 세정후 3M의 초산나트륨용액으로 클로라이드가 없어질 때까지 씻어낸후, 초산나트륨이 없어질 때까지 증류수로 세정한다(BIO-RAD AG-2×8은 이 조작이 필요 없다).

Dowex-50은 세정후 2N 수산화나트륨으로 하루밤 방치하고 증류수로 중성이 될 때까지 세정한다(BIO-RAD AG-50W×8은 이 조작이 필요 없다).

2) 정량조작

제1크로마토관(내경 10mm), 제2크로마토관(내경 8mm)의 저부에 각각 수지의 유출을 방지하기 위해 글라스 울을 2~3mm 채운다.

제1 크로마토관에는 증류수에 띄운 수지 Dewex-2를 피펫트로 3ml 넣는다.

제2 크로마토관에는 Dowex-50을 1.5cm정도 높이가 되게 한다. 각각 증류수를 흘려보내고 유속은 3ml/10min로 한다. 제2 크로마토관에는 4N 염산 1ml 1회, 2N 염산 5ml 1회, 1N 염산 1회를 넣는다. 증류수로는 중성으로 될 때까지 세정한다.

가) 제1크로마토관에는 요 1ml를 피펫트로 가한 후 증류수를 2ml씩 5회 가한다.

나) 적하액 약 11ml를 제2크로마토관에 가하고 증류수로 세정한다. 이 적하액은 버린다.

다) 0.5M 초산나트륨 용액 2ml씩을 4회 가하고 이 적하액은 시험관에 담는다.

마) 100°C 수용액에서 10분간 가열한다.

바) 방냉후 이 용액 2ml를 넣고 에리히 시약 2ml를 가하고 15분후에 553nm에서 비색한다.

3) 크로마토관의 재생

제1크로마토관에 1M 초산 2ml, 0.2M에 초산 2ml로 2회 씻어내고 증류수로 중성이 될 때까지 세정한다.

제2크로마토관은 증류수로 중성이 될 때까지 세정한다.

라. 계산

$$\text{흡광도} \times 47 = \text{mg} / \ell$$

2. Urata-Granick 법

가. 원리

두 종류의 이온교환수지(단 컬럼은 3개)를 이용하여 ALA를 분리하고 ALA-피롤을 만들어서, 이것을 에리히 시약으로 발색시켜 정량하는 방법

나. 시약

1) 양이온교환수지

Amberlite IRC 50(100~200mesh), 물로 미세한 입자를 될 수 있는 한 제거 한 후 10배 양의 1N 수산화나트륨과 1N염산으로 번갈아서 처리하는 통상적 정제조작을 수회 반복하고, 마지막으로 1N염산으로 H+형으로 만든다. 이것을 염산분이 없어질 때까지 물로 잘 씻은 후, 칼럼에 넣고 10배양의 1M 초산원충액 (pH4.8)을 흘려 보내 평형화시켜 세정하고 냉수에 보존한다.

2) 음이온교환수지

Dowex 1×8(200~400mesh)

1)과 같은 정제조작을 한 후, 마지막으로 1N 수산화나트륨으로 OH-형으로 만든다. 이것을 알칼리성이 없어질 때까지 물로 씻어내면서 10배양의 3N 초산나트륨을 가하여 하루밤 잘 저어 초산형으로 만든다. 하루 지나서 물로 과잉초산나트륨이 없어질 때까지 세정하고 물에 담구어 찬 곳에 보존한다.

(주) 특급초산나트륨이라도 다량의 염소 이온을 함유하고 있는 수가 있으므로 미리 초산으로 점검해 둘 것.

3) 1M 초산원충액(pH4.6)

4) 아세틸아세톤

5) 메탄올(에리히 시약)

6) 정색액(에리히 시약)

p-디메틸아미노벤조알데히드 4g

빙초산 168ml

과염소산(70%) 40ml

0.2M 염화제2수은 15ml

물로 230ml를 만든다.(냉암소 보존)

(주) 2일간만 사용할 수 있다.

다. 계산

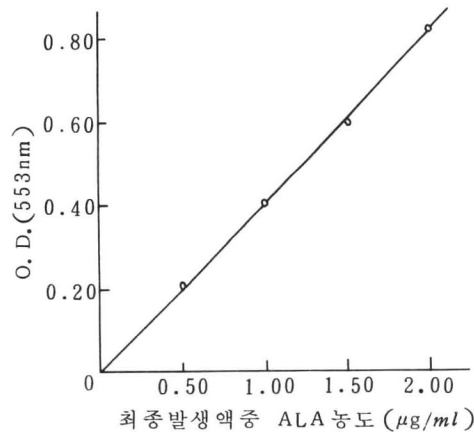
최종 발색액 ALA-피롤에 의한 ALA 검량선을 그림 1에 나타냈다. 여기에서 얻어진 Em치, 5.3×10^4 와 회수를 94~96% 및 ALA 분자량 131로부터 최종 ALA함량을 계산한다.

라. 주의

1) AA를 정량하려고 할 때는 IRC 50칼럼에서 N염산으로 AA를 용출하여 ALA 경우와 마찬가지로 피롤화해서 측정한다. 또 PBG를 정량하려고 할 때는 Dowex 1칼럼에서 1M 초산으로 용출시켜 에리히 시약으로 직접 측정한다.

2) 혈액, 조직 등의 5g/dl 트리클로르초산 제단백액을 검체로 할 때는 0.5N 수산화나트륨을 이용하여 pH 6~8로 중화하고 나서 요의 경우와 같은 조작을 한다.

3) 블랭크는 0.5ml 아세틸아세톤 대신에 물 0.5ml를 이용한다.



(그림 1) ALA검량선—
Urata-Granick 법

3. 和田法

가. 원리

우로빌리노겐 등 에리히 시약 발색물질을 용매로 제거한 후 ALA 피롤을 만들고 시약으로 적색으로 발색시켜 비색정량한다. 따라서 이온교환수지를 사용하지 않는 방법이다.

나. 기구

- 1) 시험관(20~30ml, 12~13ml 및 7~8ml들이), 룯트, 면마개, 피펫류, pH시험지, 자비용기
- 2) 광전비색계 또는 분광광전광도계

다. 시약(모든 시약은 특급을 사용)

- 1) n-부틸알콜
- 2) 클로로포름
- 3) 20% 초산
- 4) 1M 인산나트륨완충액 pH6.8
- 5) 아세트초산에틸, 인산나트륨 완충액 1:20의 혼합물
- 6) 에리히 시약

파리디메틸아미노벤조알데히드	4g
빙초산	128ml
과염소산(70%)	40ml
염화제2수은 0.2M	10ml
염산	40ml

라. 방법

1) 시험관에 요 2.0ml를 넣고 20%초산 2.0ml가한다.

2) 여기에 부틸알콜 8ml를 가해 세게 흔들어 혼합하고 정치해 둔다. 2층으로 분리된다.

3) 상층을 아스피레타로 버리고 하층을 2개의 시험관에 각기 0.5ml 넣는다.

4) 한편에는 아세트초산에틸, 인산나트륨완충액 혼합액 1.5ml 넣고

5) 다른 한편에는 아세트초산에틸을 함유하지 않은 인산나트륨 완충액 1.5ml 넣는다. 이것이 블랭크이다.

6) 양방의 시험관을 욱탕중에서 10분간 끓인다.

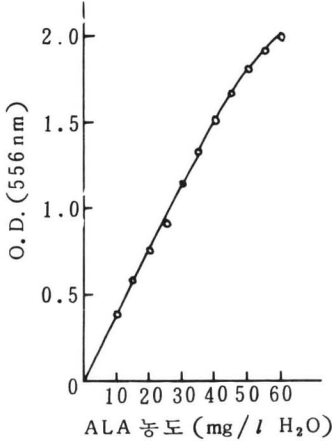
7) 식힌 후 에리히 시약 2ml를 가한다. 적색을 발한다.

8) 여기에 클로로포름 4.0ml를 가하여 흔들고 이 적색물질을 추출한다.

9) 클로로포름 층을 블랭크와 함께 556µm에서 비색한다.

마. 검량선

표준시약에 의해 같은 조작으로 분리, 비색하여 구한다



(그림 2) ALA검량선(和田三法)

바. 주의사항

1) 이 방법은 ALA 농도 5mg/ℓ 이상인 경우에는 원법 A와 잘 일치한다. 그러나 농도가 낮을 때는 평균해서 30% 정도 높게 나온다. ALA 1mg/ℓ 이하의 요에서 2배 값으로 나오는 수도 드물지 않게 있다. 따라서 정상치를 구하는 데는 적절한 방법이라고 할 수 없다.

2) 클로로포름 추출물의 비색에서는 수층을 아스피레타로 버린 후 클로로포름을 면마개로 여과한 것을 사용하는 것이 좋다.

3) 20mg/ℓ 이상의 ALA를 함유한 요일 경우는 요를 희석해서 사용한다.

4. 友國一緒方法

가. 원리

ALA는 초산산성용액중에서 아세트초산에틸을 가해서 가열하고, ALA-피롤이 만들어지면 이것을 초산에틸로 추출한 후 그 일정량에 에리히시약을 가해 발색시켜 측정하는 방법

나. 시약

1) 1M 초산완충액(pH4.6)

약 700ml의 정제수에 초산나트륨(CH₃COONa · 3H₂O) 136g을 녹인후 빙초산 57ml를 가하여 메스플라스크에 옮기고 정제수로 1ℓ를 만든다.

2) 아세트초산에틸

3) 초산에틸

4) 에리히시약

본 시약의 조정에는 모두 특급을 사용한다. 빙초산 약 60ml에 p-디메틸아미노벤조알데히드 2g을 녹인다. 여기에 60%-과염소산 10ml와 증류수 10ml를 가한 후 빙초산을 가해 전체를 100ml로 만든다.(조정은 메스실린더로 하여도 관계없다) 본 시약은 사용할 때마다 조정하는 것이 바람직하나 냉장고(4℃)에 보존하면 2~3일간은 안정하다.

본 시약의 조정법은 새로 고안된 것으로서 종래의 에리히시약과는 조정법이 다르다.

5) ALA표준액(5mg/ℓ)

ALA의 HCℓ 염 6.4mg을 정확하게 칭량하고 이것을 증류수로 녹여 전체 100ml를 만들어서 ALA 저장액(50mg/ℓ)으로 한다. 이 저장액은 냉장고(4℃)에 보존하면 수개월이상 안정하다. 사용때마다 ALA저장액 1ml에 증류수 9ml를 가하여 ALA 표준액(5mg/ℓ)을 조정한다.

다. 조작

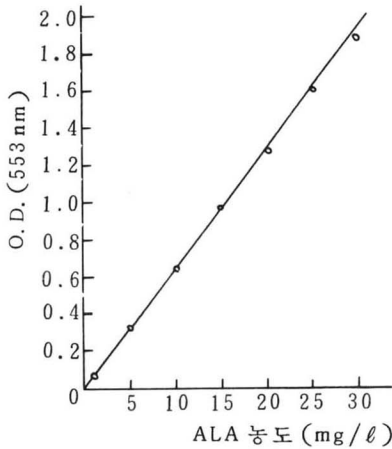
두개의 마개있는 시험관에 각기 요 1.0ml를 넣고 다른 시험관에 ALA 표준액(5mg/ℓ) 1.0ml를 넣는다. 다음에 이들 시험관에 초산 완충액 1.0ml씩을 가한다. 한편의 시험관(A) 및 표준액용 시험관에는 아세트초산에틸 0.2ml를 가해 진동믹서에서 약 5초간 진탕, 혼합한 후 비등용탕중에서 10분간 가열하고 냉각시킨다.

다른 쪽의 시험관(B)에는 아세트초산에틸을 가하지 않고 그대로 실온에서 방치한다(블랭크로서 이용한다). 시험관 (A)(B) 및 표준액용 시험관에 각기 초산에틸 3.0ml를 가하여 50회 정도 손으로 흔든 후 방치한다.(이 조작을 진동믹서로 하면 방치해두어도 2층으로 분리되기 어렵게 되므로 좋지 않다). 만일 2층으로 분리되기 어려운 경우는 가볍게 원심분리하면 좋다. 초산에틸층 2.

0ml를 다른 보통시험관에 넣고 에리히 시약 2.0ml를 가해 혼합해서 10분후에 초산에틸:에리히 시약(1:1) 혼합액을 대조액으로서 파장 553m μ 에서 흡광도(OD)를 측정한다. 이 정색액은 그 색조가 정색후 1시간 정도는 안정하다. 요중 ALA 농도는 다음 식에 의해서 구한다.

$$\text{요중 ALA(mg/l)} = \frac{(\text{A의 OD} - \text{B의 OD})}{\text{표준액의 OD}} \times 5$$

또는 미리 다음의 검량선을 (그림3) 작성해 두고 그것으로부터 구해도 좋다.



(그림 3) ALA 검량선 (友國-緒方法)

5. 友國-市場法

가. 원리

요에 직접 아세트초산에틸(또는 아세트초산메틸)을 가하여 가열하고 ALA-피롤을 만들어서 이것을 초산에틸로 추출하고 에리히 시약으로 발색시켜 측정하는 방법

나. 시약

- 1) 1M 초산완충액(pH4.6)

초산나트륨($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 136g을 초산 57ml에 녹이고 이것을 물로 1ℓ 만든다.

- 2) 아세트초산에틸
- 3) 초산에틸
- 4) 에리히 시약

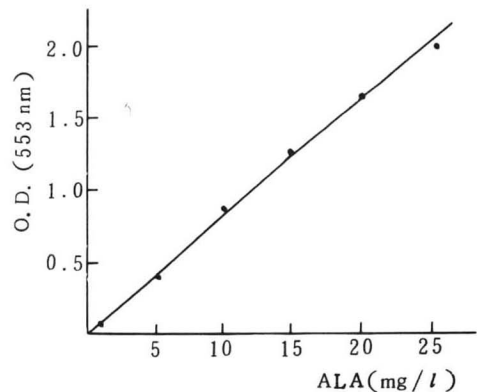
p-디메틸아미노벤조알데히드 2g을 초산 80ml에 녹인 후 60% 과염소산 10ml와 물 10ml를 가한다.

- 5) ALA 표준액(5mg/l)

ALA-HCL 12.8mg을 100ml물에 녹이면 100ml/l의 ALA 용액을 제작할 수 있다. 이것을 저장액으로 하고 사용시에만 20배로 희석한다. 이 저장액은 냉장고(4°C)에서 수개월 안정하다.

다. 측정순서

이 방법은 友國, 緒方法을 개량한 것인데, 상세한 순서는 友國-緒方法을 참조할 것. 검량선은 그림 4와 같다.



(그림 4) 友國-市場法에 의한 검량선

요의 부탄을 추출액의 잔액을 友國-市場법으로 측정하는 방법도 검토되고 있다.(田口, 緒方, 1986)